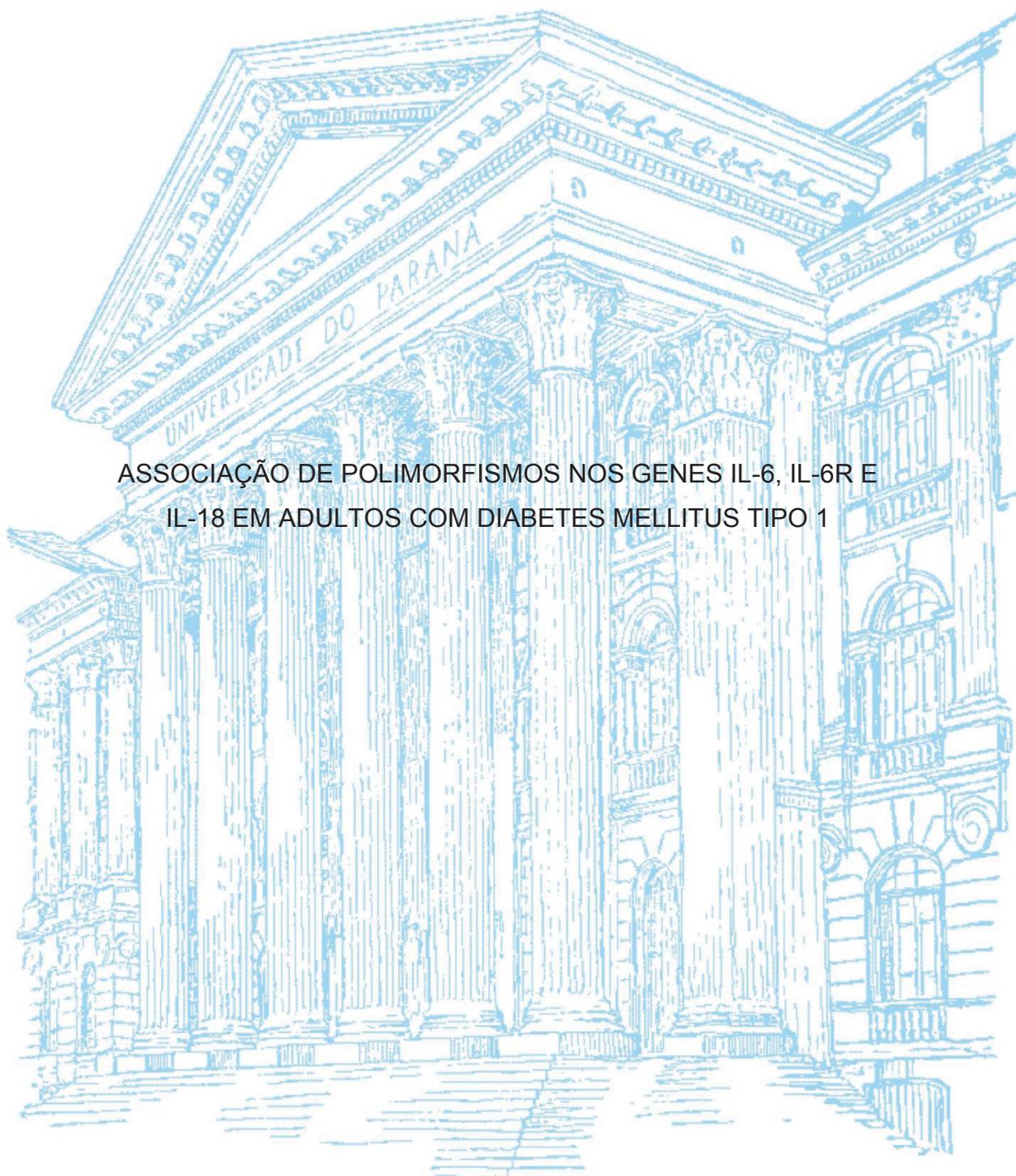


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

LOURYANA PADILHA CAMPOS



ASSOCIAÇÃO DE POLIMORFISMOS NOS GENES IL-6, IL-6R E
IL-18 EM ADULTOS COM DIABETES MELLITUS TIPO 1

CURITIBA

2019

LOURYANA PADILHA CAMPOS

ASSOCIAÇÃO DE POLIMORFISMOS NOS GENES IL-18, IL-6 E
IL-6R E EM ADULTOS COM DIABETES MELLITUS TIPO 1

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 G. de M. Rego
Coorientador: Prof. Dr. Geraldo Picheth

CURITIBA

2019

Campos, Louryana Padilha

Associação de polimorfismos nos genes IL-18, IL-6 e IL-6R e em adultos com diabetes mellitus tipo 1 [recurso eletrônico] / Louryana Padilha Campos – 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 G. de M. Rego

Coorientador: Professor Dr. Geraldo Picheth

1. Diabetes mellitus tipo 1. 2. Adultos. 3. Polimorfismo genético. 4. Citocinas.
I. Rego, Fabiane G. de M. II. Picheth, Geraldo. III. Universidade Federal do Paraná.
III. 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 **LOURYANA PADILHA CAMPOS** intitulada: **ASSOCIAÇÃO DE POLIMORFISMOS NOS GENES IL-6, IL-6R E IL-18 EM ADULTOS COM DIABETES MELLITUS TIPO 1**, 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, 27 de Fevereiro de 2019.

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

ANDRE LUIS FACHINI DE SOUZA
Avaliador Externo (IF Catarin)

LIZIANE CRISTINA CAMPOS B. DOS SANTOS
Avaliador Externo (UFPR)

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço a Deus, sem Ele nada disso seria possível. Em todos os momentos Ele foi minha fortaleza.

À minha família: meus pais, Ciro e Leoraci, que sempre me incentivaram a estudar e correr atrás dos meus sonhos, em especial minha mãe, que esteve ao meu lado em todos os momentos, me apoiando em cada decisão, agradeço por ter desempenhado um papel tão importante na minha vida, você é uma inspiração pra mim, uma referência de mulher, mãe, filha e profissional. À minha irmã Lorayne, você foi a responsável pelos momentos de descontração ao longo desse período e de toda a vida, é incrível saber que posso contar contigo para tudo, e obrigada pelo melhor presente: o Bruno. À minha avó Iolanda, o melhor colo do mundo, obrigada por ser uma mulher tão sábia e tão carinhosa, a senhora nunca mediu esforços para me ajudar e eu sou eternamente grata por isso. À minha prima Tacy, obrigada por sempre acreditar em mim e me incentivar a continuar, você é minha fã número 1.

Ao meu marido Vinicius, companheiro, amigo fiel, palavras não são suficientes para agradecer, você esteve comigo nos dias mais felizes e tristes, segurou a minha mão quando eu quis desistir e me ajudou a chegar até aqui. Sua participação foi fundamental, você tornou tudo mais alegre e engraçado, sem você eu não teria conseguido.

Aos meus amigos que tanto amo, principalmente a Tatiane e a Carol: meninas, vocês são as melhores amigas que eu poderia ter, me ajudaram a cada conversa, a cada encontro e a cada risada. Obrigada pela parceria de anos.

Aos meus colegas de laboratório, agradeço por cada auxílio, cada conselho e cada conversa descontraída. Vanessa e Melina, desde o início vocês estiveram comigo, carregou vocês em meu coração, obrigada por tornarem esses dois anos mais leves.

A Prof^a. Fabiane por me orientar durante esses anos, por todo conhecimento e auxílio fornecido. Agradeço também a oportunidade e a confiança.

Ao Prof^o. Geraldo, por toda ajuda, desde o básico até o mais complexo, pelas conversas descontraídas e conselhos.

A Prof^a. Dayane por me dar a oportunidade de fazer o estágio em docência e por todo carinho sempre demonstrado e toda sabedoria compartilhada.

Por fim, agradeço a UFPR e a CAPES por todo apoio.

“O que é nascido de Deus vence o mundo; e esta é a vitória que vence o mundo: a nossa fé. Quem é que vence o mundo? Somente aquele que crê que Jesus é o Filho de Deus.”

1 João 5:4-5

RESUMO

O diabetes mellitus tipo 1 (DM1) é uma doença auto-imune caracterizada pela destruição das células β das ilhotas produtoras de insulina. É provável que vários fatores genéticos e ambientais contribuam para esse processo. Há evidências crescentes mostrando que os polimorfismos nos genes das citocinas podem desempenhar um papel importante na modificação da resposta imune. A interleucina-18 (IL-18), a interleucina-6 (IL-6) e o receptor da interleucina-6 (IL-6R) foram implicados em várias doenças autoimunes. Além disso, os polimorfismos IL-18 rs1946518, IL-6 rs1800795 e IL-6R rs8192284 podem alterar a expressão destes genes. Neste estudo, esses três polimorfismos foram investigados em 141 pacientes euro-brasileiros com diabetes tipo 1 diagnosticados na fase adulta e 150 controles saudáveis para adultos, utilizando a plataforma TaqMan® e PCR-RFLP. A diferença de frequência genotípica e alélica não foi observada para os polimorfismos nas *IL-18* e *IL-6* testadas. As frequências de alelos raros (IC 95%) em indivíduos com DM1 e grupo controle respectivamente para o polimorfismo do gene IL-18 rs1946518, alelo A 47,7% (40,0-52,0) e 51,0% (45,0-57,0), IL-6 rs 1800795, alelo C 31,1% (26,0-36,0) e 27,05% (22,0-33,0) e IL-6R rs 8192284, alelo C 44,0% (38,0-50,0) e 34,7% (29,0-40,0). A frequência alélica do gene IL-18 rs1946518 foi semelhante à asiática e diferente da população caucasóide. Polimorfismos nos genes IL-18 e IL-6 não parecem estar associados ao DM1 na população brasileira em estudo. No entanto, o polimorfismo no gene IL-6R foi associado com DM1 no presente estudo. Em conclusão, estes resultados sugerem que o alelo C do polimorfismo rs8192284 pode conferir uma susceptibilidade ao DM1.

Palavras-chave: início adulto DM1; polimorfismos; citocinas

ABSTRACT

Type 1 diabetes mellitus is an autoimmune disease characterized by the destruction of the insulin-producing islet β cells. It is likely that several genetic and environmental factors contribute to this process. There is increasing evidence showing that polymorphisms in cytokine genes may play an important role in modifying the immune response. Interleukin-18 (IL-18), Interleukin-6 (IL-6) and Interleukin-6 receptor (IL-6R) have been implicated in a number of immune-mediated diseases. Further, the polymorphisms IL-18 rs1946518, IL-6 rs1800795 and IL-6R rs8192284 may alter the expression of these genes. In this study, these three polymorphisms were investigated in 141 Euro-Brazilian patients with adult onset type 1 diabetes and 150 adult healthy control using the ® TaqMan platform and PCR-RFLP for genotyping. The genotypic and allelic frequency difference was not observed for the polymorphisms in the tested *IL-18* and *IL-6*. The frequencies of rare alleles (95% CI) in individuals with T1D and control group respectively for the polymorphisms of the *IL-18* rs1946518 A allele 47.7% (40.0-52.0) and 51.0% (45.0-57.0), IL-6 rs 1800795 C allele 31.1% (26.0-36.0) and 27.05% (22.0-33.0) and IL-6R rs 8192284 C allele 44.0% (38.0-50.0) and 34.7% (29.0-40.0). IL-18 rs1946518 A allele frequency was similar to Asiatic and different from Caucasoid population. Polymorphisms in the *IL-18* and *IL-6* genes do not appear to be associated with DM1 in the Brazilian population. However, the polymorphism in the *IL-6R* gene was associated with T1D in the present study. In conclusion, these results suggest that the C allele of the rs8192284 polymorphism may confer a susceptibility to T1D.

Keywords: adult onset T1D, polymorphisms, cytokines

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – FATORES CONTRIBUINTES E PROGRESSÃO PARA O DM1.....	24
FIGURA 2 – DISTRIBUIÇÃO GLOBAL DO DIABETES	25
FIGURA 3 – A IMUNOPATOGENESE DO DM1	29
FIGURA 4 – DESAFIOS PARA O MODELO EISENBARTH DA HISTÓRIA NATURAL DO DM1	31
FIGURA 5–PRODUÇÃO DE IL-18.....	36
FIGURA 6 - LOCALIZAÇÃO E ORGANIZAÇÃO GENÔMICA DO GENE <i>IL-18</i>	39
FIGURA 7 – LIGAÇÃO ENTRE IL-6 E IL-6R.....	42
FIGURA 8 – TIPOS DE SINALIZAÇÃO DA IL-6	44
FIGURA 9 – LOCALIZAÇÃO E ORGANIZAÇÃO GENÔMICA DO GENE <i>IL-6</i> E REPRESENTAÇÃO ESQUMÁTICA DA REGIÃO 5' QUE FLANQUEIA O GENE.....	46
FIGURA 10 – LOCALIZAÇÃO E ORGANIZAÇÃO GENÔMICA DO GENE <i>IL-6RE</i> ESTRUTURA DO <i>LOCUS</i> GÊNICO.....	47
FIGURA 11 – FLUXOGRAMA DE TRABALHO.....	50
FIGURA 12 – MAPA DE RESTRIÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS GENÓTIPOS OBTIDOS PELA DIGESTÃO COM A ENZIMA Hsp92 II PARA O POLIMORFISMO <i>RS1800795</i>	68
FIGURA 13 - PERFIL ELETROFORÉTICO DOS PRODUTOS DE RESTRIÇÃO PARA O POLIMORFISMO <i>RS1800795</i> DO GENE <i>IL-6</i>	69
FIGURA 14– MAPA DE RESTRIÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS GENÓTIPOS OBTIDOS PELA DIGESTÃO COM A ENZIMA HIND III PARA O POLIMORFISMO <i>RS8192284</i>	72
FIGURA 15 - PERFIL ELETROFORÉTICO DOS PRODUTOS DE RESTRIÇÃO PARA O POLIMORFISMO <i>RS8192284</i> DO GENE <i>IL-6R</i>	73

LISTA DE TABELAS

TABELA 1- CARACTERÍSTICAS DA METODOLOGIA EMPREGADA PARA A QUANTIFICAÇÃO DOS BIOMARCADORES EM ESTUDO	52
TABELA 2 - CARACTERIZAÇÃO DOS POLIMORFISMOS EM ESTUDO	54
TABELA 3 - PROTOCOLO PARA TÉCNICA TAQMAN®	55
TABELA 4 - CONDIÇÕES PARA A REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE DA REGIÃO POLIMÓRFICA DO GENE <i>IL-6</i> RS1900795 E GENE <i>IL-6R</i> RS8192284	56
TABELA 5 - PROTOCOLO PARA A REAÇÃO DE RESTRIÇÃO E DETECÇÃO DOS POLIMORFISMOS DOS GENES <i>IL-6</i> E <i>IL-6R</i>	57
TABELA 6 - CARACTERIZAÇÃO DOS GRUPOS	59
TABELA 7 – CONCENTRAÇÕES SÉRICAS DE PARÂMETROS BIOQUÍMICOS PARA OS GRUPOS EM ESTUDO	61
TABELA 8 - FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS DO POLIMORFISMO RS1946518 DO GENE <i>IL-18</i> , NA AMOSTRA EM ESTUDO	65
TABELA 9 - COMPARAÇÕES ENTRE FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS DO POLIMORFISMO RS1946518 DO GENE <i>IL-18</i> COM DADOS DA LITERATURA.....	67
TABELA 10 - FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS DO POLIMORFISMO RS1800795 DO GENE <i>IL-6</i> , NA AMOSTRA EM ESTUDO.....	70
TABELA 11 - COMPARAÇÕES ENTRE FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS DO POLIMORFISMO RS1800795 DO GENE <i>IL-6</i> COM DADOS DA LITERATURA	71
TABELA 12 - FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS DO POLIMORFISMO RS8192284 DO GENE <i>IL-6R</i> , NA AMOSTRA EM ESTUDO	74
TABELA 13 - COMPARAÇÕES ENTRE FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS DO POLIMORFISMO RS8192284 DO GENE <i>IL-6R</i> COM DADOS DA LITERATURA	76

LISTA DE QUADROS

QUADRO1 – CRITÉRIOS PARA DIAGNÓSTICO DE DM	21
--	----

LISTA DE ANEXOS

ANEXO 1	TERMO DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA	99
ANEXO 2	TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	101
ANEXO 3	QUESTIONÁRIO APLICADO AOS PARTICIPANTES DA PESQUISA	103
ANEXO 4	PCR EM TEMPO REAL PARA O GENE <i>IL-18</i>	104

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

1,5 AG	-	1,5 anidroglicitol
ADA	-	<i>American Diabetes Association</i> - Associação Americana de Diabetes
AGES	-	<i>Advanced glycation end products</i> - Produtos finais de glicação avançada
AVC	-	Acidente vascular cerebral
CAD	-	Cetoacidose diabética
CEP	-	Comitê de ética e pesquisa
CTRL	-	Controle
DAC	-	Doença arterial crônica
DCCT	-	<i>Diabetes Control and Complication Trial</i> – Estudo sobre o controle de diabetes e complicações
DNA	-	<i>Desoxyribonucleic acid</i> - Ácido desoxirribonucleico
DM	-	<i>Diabetes Mellitus</i>
DM1A	-	<i>Diabetes Mellitus</i> tipo 1 auto imune
DM1B	-	<i>Diabetes Mellitus</i> tipo 1 idiopática
DM2	-	<i>Diabetes Mellitus</i> tipo 2
DMG	-	<i>Diabetes Mellitus</i> gestacional
EDTA	-	Ácido Etilenodiamino Tetra-acético
FDA	-	<i>Food and Drug Administration</i> – Órgão Americano Governamental responsável pelo controle de alimentos e medicamento
GP130	-	Glicoproteína 130
HbA1c	-	Hemoglobina Glicada
HDL-C	-	HDL-colesterol - <i>High Density Lipoprotein - Cholesterol</i> – Lipoproteína de densidade alta
HLA	-	Antígeno leucocitário humano
H-W	-	Equilíbrio de Hardy-Weinberg
IAA	-	<i>Insulin autoantibodies</i> – Autoanticorpos anti-insulina
IA2A	-	<i>Insulinoma-associated autoantigen 2</i>
ICA	-	Auto anticorpo anti-ilhotas de Langerhans citoplasmático
IDF	-	<i>Internacional Diabetes Federation</i>

IL-6	-	Interleucina 6
IL-6R	-	Receptor Interleucina 6
IL-12	-	Interleucina 12
IL-13	-	Interleucina 13
IL-14	-	Interleucina 14
IL-18	-	Interleucina 18
INF- γ	-	<i>Interferon-γ</i> – Interferon gama
INS	-	<i>Insulin gene</i> – Gene da insulina humana
IMC	-	Índice de massa corporal
LADA	-	Diabetes autoimune latente em adultos
LDL-C	-	LDL – colesterol – <i>Low density lipoprotein</i> – <i>Cholesterol</i> – Lipoproteína de baixa densidade
LPS	-	Lipopolissacarídeo
MODY	-	<i>Maturity on set diabetes of the Young</i> – Diabetes da maturidade de início precoce
mRNA	-	RNA mensageiro
NGSP	-	<i>National Glycohemoglobin Standardization Program</i> – Programa Nacional para padronização da hemoglobina glicada
OMIM	-	<i>MendelianInheritance in Man</i> ; Herança Mendeliana no Homem Online
OMS	-	Organização Mundial da Saúde
P	-	Probabilidade
PCR	-	<i>Polymerase Chain Reaction</i> ; Reação em cadeia da polimerase
Primers	-	Oligonucleotídeos iniciadores
RFLP	-	<i>RestrictionFragmentLengthPolymorphism</i> ; Polimorfismo no Comprimento do Fragmento de Restrição
rs	-	<i>Reference Sequence</i> - Identificação dos Polimorfismos de único nucleotídeo
SBD	-	Sociedade Brasileira de Diabetes
SEMPR	-	Serviço de Endocrinologia e Metabologia do Hospital das Clínicas da UFPR
sIL-6	-	Interleucina 6 solúvel
SNP	-	<i>Single Nucleotide Polymorphisms</i> ; Polimorfismos de único nucleotídeo

T CD4 ⁺	-	Linfócito T auxiliar CD4 ⁺
T CD8 ⁺	-	Linfócito T citotóxico CD8 ⁺
TCLE	-	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TFG	-	Taxa de filtração glomerular
TNF- α	-	<i>Tumoral Necrose Factor α</i> – Fator de necrose tumoral α
TOTG	-	Teste oral de tolerância à glicose
UFPR	-	Universidade Federal do Paraná
WHO	-	<i>World Health Organization</i> – Organização Mundial de Saúde
ZNT8	-	<i>Zinc Transporter 8</i> – Transportador de zinco 8

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
1.2	OBJETIVOS	19
1.2.1	Objetivo geral	19
1.2.2	Objetivos específicos.....	19
2	REVISÃO DE literatura.....	20
2.2.2.	DIABETES <i>MELLITUS</i>	20
2.1.1	<i>Diabetes Mellitus</i> tipo 1A.....	25
2.2.3.	GENE <i>IL-18</i>	34
2.2.4.	GENE <i>IL-6</i> e <i>IL-6R</i>	40
3	MATERIAL E MÉTODOS	50
3.1.	FLUXOGRAMA DE TRABALHO	50
3.2.	AMOSTRAS	50
3.2.1.	CRITÉRIOS PARA A CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA	51
3.3.	DOSAGENS BIOQUÍMICAS	52
3.4.	EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DO DNA GENÔMICO	53
3.5.	GENOTIPAGEM DOS POLIMORFISMOS.....	53
3.6.	ANÁLISES ESTATÍSTICAS	57
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	59
4.1.	CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS	59
4.2.	ANÁLISES BIOQUÍMICAS	61
4.3.	ANÁLISES MOLECULARES.....	64
4.3.1	Gene <i>IL-18</i> – rs1946518.....	65
4.3.2	Gene <i>IL-6</i> - rs1800795	69
4.3.3	Gene <i>IL-6R</i> - rs8192284	73
5.	CONCLUSÕES	77
	REFERENCIAS.....	78
	ANEXO 1 - TERMO DE APROVAÇÃO DO COMITE DE ÉTICA.....	100
	ANEXO 2 - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE) ASSINADO PELOS PARTICIPANTES DA PESQUISA.....	101
	ANEXO 3 - QUESTIONÁRIO APLICADO AOS INDIVÍDUOS PARTICIPANTES DA PESQUISA.....	103
	ANEXO 4 - PCR EM TEMPO REAL PARA O GENE <i>IL-18</i>	104

1 INTRODUÇÃO

O *Diabetes Mellitus* (DM) é um grupo heterogêneo de doenças metabólicas que está associada ao aumento de mortalidade e ao alto risco de desenvolvimento de complicações micro e macrovasculares. Estima-se que a população mundial com diabetes seja de 425 milhões e até 2045 esse número aumente para 629 milhões (IDF, 2017b).

O DM é considerado uma doença complexa com a principal característica de hiperglicemia resultante de defeitos na secreção de insulina, na ação ou em ambos (SBD, 2016). O *Diabetes mellitus* Tipo 1 (DM1) corresponde a cerca de 5% a 10% dos casos de DM no mundo (AMERICAN DIABETES, 2016) e é uma doença autoimune caracterizada pela destruição progressiva das células β pancreáticas, e na maioria dos casos leva a absoluta deficiência de insulina (ATKINSON, 2012).

A patogenia do DM1 desenvolve-se a partir de uma combinação de predisposição genética, associada a fatores ambientais desconhecidos e eventos aleatórios (COSTENBADER *et al.*, 2007). Esses fatores ambientais podem interagir com determinantes genéticos que influenciam o desenvolvimento da doença. Indivíduos geneticamente susceptíveis ao DM1, quando entram em contato com um gatilho ambiental, darão início ao processo autoimune (CHATENOUD; BLUESTONE, 2007).

Há diversas terapias convencionais eficazes no tratamento do DM, porém uma melhor compreensão da patogênese pode auxiliar na identificação de potenciais biomarcadores e no desenvolvimento de novas terapias. Estudos que envolvem as variações genéticas associadas ao DM com enfoque em polimorfismos genéticos, podem contribuir na identificação do mecanismo de susceptibilidade ou proteção para o desenvolvimento da doença (ALIZADEH; KOELEMAN, 2008)

Polimorfismos associados ao DM1 têm sido encontrados em diversos genes que estão relacionados com o sistema imune e podem causar uma predisposição à uma resposta imune ou inflamatória, aumentando potencialmente o risco de autoimunidade (ATKINSON; EISENBARTH; MICHELS, 2014). Tem sido sugerido que a imunidade mediada por citocinas desempenham um papel crucial na patogênese de várias doenças autoimunes, como o DM1, devido a isso,

interleucinas 18 (IL-18) e 6 (IL-6), bem como o receptor de interleucina 6 (IL-6R) foram o foco do presente estudo.

2.2.1. OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

Estudar as variações genéticas dos genes *IL-18*, *IL-6* e *IL-6R* e buscar associação com *Diabetes Mellitus* tipo 1 (DM1) em uma população brasileira adulta.

1.1.2 Objetivos específicos

- Selecionar e coletar amostras de sangue de pacientes que desenvolveram *Diabetes Mellitus* tipo 1 após os 18 anos de idade e indivíduos adultos sem diabetes (controle saudável);
- Genotipar os polimorfismos do gene *IL-18* (rs1946518), *IL-6* (rs1900795) e *IL-6R* (rs8192284) em pacientes com DM1 e no grupo controle;
- Determinar as frequências genotípicas e alélicas dos polimorfismos em estudo;
- Associar as variações genéticas com os marcadores laboratoriais do perfil lipídico, controle glicêmico, função renal e nutricional.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.2.2. DIABETES MELLITUS

O *Diabetes Mellitus* (DM) é caracterizado por uma condição crônica com principal característica de hiperglicemia resultante de defeitos na secreção de insulina, na ação ou em ambos (SBD, 2016). O diabetes é classificado de acordo com a Associação Americana de Diabetes (ADA, 2019) em quatro categorias:

- *Diabetes Mellitus* Tipo 1 (DM1)
- *Diabetes Mellitus* Tipo 2 (DM2)
- *Diabetes Mellitus* Gestacional (DMG)
- Tipos específicos devido a outras causas

O DM1 corresponde a cerca de 5% dos casos de *Diabetes Mellitus* mundial, é caracterizado pela destruição das células beta pancreáticas, e na maioria dos casos leva a absoluta deficiência de insulina. Na maioria dos casos, a destruição das células beta pancreáticas é mediada pela autoimunidade (DM1A), entretanto a casos onde não se encontram evidências de um processo autoimune, sendo relacionada a fatores ambientais ou como forma idiopática (DM1B) (SBD, 2016). Além do fator de autoimunidade, o DM1A pode apresentar associação com determinados genes do sistema leucocitário humano (HLA) (TODD; BELL; MCDEVITT, 1987). Pacientes com DM1B manifestam insulinoopenia permanente e são mais propensos a desenvolverem cetoacidose, nesses casos não há evidências de autoimunidade e associação a haplótipos do sistema HLA (ADA, 2016).

O DM2 está presente na maioria dos casos de diabetes, é caracterizado por resistência periférica a insulina, podendo evoluir para uma deficiência na produção e ação desse hormônio (IDF, 2017b). Esse tipo de diabetes corresponde de 90 a 95% dos casos totais de diabetes, podendo ser diagnosticado em qualquer idade (ADA, 2016).

Tanto no DM1 como no DM2, vários fatores genéticos e ambientais podem resultar na progressiva perda da massa ou função das células β pancreáticas, os quais se manifestam clinicamente como hiperglicemia. Ambos os tipos de diabetes são doenças heterogêneas nas quais a apresentação

clínica e a progressão das doenças podem variar consideravelmente. A classificação é importante para determinar a terapia, contudo alguns indivíduos não podem ser claramente classificados como apresentando DM1 ou DM2 no momento do diagnóstico. Esquemas futuros de classificação provavelmente irão focar na patofisiologia que estão envolvidos na disfunção das células β como indicado *status* glicêmico (SKYLER *et al.*, 2017).

O DMG está associado à diminuição da função das células β pancreáticas e a diminuição da sensibilidade à insulina que é parcialmente explicada pelo aumento na concentração de hormônios diabetogênicos (bloqueiam ou antagonizam a ação da insulina) produzido pela placenta (DI CIANNI *et al.*, 2003) no período gestacional.

Outra categoria de diabetes conhecida como “outras formas específicas de diabetes” inclui formas incomuns de diabetes que podem ocorrer devido a diversas causas, como defeitos genéticos da função das células β pancreáticas (*diabetes onset of the young- MODY*), doenças exócrinas do pâncreas, defeitos genéticos na ação da insulina, indução química ou por drogas, endocrinopatias e infecções. Formas incomuns de diabetes mediados pelo sistema imune e síndromes genéticas associadas ao diabetes em alguns casos (SBD, 2016).

O diabetes pode ser diagnosticado utilizando como critério a glicemia plasmática, tanto pelo valor da glicemia em jejum ou pelo valor da glicemia 2 horas durante o teste de tolerância oral à glicose, como pelo critério da HbA1c (INTERNATIONAL EXPERT, 2009; ADA, 2019) (Quadro 1).

QUADRO1 – CRITÉRIOS PARA DIAGNÓSTICO DE DM

ANALITOS	CONCENTRAÇÕES	OBSERVAÇÕES
HbA1C*	$\geq 6,5\%$	O teste deve ser realizado com método padronizado e certificado pelo NSGP e padronizado pelo ensaio do DCCT.
Glicemia em jejum*	≥ 126 mg/dL	Jejum definido como ausência de ingestão de alimentos calóricos por no mínimo 8 horas.
Glicemia 2 h após 75g de glicose oral*	≥ 200 mg/dL	O teste deve ser realizado como descrito pela OMS utilizando dose oral de glicose contendo o equivalente a 75g de glicose dissolvida em água.
Glicemia ao acaso	≥ 200 mg/dL	Pacientes com sintomas clássicos, hiperglicemia ou crises hiperglicêmicas

*Na ausência de inequívoca hiperglicemia, diagnóstico requer dois resultados anormais na mesma amostra ou em dois testes e amostras separadas.

Fonte: Adaptado de ADA (2019)

Contudo, uma vez que a progressão da disglucemia pode ser rápida em pacientes com DM1, a HbA1c é menos sensível para o diagnóstico do que as dosagens de glicemia em jejum ou glicemia estimulada (ADA, 2019). O início do DM1 pode ser mais variável em adultos, os quais podem não apresentar os sintomas clássicos observados em crianças. Embora definições tradicionais classifiquem o DM1 como o diabetes de início juvenil, a doença pode ocorrer em qualquer idade, com até 50% dos casos ocorrendo na fase adulta (THOMAS *et al.*, 2018).

Até 50% dos adultos com DM1 pode inicialmente ser classificado erroneamente como DM2 (HOPE *et al.*, 2016). Similarmente, devido à epidemia da obesidade em crianças, o DM2 está aumentando de forma comum em adolescentes (particularmente em indivíduos não caucasóides), e o diabetes monogênico (MODY) contribui para 1-6% dos casos de diabetes na infância (PIHOKER *et al.*, 2013; SHEPHERD *et al.*, 2016; DELVECCHIO *et al.*, 2017).

Embora baixas concentrações de peptídeo C como marcador de severa deficiência endógena de insulina seja útil para guiar a classificação e o tratamento de casos de DM avaliado ao longo de 3 anos após o diagnóstico clínico (JONES; HATTERSLEY, 2013), nenhuma característica clínica única pode perfeitamente distinguir DM1 e diabetes não DM1 no diagnóstico. A classificação depende da apreciação de outros fatores de risco para o DM1 em relação a outros subtipos e a integração das características clínicas (como por exemplo, idade de diagnóstico e índice de massa corporal) com biomarcadores (por exemplo, auto-anticorpos pancreáticos) (BARNETT, 2018).

Mais de 90% dos portadores de DM1 apresentam anticorpos mensuráveis contra proteínas específicas das células β , incluindo insulina, glutamato descarboxilase, antígeno 2 de ilhotas, transportador de zinco (HOPE *et al.*, 2016), e tetraspanina-7 (MCLAUGHLIN *et al.*, 2016). Estudos de coorte de nascimentos (ZIEGLER *et al.*, 2013; KRISCHER *et al.*, 2015) de indivíduos com alto risco para DM mostraram um pico de incidência para o desenvolvimento do primeiro auto-anticorpo antes dos dois anos de idade. A maioria das pessoas com um único anticorpo não progredem para o DM1, mas soro conversão para presença de dois ou mais auto-anticorpos em crianças está associado à 84% de risco para o DM1 clínico até a idade de 18 anos (Figura 1A) (ZIEGLER *et al.*, 2013). O alto risco de progressão na presença de

múltiplos auto-anticorpos tem levado à definição dos estágios do DM1. Neste novo paradigma, um estágio pré-clínico é definido com a presença de 2 ou mais auto-anticorpos, enquanto que os estágios 2 e 3 são definidos como a progressão de anormalidades metabólicas de glicemia anormal para diabetes manifesto, diagnosticado por critério padrão (Figura 1B) (INSEL *et al.*, 2015). Uma vez que a progressão da positividade para auto-anticorpos de ilhotas para o DM clínico pode levar meses ou anos, a definição da positividade de múltiplos auto-anticorpos como o estágio 1 permite direcionar intervenções imunes para um desfecho primário realista e facilita estudos de intervenção no início da vida (ZIEGLER *et al.*, 2016).

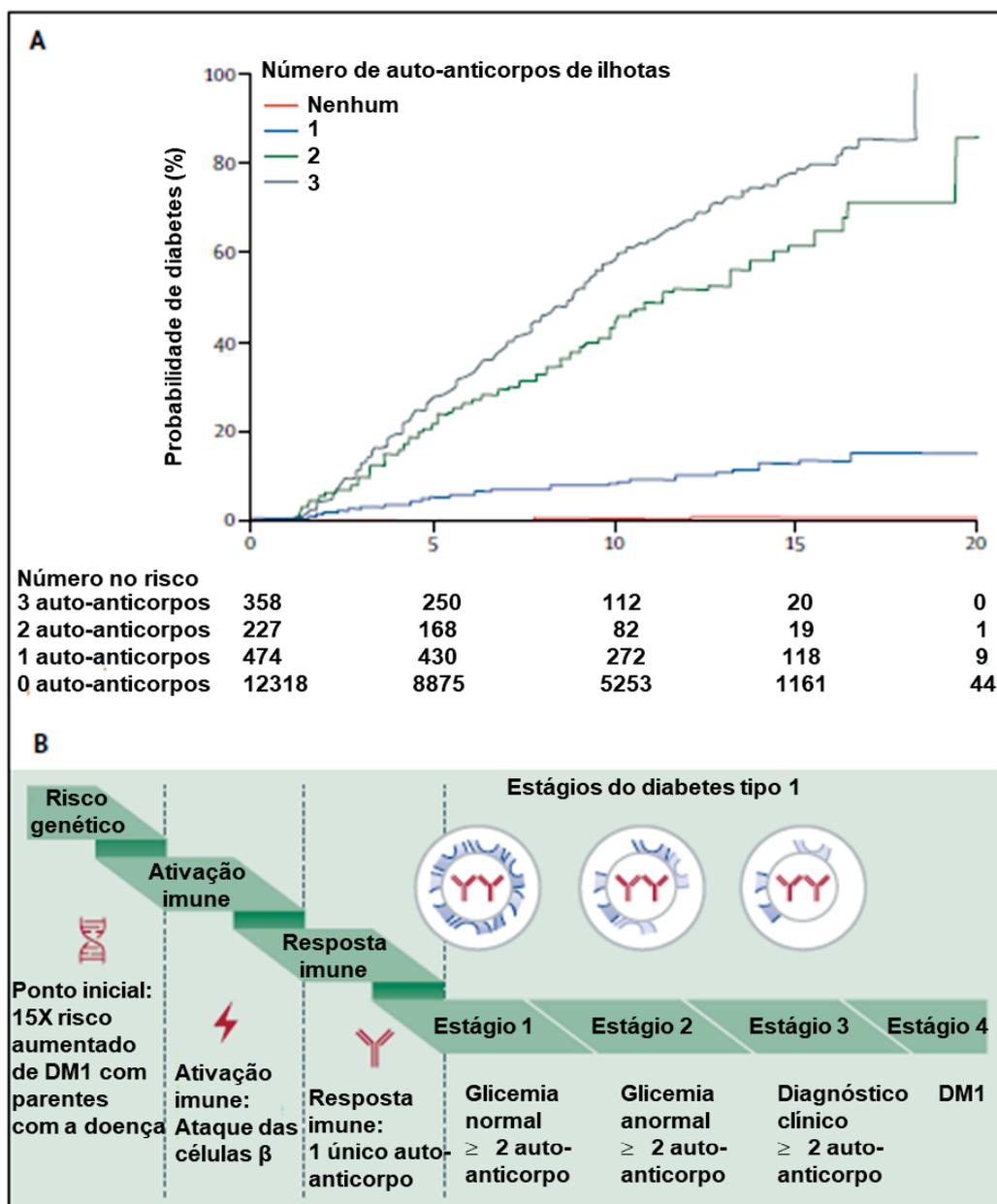
Estima-se que 425 milhões de pessoas no mundo ou 8,8% dos adultos entre 20 e 79 anos, tenham DM e que até 2045 esse número possa aumentar em 63%. A Figura 2 ilustra a distribuição de DM entre os continentes (IDF, 2017a). O Brasil é o país da América Central e do Sul que apresenta o maior número de indivíduos com DM. No Brasil, a doença leva a óbito aproximadamente 72 mil pessoas por ano, representando 6% de todas as mortes no país (WHO, 2016).

O Diabetes já é considerado como umas das maiores emergências de saúde mundial do século 21 (IDF, 2017b). A prevalência global vem aumentando nos últimos anos e os diabéticos apresentam um maior risco de morbidade e mortalidade em comparação à população geral (OGURTSOVA *et al.*, 2017).

Em países de alta renda, estima-se que aproximadamente 87% a 91% de todos os diabéticos tenham diabetes tipo 2, 7% a 12% tenham DM1 e 1% a 3% tenham outros tipos de diabetes (BOYLE *et al.*, 1999; EVANS *et al.*, 2000; BRUNO *et al.*, 2005; HOLMAN; YOUNG; GADSBY, 2015).

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).

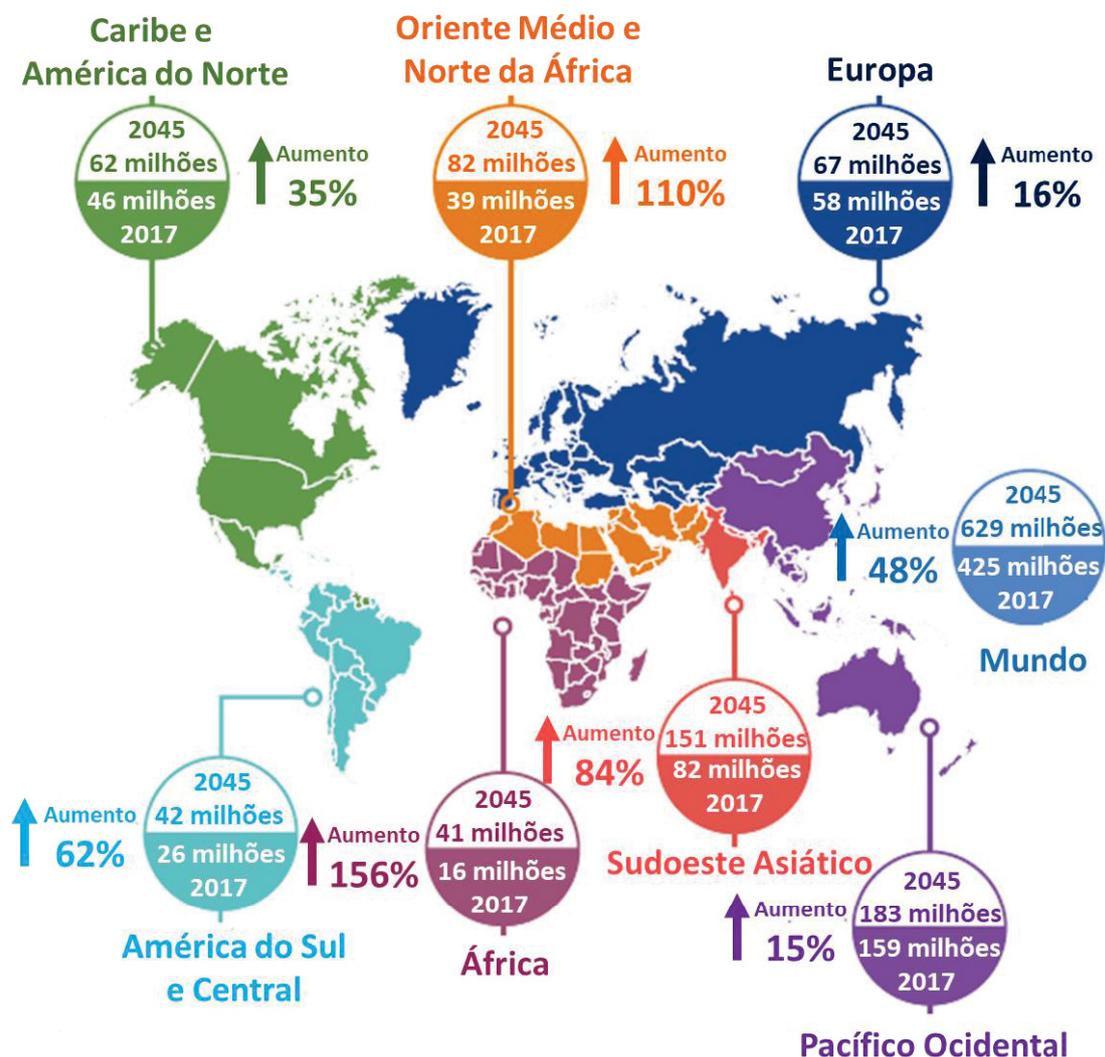
FIGURA 1 – FATORES CONTRIBUINTE E PROGRESSÃO PARA O DM1



Painel A. A probabilidade do desenvolvimento do diabetes em crianças estratificadas pelo número de auto-anticorpos de ilhotas. Estudo de acompanhamento regular de 13.377 crianças identificadas com apresentando risco ao nascer ou no período da infância com base nos genótipos de alto risco de HLA ou no fato de possuírem parentes com DM1, ou ambos (ZIEGLER *et al.*, 2013). **Painel B.** Progressão do diabetes tipo 1 e estágios da doença. Estágio 1 é o início da doença, marcado por indivíduos apresentando dois ou mais auto-anticorpos relacionados ao DM e concentrações normais de glicemia plasmática. No estágio 2, os indivíduos apresentam disglucemia sem sintomas. Estágio 3 é o momento do diagnóstico clínico. DM1: *Diabetes mellitus* tipo 1.

Fonte: Adaptado de DiMeglio, Evans-Molina e Oram(2018)

FIGURA 2 – DISTRIBUIÇÃO GLOBAL DO DIABETES



Número de pessoas com diabetes por região em 2017 e 2045 ente 20 e 79 anos.
 Fonte: Adaptado de *Internacional Diabetes Federation – IDF (2017a)*

Não estão totalmente elucidadas as razões para o aumento dos casos de DM1, mas pesquisadores atribuem a mudanças no ambiente e/ou estilo de vida (LONG *et al.*, 2012).

2.1.1 *Diabetes Mellitus* tipo 1A

A patogênese do *Diabetes Mellitus* tipo 1A (DM1A) resulta de uma complexa interação entre as células β pancreáticas e os sistemas imunes inato e adaptativo (HULL; PEAKMAN; TREE, 2017). A questão da existência de um gatilho para a resposta imune contra as células β ou da resposta imune ser um

evento estocástico aleatório tem sido um assunto de especulação e controvérsia consideráveis. Várias infecções virais têm sido associadas ao DM1, com enterovírus sendo o mais comumente associado às infecções. A proteína principal do capsídeo VP1 e RNA enteroviral têm sido detectados nas ilhotas de pessoas com início recente de DM1 (KROGVOLD; EDWIN; *et al.*, 2015), juntamente com a hiperexpressão do complexo de histocompatibilidade principal de classe 1 (RICHARDSON *et al.*, 2016), um outro índice de infecção viral. Uma possibilidade é que algumas pessoas com DM1 apresentem uma infecção crônica viral atípica das células β pancreáticas, resultando na inflamação crônica e desenvolvimento da auto-imunidade.

Um avanço importante proveniente de estudos de pâncreas humanos de pacientes com DM1 foi a descrição da insulinite, um processo de infiltração de células imunes nas ilhotas (IN'T VELD *et al.*, 2010). A insulinite ocorre principalmente em ilhotas que contêm insulina residual em pessoas com início recente de DM1 e em poucas ilhotas deficientes de insulina estão inflamadas (FOULIS; STEWART, 1984; FOULIS *et al.*, 1986; WILLCOX *et al.*, 2009; CAMPBELL-THOMPSON *et al.*, 2016). Isto implica que as células imunes são recrutadas e retidas primariamente em resposta a fatores que emanam das células β alvo, embora a proporção de ilhotas inflamadas varie, não simplesmente em resposta a proporção ao número de células, mas também de acordo com a idade de início da doença. Por exemplo, em indivíduos diagnosticados com idades de 13 anos ou idades superiores, a proporção de ilhotas contendo insulina residual é aproximadamente 25%, enquanto é muito maior (~80%) nos diagnosticados no início da vida (<7 anos de idade) (MORGAN, 2017). Esta estatística sugere que crianças jovens podem ter uma forma mais agressiva da doença. Outra implicação é que, entre os indivíduos mais velhos, a deficiência funcional de insulina pode ocorrer apesar da retenção de uma reserva significativa do hormônio. Isto aponta não apenas para a perda de células beta como causa de DM1, mas também sugere uma disfunção secretora de insulina entre as ilhotas residuais não inflamadas em alguns indivíduos. Estas conclusões são suportadas por estudos *in vitro* que mostram ilhotas de pessoas com diabetes tipo 1 com déficit na secreção de insulina induzida por glicose imediatamente após serem isoladas podem melhorar com o tempo em cultura (KROGVOLD; SKOG; *et al.*, 2015). A

ocorrência da insulinite não é restrita apenas no período imediatamente após o início da doença, mas pode também ser encontrado em ilhotas contendo insulina de indivíduos com duração longa da doença (CAMPBELL-THOMPSON *et al.*, 2016). Em contraste, é menos claro quanto tempo antes do diagnóstico a insulinite ocorre em pessoas que estão progredindo para a doença.

Trabalhos com camundongos diabéticos não obesos (*Non-obese diabetic* - NOD) sugerem a existência de estágios sequenciais da insulinite, entre um dos quais conhecido como peri-insulinite (ANDERSON; BLUESTONE, 2005) no qual as ilhotas são envolvidas por células imunes mas não infiltradas por elas. Esta fase é seguida por completa infiltração, na qual as ilhotas são invadidas e a morte das células β ocorre em alta frequência. Estágios não são observados em humanos e insulite invasiva raramente é detectada. Isto sugere que em humanos, ou a morte das células β é mediada por apenas um número muito pequeno de células imunes (presumivelmente $CD8^+$) que penetram no interior celular endócrino ou, alternativamente, a morte não requer contato direto entre células imunes e células β . Uma terceira possibilidade também existe, na qual as células imunes possuem apenas papel menor (no máximo) na morte das células β . Neste contexto, evidências recentes implicam que muitas das células $CD8^+$ presentes nas lesões insulíticas são células residentes de memória, desprovidas de assinatura de expressão gênica pró-inflamatória (KURIC *et al.*, 2017). No entanto, também é claro que alguns tipos de células T $CD8^+$ importantes são reativas contra antígenos de ilhotas, sugerindo uma intenção agressiva (COPPIETERS *et al.*, 2012; BABON *et al.*, 2016; CULINA *et al.*, 2018).

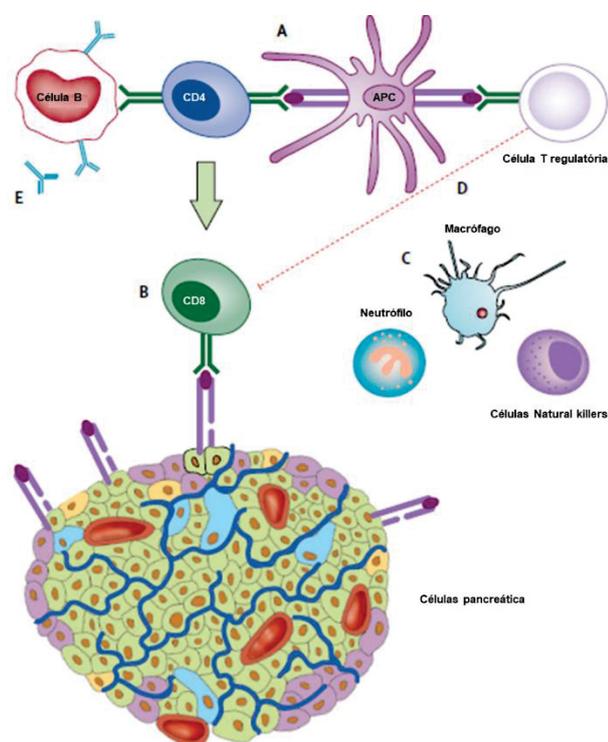
Acredita-se que o desenvolvimento do DM1 (Figura 3) inicia pela apresentação de peptídeos das células β pelas células apresentadoras de antígenos (*antigen-presenting cell*– APCs). As APCs carregando estes auto-antígenos migram para os nódulos linfáticos pancreáticos onde interagem com linfócitos T $CD4^+$ auto-reativos, os quais por sua vez medeiam a ativação dos linfócitos T $CD8^+$ auto-reativos (A). Estes linfócitos T $CD8^+$ ativados retornam para a ilhota e lisam as células β que expressam os auto-antígenos imunogênicos nas moléculas de superfície de classe I do complexo de histocompatibilidade principal (B). A destruição das células β é posteriormente exacerbada pela liberação de citocinas pró-inflamatórias e espécies reativas de

oxigênio das células imunes inatas (macrófagos, células *natural killers*, e neutrófilos (C)). O processo inteiro é amplificado por defeitos nos linfócitos T regulatórios, os quais não suprimem efetivamente a auto-imunidade (D). Células T ativadas no interior dos nódulos linfáticos pancreáticos também estimulam a produção de auto-anticorpos contra as proteínas das células β . Estes auto-anticorpos podem ser dosados na circulação e são considerados biomarcadores que definem o DM1(E).

A destruição autoimune das células β pancreáticas tem múltiplas predisposições genéticas e também está relacionada a fatores ambientais que ainda não estão bem definidos. Pacientes com DM1 são propensos a distúrbios auto-imunes, como tireóide de Hashimoto, doença de Addison, doença celíaca, vitiligo, hepatite autoimune e anemia (ADA, 2016).

A patogenia do DM1A representa a ação recíproca de susceptibilidade genética e dos fatores ambientais (COSTENBADER *et al.*, 2012). Uma grande importância na determinação do risco de diabetes é a hereditariedade. O risco de diabetes em tempo de vida entre parentes de primeiro grau de indivíduos diabéticos é de cerca de 6%. Estudos realizados entre gêmeos monozigóticos revelaram concordância para a doença em cerca de 50% dos casos, sugerindo uma contribuição das variáveis não genéticas (POCIOT; LERNMARK, 2016).

FIGURA 3 – A IMUNOPATOGENESE DO DM1



As APCs carregando estes auto-antígenos das células β migram para os nódulos linfáticos pancreáticos onde interagem com linfócitos T $CD4^+$ auto-reativos, os quais por sua vez medeiam a ativação dos linfócitos T $CD8^+$ auto-reativos (A). Estes linfócitos T $CD8^+$ ativados retornam para a ilhota e lisam as células β que expressam os auto-antígenos imunogênicos nas moléculas de superfície de classe I do complexo de histocompatibilidade principal (B). A destruição das células β é posteriormente exacerbada pela liberação de citocinas pró-inflamatórias e espécies reativas de oxigênio das células imunes inatas (macrófagos, células natural killers, e neutrófilos) (C). O processo inteiro é amplificado por defeitos nos linfócitos T regulatórios, os quais não suprimem efetivamente a auto-imunidade (D). Células T ativadas no interior dos nódulos linfáticos pancreáticos também estimulam a produção de auto-anticorpos contra as proteínas das células β . Estes auto-anticorpos podem ser dosados na circulação e são considerados biomarcadores que definem o DM1 (E). APCs: células apresentadoras de antígenos (*antigen-presenting cell*).

Fonte: Adaptado de DiMeglio, Evans-Molina e Oram(2018)

A importância dos determinantes ambientais do risco de doença é ainda apoiada pela variação sazonal na incidência da doença. Portanto, o surgimento do DM1 provavelmente depende de fatores ambientais que interagem com genes predisponentes para induzir um ataque contra as células β pancreáticas (OP DE BEECK; EIZIRIK, 2016).

Diversos agentes ambientais têm sido sugeridos para contribuir para o risco de desenvolver DM1. Estes incluem infecções virais, particularmente por

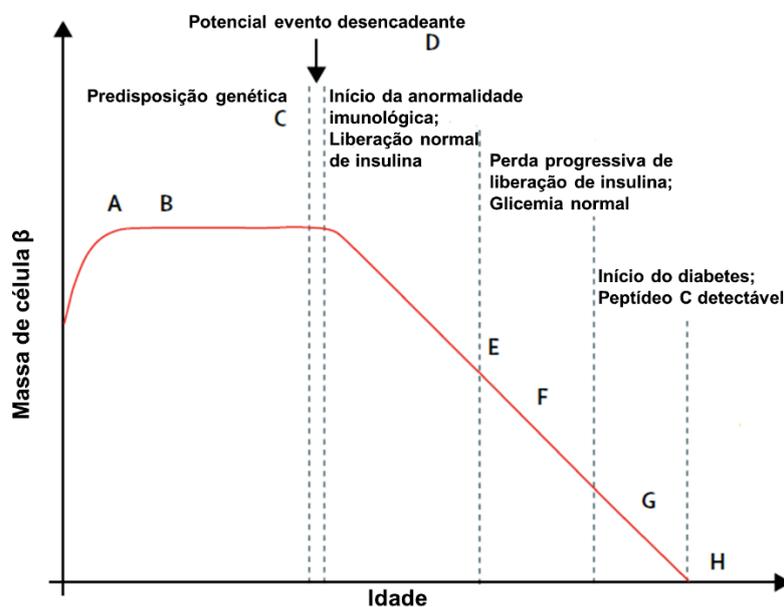
enterovírus, fatores dietéticos na infância, vacinação, influências climáticas, toxinas e estresse (KNIP *et al.*, 2002). Sugere-se que os fatores ambientais desencadeiam o desenvolvimento da doença em indivíduos que sejam geneticamente suscetíveis. Porém, há estudos que sugerem que o fato de uma exposição a múltiplos fatores ambientais ao longo da vida, influenciaria a expressão da desregulação imunológica geneticamente determinada (KELLY *et al.*, 2003). Os desencadeantes ambientais que iniciam a destruição de células β pancreáticas permanecem em grande parte desconhecidos, mas o processo geralmente começa meses a anos antes da manifestação de sintomas clínicos (VERGE *et al.*, 1996; SKYLER *et al.*, 2005; ZIEGLER *et al.*, 2013). Indivíduos geneticamente susceptíveis ao DM1, quando entrarem em contato com um gatilho ambiental, darão início ao processo autoimune, desencadeando uma queda linear da massa de células, desenvolvendo auto-anticorpos e hiperglicemia (CHATENOUD; BLUESTONE, 2007).

Em 1984, George Eisenbarth (1984) desenvolveu um modelo conceitual para a patogênese do DM1 que ainda está em uso nos dias de hoje (Figura 4). O modelo plota a massa das células β pancreáticas contra a idade, destacando uma sequência de eventos, iniciando com risco genético predisponente, então um gatilho ambiental precipitante que causa autoimunidade específica de ilhotas, seguido por perda de células β , disglícemia, diabetes clínico e rápida progressão para perda completa das células β . Embora útil, este modelo não aborda a complexidade cada vez mais aparente da patogênese do diabetes tipo 1. Além disso, a patogênese da doença é mostrada por uma única linha de curso da doença ao longo do tempo; entretanto, em todos os estágios da doença existe heterogeneidade que não é bem compreendida (DIMEGLIO; EVANS-MOLINA; ORAM, 2018).

Os desafios para o modelo de George Eisenbarth (1984), levando-se em conta a complexidade do DM1, incluem o seguinte: eventos imunes precipitantes que possam ocorrer na fase pré-natal (A); a grande variação no início da função ou massa de células β , os defeitos em um ou ambos poderiam estar programados no desenvolvimento (B); o início da auto-imunidade é mediada pelos auto-anticorpos, mas outras anormalidades imunes que provavelmente precedem a presença detectável de anticorpos pancreáticos (C); o ambiente do paciente poderia afetar o curso inteiro da doença (D); a

perda de células β pode recair ou remitir (E); a disglucemia ocorre antes do diagnóstico clínico (F); o declínio na função das células β pode não refletir o declínio da massa de células β - métodos para medir a massa de células β não foram estabelecidos (G); e o peptídeo C residual é detectável em muitas pessoas que têm longa duração diabetes tipo 1 (H). Além disso, a progressão através dos estágios A – C é heterogêneo, e será afetado por características imunes, genéticas, ambientais e demográficas (por exemplo, idade, índice de massa corpórea) (DIMEGLIO; EVANS-MOLINA; ORAM, 2018).

FIGURA 4 – DESAFIOS PARA O MODELO EISENBARTH DA HISTÓRIA NATURAL DO DM1



Eventos chave do modelo de Eisenbarth no decorrer do curso da doença (mensurados em anos) são mostrados por linhas pontilhadas em diferentes pontos do tempo.
Fonte: Adaptado de DiMeglio, Evans-Molina e Oram(2018).

Uma questão chave que é levantada quanto ao mecanismo pelo qual as células imunes possam atingir as ilhotas, é a natureza dos quimioatratores. Tem se assumido que as ilhotas são induzidas a secretar quimiocinas durante a fase inicial da destruição das células β e que então células imunes relevantes migram para a fonte destas moléculas. Isto tem sido suportado pelo fato de que várias quimiocinas têm sido detectadas nas ilhotas inflamadas (SARKAR *et al.*, 2012). Sabe-se que as células β podem produzir diretamente certas citocinas, incluindo IL-1 β (REDDY, S. *et al.*, 2018), a qual pode exercer papel na mediação de sua morte.

Mediadores inflamatórios, tais como as citocinas e quimiocinas, estão implicadas na patogênese de muitas doenças auto-imunes, incluindo DM1 (ROTONDI *et al.*, 2007; KIM; MOUDGIL, 2008).

2.2. Polimorfismos associados ao *Diabetes Mellitus* tipo 1

Estudos de associação ampla do genoma (*Genome-Wide Association Studies*– GWAS) identificaram mais de 60 regiões de susceptibilidade para o DM1, os quais são marcadamente polimorfismo de nucleotídeo único (*Single-Nucleotide Polymorphisms*- SNPs) (RAM; MORAHAN, 2017). A principal hereditabilidade de risco para o DM1 (~50%) é conferida por polimorfismos localizados na região do antígeno leucocitário humano (*Human Leukocyte Antigen*- HLA)(OUNISSI-BENKALHA; POLYCHRONAKOS, 2008).

O risco genético remanescente para o DM1 pode ser atribuído à aproximadamente 50 genes não HLA ou loci identificados via abordagem de genes candidatos e GWAs, sendo cada um com efeitos modestos a pequenos no risco da doença. A contribuição genética não HLA pode ocorrer através da regulação imune (POCIOT; MCDERMOTT, 2002), embora a recente demonstração da expressão gênica comum e *splicing* alternativos de vários destes produtos gênicos nas ilhotas pancreáticas estimuladas por citocinas, tenha levantado questões se alguns destes genes possam em parte atuar nas células β pancreáticas (SANTIN; EIZIRIK, 2013).

A variação genética provavelmente influencia tanto a regulação imunológica quanto a resposta do hospedeiro às etiologias ambientais, que determinam a suscetibilidade inicial e progressão da doença de um indivíduo através de pontos de checagem homeostáticos sequenciais antes do início da doença sintomática (INSEL *et al.*, 2015). De fato, diferentemente dos genes HLA de suscetibilidade ao DM1 que parecem ter um efeito limitado na taxa de progressão para doença sintomática após o início da auto-imunidade das ilhotas (LIPPONEN *et al.*, 2010), vários genes não HLA de susceptibilidade ao DM1 influenciam na progressão da doença, incluindo IL2, CD25, VNTR INS, IL18RAP, IL10, IFIH1 e PTPN22 (ACHENBACH *et al.*, 2013). Como resultados, polimorfismos nos genes não HLA e escores de alelos de risco têm sido utilizados para estratificar risco tanto para desenvolvimento de auto-anticorpos

de ilhotas bem como progressão da auto-imunidade de ilhotas para o DM1 sintomático (WINKLER *et al.*, 2012; WINKLER *et al.*, 2014). Com bancos de dados maiores, essa análise provavelmente será refinada e aprimorada.

Tem sido sugerido que a imunidade mediada por citocinas desempenham um papel crucial na patogênese de várias doenças autoimunes, por isso as interleucinas foram o foco do presente estudo.

2.2.1. Citocinas

As citocinas são um grupo de proteínas solúveis que fazem parte de uma rede de sinalização que medeia interações entre células. Citocinas podem ser agrupadas em subfamílias: interleucinas, interferons (IFNs), fatores estimuladores de colônia, fatores de necrose tumoral (TNFs), fatores de crescimento (TGF) e quimiocinas (HOPKINS, 2003).

Provavelmente as citocinas são liberadas em concentrações diminuídas por todas as células humanas, formando proteínas “mensageiras” solúveis. Elas interagem com receptores específicos das células, ligados a um segundo mensageiro intracelular, ao qual recebe uma cascata de reações que leva à indução ou a inibição da transcrição de inúmeros genes por vias de sinalização celular (DUNLOP; CAMPBELL, 2000).

A produção das citocinas é transitória e rigorosamente controlada. Elas têm papel fisiológico na restauração da função normal dos tecidos, quando estes são submetidos a alterações, como infecções e traumas (HOPKINS, 2003). Outras funções importantes são na defesa e reparação dos tecidos, as citocinas controlam as respostas da imunidade inata e adquirida, incluindo: inflamação, defesa contra infecções virais, proliferação e controle das funções diferenciadas dos linfócitos T e B (HOPKINS, 2003).

Embora a inflamação seja um processo auto limitado que atua na defesa do organismo contra infecções ou danos, a resolução inadequada das respostas inflamatórias geralmente leva a doenças crônicas (SCHOTTENFELD; BEEBE-DIMMER, 2006). Muitos estudos sobre polimorfismos genéticos têm sido descritos, e em muitos casos, esses polimorfismos aumentam as concentrações de citocinas que induzem a inflamação, estando assim ligados a muitas doenças (BIDWELL *et al.*, 1999).

A sinalização das citocinas entre as células do sistema imune pode ser influenciado pelo *background* genético. Diferentes genes que codificam para interleucinas (IL) e seus receptores encontram-se entre os fatores de risco genético para o DM1 (BARRETT *et al.*, 2009; RAM; MORAHAN, 2017). Estas citocinas usualmente apresentam múltiplas funções no sistema imune, contudo, o efeito líquido de seus polimorfismos pode determinar seu impacto no DM1 (SABERZADEH-ARDESTANI *et al.*, 2018).

2.2.3. GENE *IL-18*

A interleucina 18 (IL-18) é responsável por patologias imunitárias e provavelmente é um dos fatores que contribuem para a patogênese de doenças autoimunes (BORASCHI; DINARELLO, 2006).

A IL-18 é uma citocina pró-inflamatória de baixo peso molecular, formada por uma cadeia simples de peptídeos, que foi inicialmente identificada como potente fator de indução do IFN- γ (interferon gama) na presença de LPS bacterianos. Não é identificada com nenhuma outra proteína conhecida. Pertence à superfamília da IL-1, é sintetizada na forma de um precursor inativo (24 kDa) chamado de pró-IL-18 (NAKANISHI *et al.*, 2001a). A pró-IL18 sofre clivagem feita pela enzima Caspase 1, outras caspases, granzima B, proteinase 3, e merpina- β ainda dentro da célula, transformando a pró- IL-18 em IL-18 madura (SEDIMBI; HAGGLOF; KARLSSON, 2013).

A IL-18 é produzida por uma variedade de tipos celulares, incluindo células de Kuppfer, células dendríticas, queratinócitos, condrócitos, células intestinais epiteliais, fibroblastos sinovial e osteoblastos (SEDIMBI; HAGGLOF; KARLSSON, 2013), principalmente por monócitos e macrófagos em resposta a estímulos de origem viral e/ou bacteriana, quando produzida dessa maneira é um efeito da ativação da imunidade inata iniciada pela interação hospedeiro-patógeno (BORASCHI; DINARELLO, 2006). Algumas células importantes para imunidade inata, tais como macrófagos e células dendríticas expressam a *IL-18* de forma constitutiva.

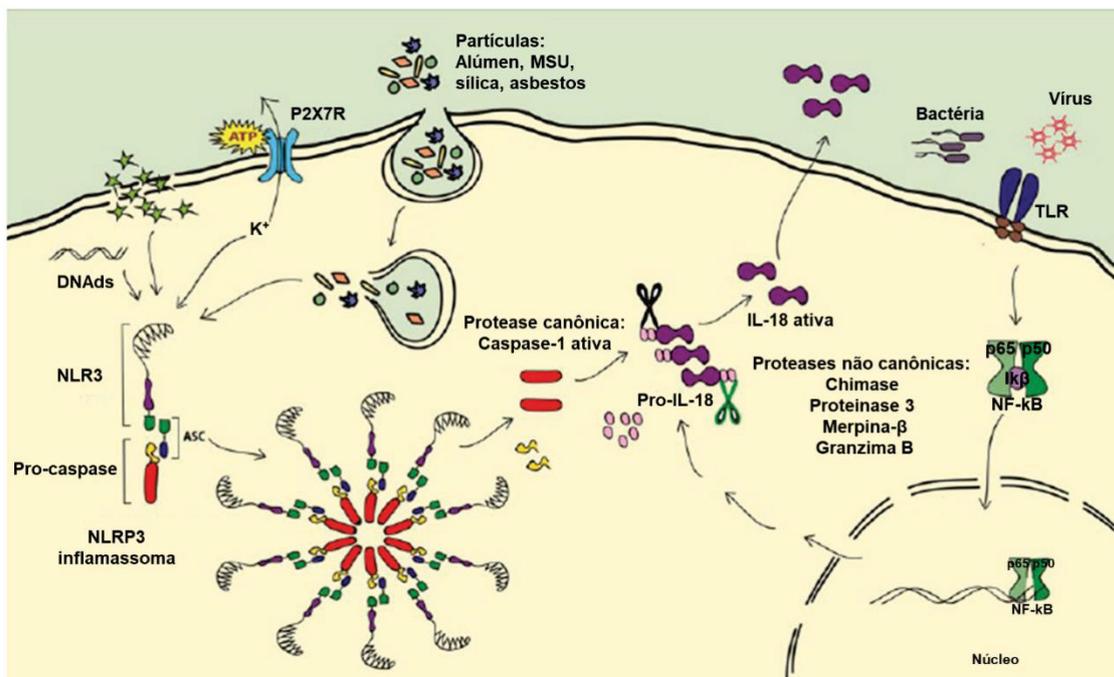
Receptores similares à NOD (Domínio de oligomerização nuclear) (NLRs) são proteínas que podem identificar sinais microbianos e não microbianos. Os NLRs são grandes complexos citosólicos contendo diferentes

combinações de proteínas, denominados inflamassomas, os quais foram primeiramente identificados como complexos ativadores de caspases, essencialmente para geração de IL-1 β pela clivagem de sua pró-forma (pro-IL-1 β) (MARTINON; BURNS; TSCHOPP, 2002). NLRs possuem três distintos domínios: (1) repetições ricas em leucina (LRRs) requeridas para ligação do sensor, (2) domínio de ligação ao nucleotídeo (NBD) requerido para a oligomerização, e (3) um domínio efetor que pode ser domínio de recrutamento de caspase (CARD) ou domínio BIR. O inflamassoma NLRP3 (receptor do tipo NOD com domínio pirina 3) é composto de NLRP3, proteína puntiforme associada a apoptose contendo um domínio do tipo CARD (*Apoptosis-associated Speck-like protein containing a CARD*- ASC) e pro-caspase. ASC é uma proteína adaptadora que liga NLRP3 pelo seu domínio pirina (PYD) com a pro-caspase-1 pelo seu domínio CARD (STEHLIK *et al.*, 2003; STUTZ; GOLENBOCK; LATZ, 2009). Ao detectar sinais de perigo intracelulares, o NLRP3 oligomeriza e recruta o domínio ASC (AGOSTINI *et al.*, 2004). Subsequentemente, ASC recruta a pro-caspase-1 através de seu domínio CARD para o complexo NLRP3-ASC (FERNANDES-ALNEMRI *et al.*, 2007). Sinais de perigo de vírus (ALLEN *et al.*, 2009), bactérias (DUNCAN *et al.*, 2009), fungos (GROSS *et al.*, 2009), toxinas (GURCEL *et al.*, 2006), e células morrendo resultam na liberação de caspase-1 ativa através da ativação do inflamassoma NLRP3 (MURUVE *et al.*, 2008).

Uma característica comum da ativação de NLRP3 é o efluxo de potássio, o qual regula a estabilidade lisossomal, onde a redução de potássio resulta em dano lisossomal e liberação de seu conteúdo (PETRILLI *et al.*, 2007). Outra característica da ativação do inflamassoma NLRP3 é ATP, que em condições homeostáticas é mantido balanceado pelas ATPases. Contudo, ATP liberado de células mortas (MARIATHASAN *et al.*, 2006), linfócitos T citotóxicos (FILIPPINI; TAFFS; SITKOVSKY, 1990), micróglia (FERRARI *et al.*, 1997), e monócitos *primed* com PAMP (PICCINI *et al.*, 2008) indica estresse em andamento. O ATP extracelular é ligado pelo receptor P2X7 (P2X7R), que atua como um canal não seletivo de cátions e, em alguns casos, forma grandes poros na membrana celular (NORTH, 2002), resultando na produção de IL-18 ativa (PERREGAUX *et al.*, 2000; PICCINI *et al.*, 2008). A IL-18 precisa ser clivada pela caspase-1 em células vivas para exercer seus efeitos e após

ativação pela caspase-1, a IL-18 utiliza mecanismos de secreção não clássicos (Figura 5).

FIGURA 5 – PRODUÇÃO DE IL-18



Inflamassoma (NLR3) é ativado por vários estímulos incluindo ATP extracelular, toxinas, PAMPs, particulados e intracelular efluxo de K^+ e DNAds. O inflamassoma NLR3 oligomerizado ativa a caspase-1 pela clivagem da pro-caspase. Pro-IL-18 é clivada para produzir IL-18 ativa pela protease canônica caspase-1 ou por proteases não canônicas, tais como chimase, proteinase-3, merpina- β e granzima B. A produção de pro-IL-18 pode ser desencadeada por PAMPs via ativação da via $NK\kappa\beta$. MSU: urato monossódico ou ácido úrico (*Monosodium urate*); PAMPs: Padrões moleculares associados a patógenos; DNAds: DNA dupla fita; NLR3: receptor do tipo NOD (Domínio de oligomerização nuclear) com domínio pirina 3; TLR: receptores similares à proteína Toll (*Toll-Like Receptor*); NF- κ B: fator nuclear κ B; ASC: Apoptosis-associated Speck-like protein containing a CARD (Domínio de recrutamento de caspase); I κ B: inibidor de kappa B. O NF- κ B é um heterodímero constituído de duas subunidades: p65 (também chamada RelA) e p50.

FONTE: Adaptado de Sedimbi, Hägglöf e Karlsson (2013).

Os mecanismos propostos incluem exocitose de lisossomos através de transportadores protéicos não definidos e liberação via microvesículas derivadas de bolhas de membrana plasmática formadas por invaginações (SEDIMBI; HAGGLOF; KARLSSON, 2013).

Vários estudos sugerem que a caspase-1 não é a única enzima que processa a IL-18 (AKITA *et al.*, 1997; TSUTSUI *et al.*, 1999; SUGAWARA *et al.*, 2001; OMOTO *et al.*, 2006; BANERJEE; BOND, 2008; GROSS *et al.*, 2009; OMOTO *et al.*, 2010; BOSSALLER *et al.*, 2012). Estes mecanismos adicionais não canônicos incluem outras caspases, granzima B, proteinase 3 e merpinas.

A produção de IL-18 ativa por outras caspases envolve um importante mecanismo de morte induzida célula-célula em que a ligação de Fas com ligantes de Fas (CD95) resulta em apoptose. Este processo é essencial para a homeostase imune e para deleção de células tumorais, infectadas e danificadas e manutenção da tolerância (SEDIMBI; HAGGLOF; KARLSSON, 2013).

A via de sinalização da IL-18 ativa envolve a sua ligação ao seu receptor, receptor de IL-18 (IL-18R), o qual é um heterodímero que consiste das cadeias IL-18R α e IL-18R β . A IL-18 ativa se liga à subunidade α do receptor, recrutando a subunidade β para o complexo sinalizador. IL-18R β recruta a molécula adaptadora fator de diferenciação mielóide 88 (MyD88) ativando a cascata de sinalização fator de necrose kappa B (NFkB) resultando na produção de interferon gama (IFN γ). A IL-18 possui uma proteína ligadora de IL-18 que pode se ligar a ela e inativa-la (SEDIMBI; HAGGLOF; KARLSSON, 2013; KAPLANSKI, 2018).

A IL-18 é a única citocina envolvida na ativação e diferenciação de várias populações de células T. Juntamente com a IL-12, IL-18 participa do paradigma Th1. Esta propriedade da IL-18 é devido a sua habilidade de induzir a produção de INF γ tanto com a IL-12 como com a IL-15, uma vez que as IL-12 e IL-15 aumentam a expressão de IL-18R α . IL-18 em combinação com a IL-12 atua em células T CD4, células T CD8 e células *natural killers* (NK) para a produção de INF γ , através da ativação simultânea de NF- κ B (fator nuclear kappa B, do inglês *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*) pela IL-18 e STAT-4 (sinal transdutor e ativador de transcrição 4, do inglês *Signal transducer and activator of transcription 4*), pela IL-12 (NAKANISHI *et al.*, 2001b). A IL-18 também ativa diretamente a citotoxicidade mediada por perforina e FasL (*First Apoptosis Signal Ligant* – FasL) em células T CD8 e células NK (TSUTSUI *et al.*, 1996). Macrófagos também produzem INF γ , quando ativados por IL-18 e IL-12 (MUNDER *et al.*, 1998). Quando há ausência de IL-12, a IL-18 não induz produção de INF γ , porém atua na diferenciação de células T imaturas em células Th2, produzindo IL-13 e IL-14 (HOSHINO; WILTROUT; YOUNG, 1999; YOSHIMOTO *et al.*, 2000). Independentemente do INF γ ou outras citocinas, a IL-18 exibe características

de outras citocinas pró-inflamatórias, como aumento de moléculas de adesão celular, síntese de óxido nítrico (OLEE *et al.*, 1999) e produção de quimiocinas (PUREN *et al.*, 1998).

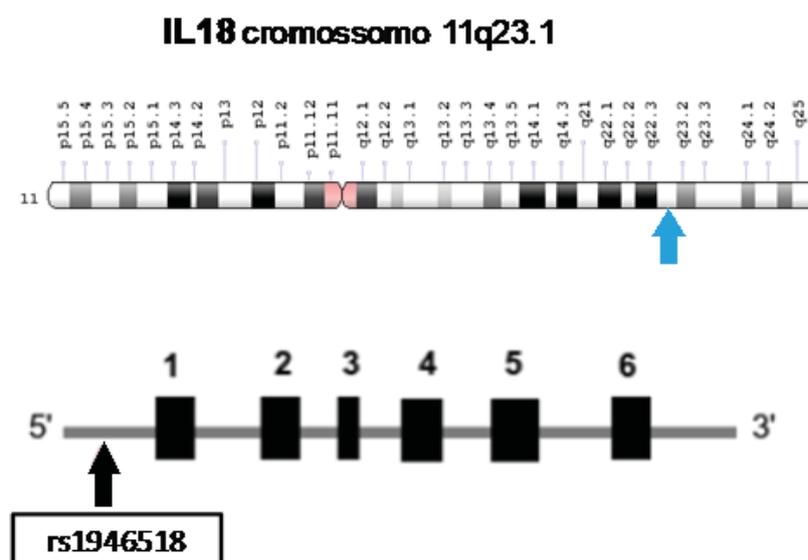
Sugere-se que os efeitos pleiotrópicos da IL-18 têm um papel importante no desencadeamento e na polarização da resposta imune (LEBEL-BINAY *et al.*, 2000). Portanto, a IL-18 apresenta-se como um fator potencial na associação com a patogênese do DM1 (REDDY, P., 2004; KUNZ; IBRAHIM, 2009; HULME *et al.*, 2012). Foi mencionado o envolvimento da IL-18 na patogênese e na progressão do diabetes. Em camundongos, ilhotas pancreáticas estimuladas com IL-18 produziram óxido nítrico e sofreram apoptose (LEWIS; DINARELLO, 2006). Em ratos NOD, as células β pancreáticas estimuladas a produzir IL-18, aumentaram a produção desta citocina resultando em insulinite destrutiva (ROTHER *et al.*, 1997; FRIGERIO; HOLLANDER; ZUMSTEG, 2002). Marleau e Sarvetnick (2011) reportaram que a secreção de IL-18 é necessária para a expansão de células T auto-reativas em ratos NOD. Em humanos, o aumento das concentrações plasmáticas de IL-18 foi observado em pacientes com alto risco para o desenvolvimento de DM1 (NICOLETTI *et al.*, 2001), bem como crianças e adultos diagnosticados com DM1 (DONG, G. *et al.*, 2007; KATAKAMI *et al.*, 2007; ALTINOVA *et al.*, 2008; RYBA-STANISLAWOWSKA *et al.*, 2014).

Também foi observada a expressão da proteína IL-18 no interior de ilhotas pancreáticas de pacientes com DM1 fulminante e uma significativa associação entre concentrações plasmáticas de IL-18 e números aumentados de auto-anticorpos no início do desenvolvimento de DM1 (HANIFI-MOGHADDAM *et al.*, 2003). DM1 fulminante é uma doença com evolução rápida para a cetoacidose diabética, com curto tempo de duração dos sintomas de diabetes e com dependência permanente da insulina exógena e negatividade para auto-anticorpos (AIDA *et al.*, 2011).

O gene *IL-18* humano localiza-se no cromossomo 11q23,1, é composto por seis exons e cinco introns, sendo o exon 1 não codificante (KALINA *et al.*, 2000) (FIGURA 6). O *IL-18* foi anteriormente denominado de fator de indução de interferon γ (*IFN-gamma inducing factor* - IGIF) e após análise estrutural, sua denominação foi alterada para IL-18 por parecer estar relacionado com a família de IL-1 (OKAMURA *et al.*, 1995; DINARELLO, 1999).

Diversos polimorfismos localizados na região promotora do gene *IL-18* foram e vem sendo identificados (FIGURA 6), dentre eles o polimorfismo -607 C/A (rs1946518). Vários estudos tipo caso-controle têm sido conduzidos para investigar a associação desse polimorfismo com doenças auto-imunes, como o DM1 (KRETOWSKI *et al.*, 2002; IDE *et al.*, 2003; IDE *et al.*, 2004; MARTIN, R. J. *et al.*, 2005; NOVOTA, P. *et al.*, 2005; MOJTAHEDI *et al.*, 2006; SZESZKO *et al.*, 2006; DONG, G. P. *et al.*, 2007). Contudo, os resultados têm sido inconclusivos ou contraditórios. Estas inconsistências podem ser devido a diferenças raciais e étnicas, viés de publicação, ou teste de hipótese múltipla incorreta (PAN; LENG; YE, 2011).

FIGURA 6 - LOCALIZAÇÃO E ORGANIZAÇÃO GENÔMICA DO GENE *IL-18*



O gene *IL-18* possui 6 exons (caixas), a localização do cromossomo (seta azul) e localização do polimorfismo (rs1946518) na região promotora.
 FONTE: Adaptado de Al-Lahham e colaboradores (2017)

O rs1946518 está localizado na posição -607 no promotor do gene *IL-18*, e está envolvido na diminuição da expressão do mesmo. A troca de citosina para adenina na posição de -607 interrompe um potencial sítio de ligação para o elemento responsivo a AMPc presente em proteínas. Estudos observaram uma maior atividade do promotor para o alelo -607C comparado ao alelo -607A. Essas alterações podem interferir na atividade da *IL-18*, levando a uma susceptibilidade para o DM1 (GIEDRAITIS *et al.*, 2001).

Em estudos com populações polonesas e japonesas, foi mostrado que o genótipo AA para o rs1946518 tem um efeito protetor ao DM1 (KRETOWSKI *et al.*, 2002; IDE *et al.*, 2004), porém, em populações Européias e Croatas não foram encontrados associações deste polimorfismo com o DM1 (MARTIN, R. J. *et al.*, 2005; SZESZKO *et al.*, 2006; HADZIJA *et al.*, 2013; LEE, Y. H.; KIM; SONG, 2015).

Um estudo de meta-análise demonstrou que o polimorfismo rs1946518 poderia estar associado à susceptibilidade ao DM1 em Asiáticos, mas não em Europeus (LEE, Y. H.; KIM; SONG, 2015).

Devido a estes resultados controversos em diversos estudos, este polimorfismo foi selecionado para verificar sua possível associação com DM1 em uma população Brasileira.

2.2.4. GENE *IL-6* E *IL-6R*

A IL-6 é uma citocina multifuncional pleiotrópica pró-inflamatória com impacto chave tanto nos eventos imunoregulatórios como nos eventos não-imunes na maioria dos tipos celulares e tecidos que não fazem parte do sistema imune (KAMIMURA; ISHIHARA; HIRANO, 2003). Em condições fisiológicas, as funções da via da IL-6 incluem a indução da fase aguda da inflamação, participação no metabolismo ósseo, cartilaginoso e lipídico, ativação de células T, estimulação do crescimento celular precursor hematopoiético e início da maturação das células B em células produtoras de anticorpos (SCHULTE; BERNHAGEN; BUCALA, 2013). Também foi proposto que a IL-6 possa afetar a homeostase e o metabolismo da glicose (KUBASZEK *et al.*, 2003).

Em 1988, o receptor da interleucina-6 (IL-6R) foi isolado e sua estrutura molecular foi determinada (YAMASAKI *et al.*, 1988). Genes que codificam IL-6R foram localizados nos cromossomos 1q21 e 92. IL-6R existe numa forma solúvel (sIL-6R) e associada à membrana (IL-6R). Dois mecanismos têm sido relatados sobre a geração de sIL-6R, o primeiro mecanismo envolve clivagem proteolítica catalisada pela ADAM-17 (uma desintegrina e metaloproteinase), e a segunda forma, que representa uma pequena fração do total sIL-6R presente no soro humano, consiste em alternativo *splicing* do mRNA resultando em um

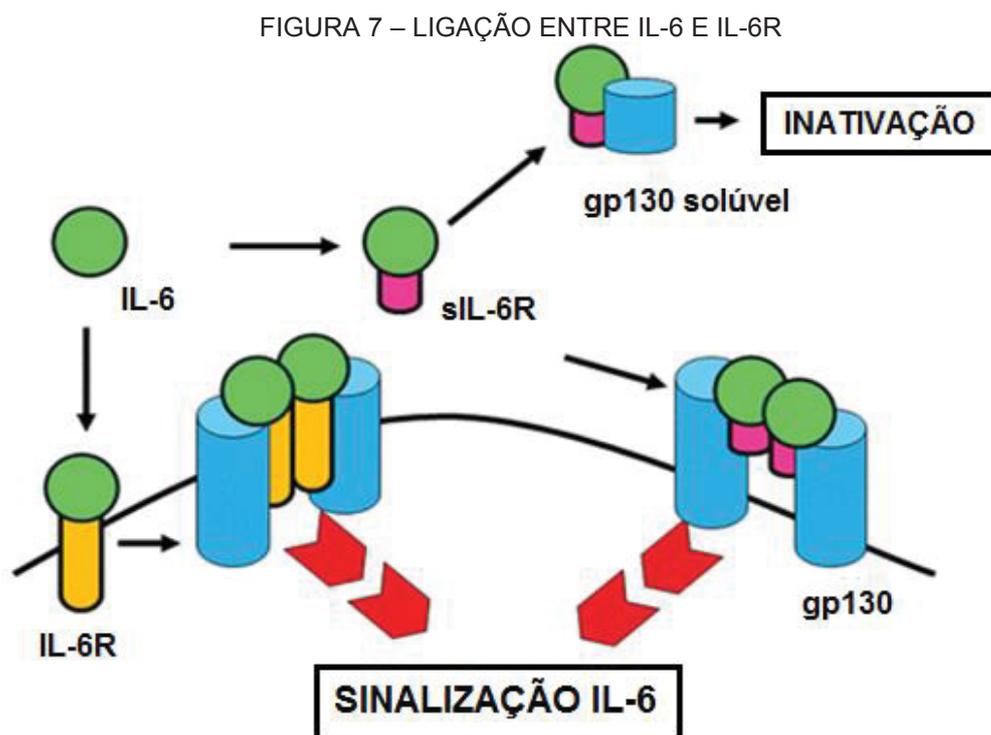
transcrito que codifica um receptor solúvel (LUST *et al.*, 1992; HORIUCHI *et al.*, 1998).

Quando a IL-6 se liga ao IL-6R, localizado na membrana celular, a homodimerização da proteína gp130 é induzida e um complexo receptor funcional de alta afinidade é formado: IL-6-IL-6R-gp130. A forma solúvel do receptor de IL-6 (sIL-6R) também pode ligar com a IL-6, e o complexo IL-6-sIL-6R podem formar um complexo com a gp130 (FIGURA 7). A ativação de células que expressam apenas gp130 via IL-6/sIL-6R complexo é chamado sinalização trans, enquanto a ativação de células através do IL-6R da superfície da membrana em complexo com IL-6 é chamado de sinalização clássica (ROSE-JOHN; NEURATH, 2004).

A gp130 é expressa onipresente no corpo. Assim, o complexo IL-6-sIL-6R poderia, em teoria, estimular a maioria das células do corpo. Contudo, acredita-se que a trans sinalização é altamente regulada pela forma solúvel da proteína gp130 acoplada na membrana plasmática (sgp130), a qual existe em altas concentrações circulantes no sangue. A forma solúvel da proteína gp130 (sgp130) liga-se ao complexo IL-6-sIL-6R e assim inibe a ligação do complexo IL-6-sIL-6R a gp130 acoplada à membrana plasmática (NARAZAKI *et al.*, 1993; JOSTOCK *et al.*, 2001). Assim, a sgp130 é um inibidor natural da sinalização mediada pela IL-6. A afinidade da sgp130 pelo complexo IL-6-sIL-6R é maior do que a afinidade da IL-6 pelo IL-6R (TAGA *et al.*, 1987; HIBI *et al.*, 1990; ROSE-JOHN *et al.*, 1991; STOYAN *et al.*, 1993).

Acredita-se que a homodimerização do receptor de IL-6 traga JAKs (*Janus quinase*) para a proximidade, resultando em suas transativações mútuas. JAKs ativada fosforila os seis resíduos de tirosina do domínio citoplasmático de gp130. A ativação de gp130 por JAK mediada pela IL-6 desencadeia duas vias principais de sinalização: a via JAK/STAT (*Janus quinase/Signal Transducer and Activator of Transcription*) e a via Raf/MEK/ERK1e2 (*Rapidly Accelerated Fibrosarcoma/Mitogen-activated protein kinase kinase/Extracellular-signal-Regulated Kinase*) (HIRANO; NAKAJIMA; HIBI, 1997). Estes dois sinais de forma independente induzem uma variedade de atividades biológicas, como por exemplo, a via ERK MAPK induz produção de MMP (metaloproteinase de matriz) (HASHIZUME; MIHARA, 2010) e a via JAK/STAT induz a expressão do ligante receptor ativador do fator nuclear K β

(*receptor activator of nuclear factor κ B ligand* –RANKL) em células sinoviais (HASHIZUME; HAYAKAWA; MIHARA, 2008). Há evidências de que um desequilíbrio da via da MAPK através da remoção da regulação pelo supressor da sinalização de citocinas 3 (SOCS3) em direção à via de sinalização pró-inflamatória STAT3 contribui para a doença auto-imune (TANAKA; KISHIMOTO, 2014).



Nas células alvo, IL-6 (verde) ao se ligar ao seu receptor de membrana (IL-6R–amarelo) ou a forma solúvel do receptor (sIL-6R – rosa) recruta a região extracelular da cadeia de sinalização gp130 (cilindro azul), formando um complexo hexamérico formado de 2 moléculas de gp130, 2 receptores de IL-6R e 2 moléculas de IL-6 (sinalização clássica) ou de 2 moléculas de gp130, 2 receptores solúveis de sIL-6R e 2 moléculas de IL-6 (sinalização trans), induzindo assim a sinalização intracelular. Contudo, se a forma solúvel de gp130 (sgp130– cilindro azul menor) se ligar ao complexo IL-6–sIL-6R, inibe a ligação do complexo IL-6–sIL-6R a gp130 acoplada à membrana plasmática, inibindo a sinalização através da IL-6.

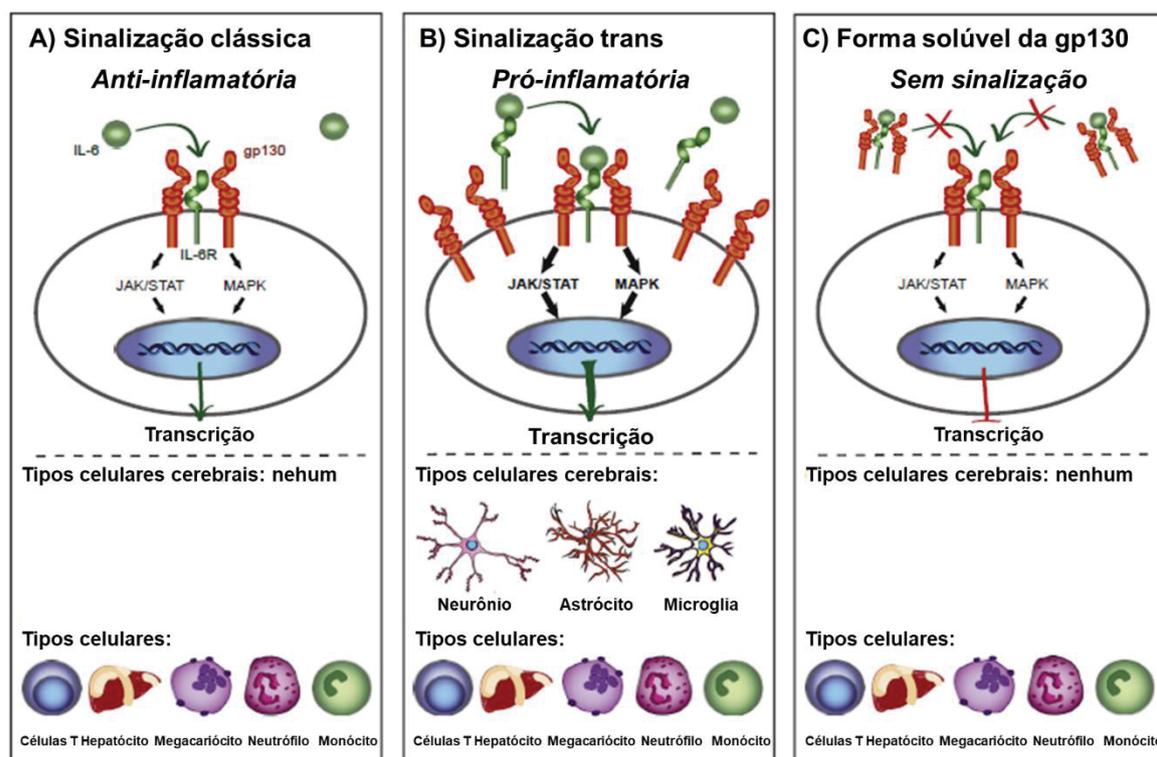
FONTE: Adaptado Mihara e colaboradores (2012).

A sinalização da IL-6 é complexa e pode resultar em cascatas inflamatórias e antiinflamatórias dependendo da presença do IL-6R ou do transdutor de sinal ligado à membrana gp130, os quais são expressos de forma muito diferente no interior de tipos celulares específicos (HODES; MENARD; RUSSO, 2016). Há evidências de que a sinalização clássica de IL-6 através de sua ligação ao receptor de superfície de membrana (IL-6R) é necessária para processos regenerativos ou antiinflamatórios (FIGURA 8A) (WOLF; ROSE-

JOHN; GARBERS, 2014), enquanto que a sinalização trans, que ocorre através da ligação da IL-6 com a forma solúvel do receptor (sIL-6R), possui um papel pró-inflamatório prevalente (FIGURA 8B) (LUST *et al.*, 1992; MULLBERG *et al.*, 1993). A sinalização clássica da IL-6 ocorre apenas em um subgrupo de células T, hepatócitos, megacariócitos, neutrófilos e monócitos (SCHELLER *et al.*, 2011). A sinalização trans da IL-6 ocorre pela ligação da IL-6 a forma solúvel do seu receptor, e o complexo IL-6–sIL-6R é transportado para qualquer tipo celular que expresse gp130 na sua superfície (WOLF; ROSE-JOHN; GARBERS, 2014). Enquanto que a maioria dos receptores solúveis, tal como a forma solúvel do receptor do fator de necrose tumoral alfa (sTNF α R) resulta em ação antagonista através da competição pelo ligante, a forma solúvel do receptor de IL-6 (sIL-6R) é agonista e aumenta os tipos celulares que a IL-6 possa sinalizar. Enquanto a sIL-6R atua como agonista, a forma solúvel da gp130 atua como um antagonista sequestrando o complexo IL-6–sIL6-6R circulantes (WOLF; ROSE-JOHN; GARBERS, 2014; GARCIA-OSCOS *et al.*, 2015), impedindo assim a sinalização da IL-6 trans, mas não a sinalização clássica (FIGURA 8C).

A IL-6 possui muitas funções no sistema imune dependendo em qual tipo de tecido está atuando, contribuindo assim como uma citocina antiinflamatória bem como inflamatória. A IL-6 foi originalmente descoberta como fator estimulante de células B, mas também foi identificada como fator estimulante e de crescimento hepático (TANAKA; KISHIMOTO, 2014), que pode atuar para a diferenciação das células β , em células plasmáticas produtoras de anticorpos. A IL-6 também pode atuar nas células T auxiliares, deslocando células Th ingênuas para o subtipo pró-inflamatório Th17, que suprime a capacidade do fator de crescimento transformante beta (TGF- β) em induzir células à células T regulatórias (T reg) antiinflamatórias (MURAKAMI; HIRANO, 2012). Assim, a ativação da IL-6 leva a uma dominância pró-inflamatória devido à proporção de células Th17 em relação as T reg. Além disso, a presença de IL-17 liberada pelas células Th17 ativa retroalimentação positiva através da sinalização NF κ B-IL-6, a qual é considerada um amplificador de IL-6 (MURAKAMI; HIRANO, 2012).

FIGURA 8 – TIPOS DE SINALIZAÇÃO DA IL-6



A – Sinalização clássica. Ocorre somente em alguns subconjuntos de células T, hepatócitos, megacariócitos, neutrófilos e monócitos. Tanto o receptor de IL-6 como o transdutor de sinal gp130 estão ligados à membrana. A IL-6 liga-se ao seu receptor e leva à transcrição que se acredita ser antiinflamatória. **B – Sinalização Trans.** Pode ocorrer em qualquer tipo de célula que tenha gp130 ligado à membrana. A IL-6 ligada à sIL-6R ativa a sinalização através da gp130 ligado à membrana. Acredita-se que a sinalização trans seja pró-inflamatória em parte através da sua habilidade de ativar mais transdutores de sinal gp130 comparado à via clássica de sinalização. **C – Bloqueio da sinalização através da sgp130.** A forma solúvel da proteína gp130 (sgp130) pode se ligar ao complexo sIL-6R – IL-6 e bloqueia sinalização trans. A forma solúvel da proteína gp130 (sgp130) não bloqueia a sinalização clássica.

FONTE: Adaptado de Hodes, Ménard e Russo (2016).

Na sinalização pela via clássica, a IL-6 ativa os receptores de IL-6 de membranas hepáticas, algumas células epiteliais e alguns leucócitos, compreendendo atividades antiinflamatórias ou regenerativas, tais como regeneração das células epiteliais intestinais (GRIVENNIKOV *et al.*, 2009), inibição da apoptose epitelial e ativação da resposta de fase aguda hepática (BARKHAUSEN *et al.*, 2011), com aumento da produção hepática de proteína C reativa, fibrinogênio e outras proteínas de fase aguda (ABEYWARDENA *et al.*, 2009; SCHUETT *et al.*, 2009). Assim suportando a resposta imune inata do organismo em defesa contra infecção bacteriana (ROSE-JOHN, 2012).

A ativação da gp130 via sinalização trans é crucial para o transporte de linfócitos para a área inflamada, controlando a expressão de quimiocinas (CHALARIS *et al.*, 2007; RABE *et al.*, 2008).

Vários estudos investigaram as concentrações plasmáticas de IL-6 no DM1, sendo que alguns encontraram concentrações elevadas no DM1 em comparação com o grupo controle (BRADSHAW *et al.*, 2009; TALAAT *et al.*, 2016) e alguns não encontraram diferença significativa (ALNEK *et al.*, 2015; HEIER *et al.*, 2015; HUNDHAUSEN *et al.*, 2016).

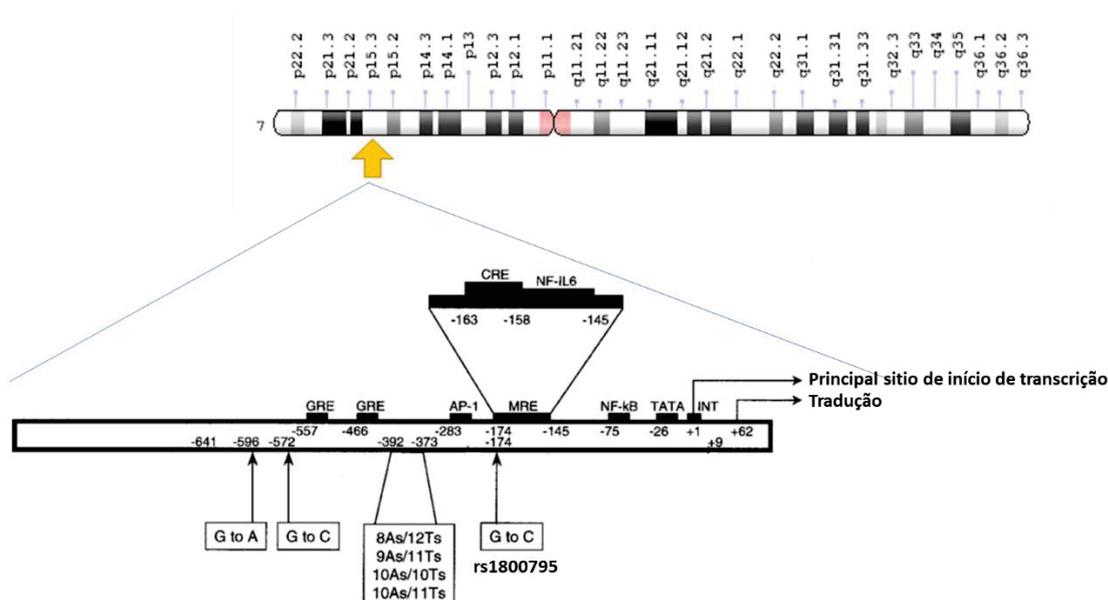
Hundhausen e colaboradores (2016) investigaram a relevância da via da IL-6 no DM1, e os autores observaram que as células T de pacientes com DM1 são hiperresponsivas ao estímulo por IL-6, embora não tenham encontrado concentrações elevadas de IL-6 nestes pacientes. Os autores também mostraram que estes efeitos eram principalmente mediados pelos receptores de IL-6 de superfície de membrana, uma vez que não foi detectado diferença nos níveis de RNAm entre os controles e DM1, e parece ter sido causado por alteração da regulação pós-traducional do receptor. Além disso, detectaram redução significativa de RNAm de ADAM-17 em células T CD4⁺CD25⁻ dos pacientes com DM1, contribuindo para a maior quantidade de IL-6R nas células T destes pacientes. Para esclarecer a função mecânica da IL-6, os autores realizaram transcriptoma de T CD4 tratadas com IL-6 e observaram uma ligação entre IL-6 e a migração das células T, o que reforça a possibilidade de que as respostas das células T à IL-6 em DM1 possam contribuir para a patogênese da doença, alterando o direcionamento das células T para os locais de inflamação das ilhotas.

Existem evidências convincentes de que as concentrações circulantes de IL-6 e os níveis de seu receptor promotor de sinalização trans (sIL-6R) são orientados geneticamente (SMITH; HUMPHRIES, 2009). Além disso, produção aberrante de IL-6 e seu receptor foram implicados na patogênese de doenças autoimunes (NISHIMOTO *et al.*, 2000).

O gene *IL-6* está localizada no cromossomo 7 (FIGURA 9) e vários fatores de transcrição regulam diretamente o gene *IL-6*, incluindo NFkB, proteína ligadora do elemento responsivo ao AMPc (CRE), proteína ativadora 1 (AP-1) e fator nuclear para IL-6 (NF-IL6) (DENDORFER; OETTGEN; LIBERMANN, 1994; SPOOREN *et al.*, 2011). A ligação do NFkB na região

promotora da *IL-6* em uma variedade de tipos celulares humanos é necessário e suficientes para regular a expressão de *IL-6* (LIBERMANN; BALTIMORE, 1990; ZHANG, Y. H.; LIN; VILCEK, 1990; RAY; PREFONTAINE, 1994), contudo receptores de glicocorticóides (GR) podem bloquear a habilidade do NFkB como ativador transcricional (RAY; PREFONTAINE, 1994; DE BOSSCHER *et al.*, 2000).

FIGURA 9 – LOCALIZAÇÃO E ORGANIZAÇÃO GENÔMICA DO GENE *IL-6* E REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA REGIÃO 5' QUE FLANQUEIA O GENE.



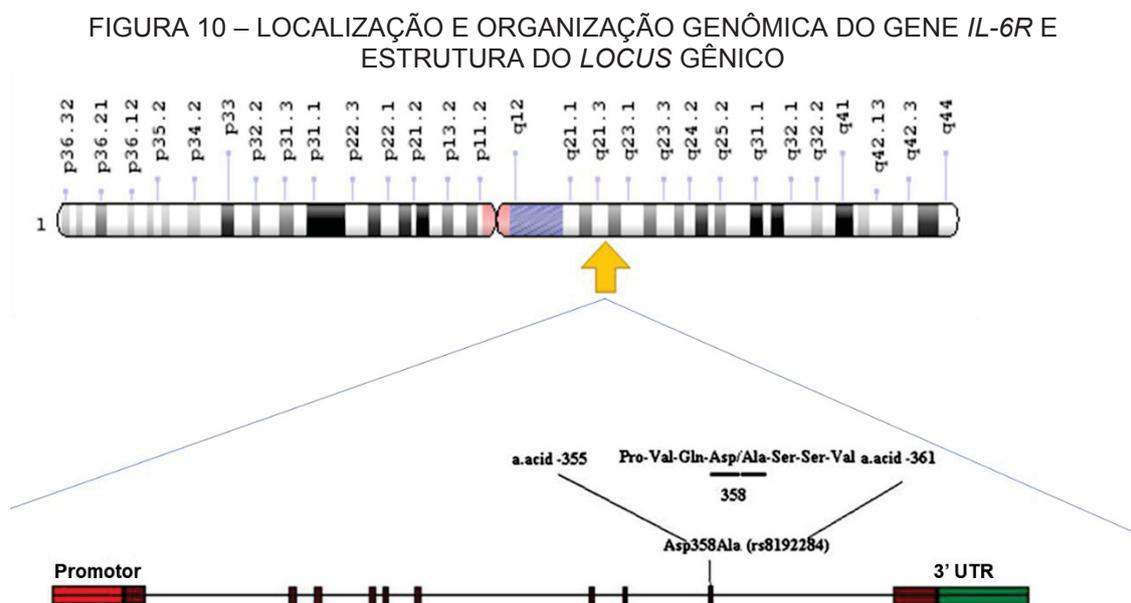
Localização do gene *IL-6* no cromossomo (seta amarela). Estão representados quatro sítios polimórficos, incluído o deste estudo localizado na posição -174 (rsrs1800795) e os potenciais sítios de ligação de fatores transcricionais. Os números estão relacionados ao principal sítio de início de transcrição. Os elementos reguladores incluem: elemento responsivo a AMPc (CRE) e fator nuclear para *IL-6* (NF-*IL6*), dois elementos responsivos a glicocorticóides (GRE), um sítio de ligação consenso para proteína ativadora 1 (AP-1), um TATA box e um sítio de ligação para NF- κ B.

FONTE: Adaptado de Gene Cards - <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=IL6> e Terry e colaboradores (2000)

O polimorfismo de nucleotídeo único (SNPs) rs1800795, corresponde ao SNP -174 G>C do gene da *IL-6*, localizado na região promotora. Polimorfismos na região promotora do gene *IL-6* podem resultar em variação inter-individuais na transcrição e expressão. Variações genéticas podem assim influenciar susceptibilidade individual a diversas doenças. Estudos prévios reportaram que este polimorfismo pode afetar a transcrição do gene *IL-6* e sua concentração plasmática (FISHMAN *et al.*, 1998; BRULL *et al.*, 2001; NAUCK *et al.*, 2002).

Fishman e colaboradores (1998) mostraram que o alelo C estaria associado a concentrações significativamente reduzidas de IL-6 em uma população saudável. O genótipo GG foi associado com alta produção de IL-6 (LARCOMBE *et al.*, 2008). O rs1800795 parece aumentar o papel da IL-6 na patogênese do DM, promovendo uma resposta imune. Sugere-se que esse polimorfismo no gene *IL-6* para aumentar a expressão de mRNA de *IL-6* e está associado à resistência à insulina em indivíduos diabéticos (NADEEM *et al.*, 2017).

O gene humano do receptor da IL-6 está localizado no cromossomo 1, na região 1q21 e é constituído de 10 exons e 9 introns (RAFIQ *et al.*, 2007) (FIGURA 10).



Localização do gene *IL-6R* no cromossomo (seta amarela). O promotor e os exons (1 a 10) estão mostrados em vermelho, região 3' UTR em verde, enquanto que os introns estão mostrados como linhas horizontais sólidas. Também está destacado a localização do principal regulador genético das concentrações de sIL-6R, o polimorfismo rs8192284.

FONTE: Adaptado de Gene Cards - <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=IL6R> e Rafiq e colaboradores (2007).

Estudos documentaram que variantes no gene *IL-6R* foram associadas com obesidade (ESCOBAR-MORREALE *et al.*, 2003; WOLFORD *et al.*, 2003), sensibilidade à insulina (WANG; BOHMANN; JASPER, 2005), síndrome metabólica (HAMID *et al.*, 2005) e risco para diabetes (HAMID *et al.*, 2004).

Uma variante comum não sinônima em *IL-6R* (rs8192284 A>C, também denominado rs2228145), localizado no éxon 9, causa uma substituição de

aminoácido Asp358Ala (ácido Aspártico por Alanina) dentro do domínio de clivagem extracelular de IL-6R, causando clivagem proteolítica da membrana IL-6R. Em estudos *in vivo*, os portadores de 358Ala mostraram concentrações mais altas do chamado receptor solúvel de IL-6 (sIL-6R), que é responsável pela trans sinalização (FERREIRA *et al.*, 2013). Experimentos baseados em células sugerem que este polimorfismo parece resultar em aumento na geração do IL-6R solúvel e na redução da expressão da superfície celular de IL-6R, prejudicando a resposta clássica de IL-6 às células-alvo (STONE *et al.*, 2013), e conseqüentemente atenuando a inflamação (MULLBERG *et al.*, 1994; REICH *et al.*, 2007; LAMAS, 2011; STEPHENS *et al.*, 2012). Contudo, estudos prévios reportaram associação entre este polimorfismo, ou variante proximamente ligadas a ele, e biomarcadores inflamatórios circulantes (REICH *et al.*, 2007; MELZER *et al.*, 2008; RIDKER *et al.*, 2008; DANIK *et al.*, 2009; ELLIOTT *et al.*, 2009; DEGHAN *et al.*, 2011; WASSEL *et al.*, 2011) e algumas doenças auto-imunes (MARINOU *et al.*, 2010; ELEFTHEROHORINO *et al.*, 2011).

O alelo C foi associado a concentrações aumentadas de sIL-6R, IL-6, expressão diminuída de IL-6R de superfície de membrana e proteção para o DM1 (FERREIRA *et al.*, 2013). Os autores explicam este aparente paradoxo de duas formas. Primeiro, que o aumento circulante de IL-6 seria um efeito resultante do *clearance* reduzido da IL-6 através da sua ligação ao receptor de membrana no fígado (HEINRICH *et al.*, 1998), o que estaria em concordância com as concentrações diminuídas de proteína C reativa (RIDKER *et al.*, 2008; COLLABORATION *et al.*, 2012; INTERLEUKIN-6 RECEPTOR MENDELIAN RANDOMISATION ANALYSIS *et al.*, 2012) e fibrinogênio (DANIK *et al.*, 2009; WASSEL *et al.*, 2011; COLLABORATION *et al.*, 2012; INTERLEUKIN-6 RECEPTOR MENDELIAN RANDOMISATION ANALYSIS *et al.*, 2012), os quais são marcadores inflamatórios sistêmicos hepáticos, em indivíduos carreadores do genótipo C. Em segundo lugar, há excesso circulante de sIL-6R e sgp130 em relação à IL-6 e qualquer IL-6 secretada irá ligar-se à sIL-6R, que subsequentemente se ligará à sgp130, gerando IL-6 inativa (GARBERS *et al.*, 2011). Assim, a associação do alelo C com concentrações elevadas de sIL-6R resultariam em uma capacidade aumentada tamponante de IL-6, o que explicaria o aumento nas concentrações de IL-6 (inativa) observada nos carreadores do alelo C.

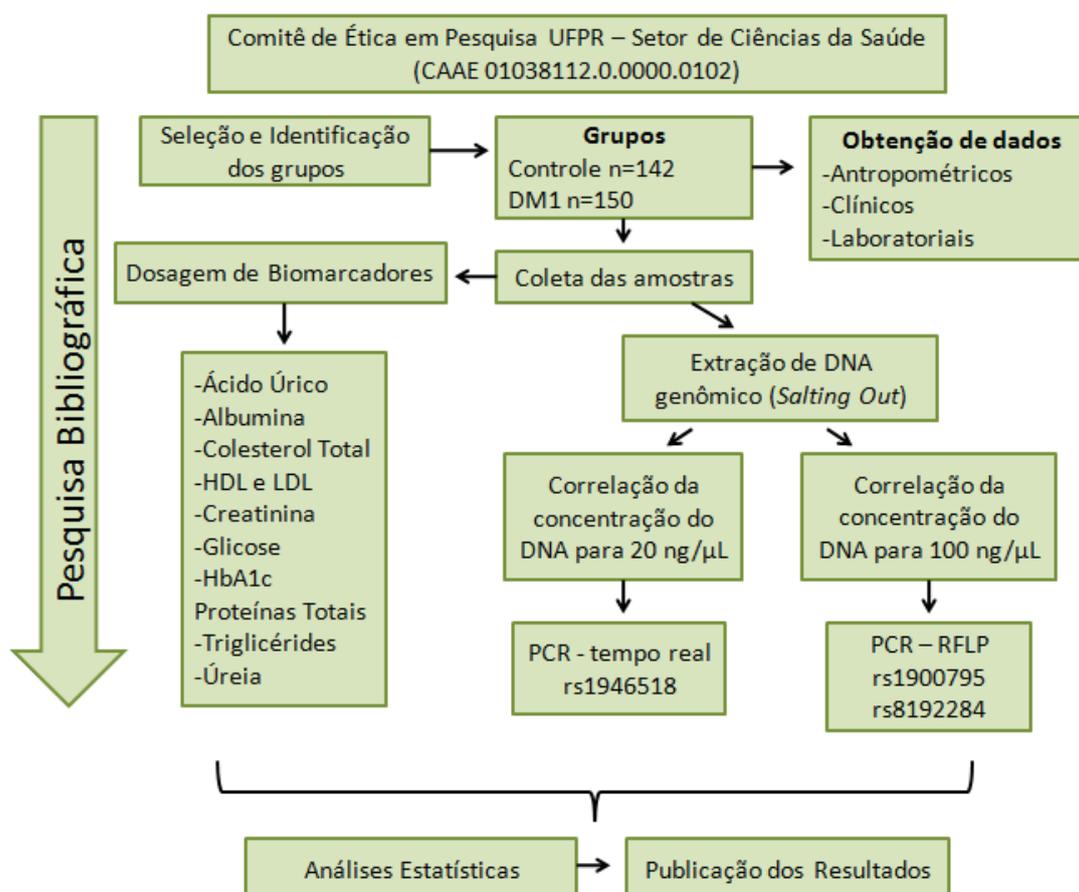
Este contexto nos motivou a investigar a possível influência de rs1800795 (IL-6) e rs8192284 (IL-6R) em pacientes com DM1. Essa informação, além de abordar um novo fator prognóstico, pode ser relevante para o planejamento de ensaios clínicos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. FLUXOGRAMA DE TRABALHO

O fluxograma de trabalho, evidenciando as principais etapas do projeto, está ilustrado na Figura 11.

FIGURA 11 – FLUXOGRAMA DE TRABALHO



FONTE: O autor, 2018

3.2. AMOSTRAS

Para o estudo foram utilizadas 291 amostras de sangue total e soro de pacientes com diabetes tipo 1 diagnosticado na idade ≥ 18 anos de idade (DM1, n=141) e indivíduos saudáveis (Controle, n=150).

As amostras de DM1 foram coletadas durante exames de rotina no Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná, conforme protocolo do

mesmo, na unidade de Diabetes do Serviço de Endocrinologia e Metabologia (SEMPR), após aceite dos pacientes. A autorização da coleta foi atrelado ao Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (ANEXO 2).

Os dados antropométricos e clínicos foram obtidos de todos os pacientes através de entrevista e dados do prontuário.

As amostras de soro foram coletadas em tubos com gel separador (BD Vacutainer® SST™; Becton, Dickinson, Co.), e centrifugadas (*HermleZ206A*) por 10 minutos a 6.000 rotações por minuto (rpm). As amostras de sangue total, coletadas em tubos contendo o anticoagulante EDTAK₂ (BD Vacutainer® K₂EDTA; Becton, Dickinson, Co.) foram homogeneizados por 15 minutos e divididas em duas frações. Uma fração de alíquota (~1,0 mL) para posterior quantificação de hemoglobina glicada (HbA1c), e a outra fração centrifugada (*HermleZ206A*) para obtenção do *buffy coat* (camada de leucócitos) para posterior extração do DNA cromossomal. Alíquotas de soro (~1,5 mL) foram estocadas em freezer -20 e -80°C, para posterior determinação dos parâmetros bioquímicos. Amostras hemolisadas, lipêmicas e ictéricas foram excluídas das análises.

Este projeto foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Federal do Paraná – Setor de Ciências da Saúde e aprovado sob o registro CAAE 01038112.0.0000.0102 (ANEXO 1), com número de parecer 7186, para utilização das amostras de ambos os grupos.

3.2.1. Critérios para a caracterização da amostra

Os seguintes critérios foram utilizados para caracterização dos grupos amostrais:

1. Grupo *Diabetes Mellitus* tipo 1 (DM1): pacientes de ambos os sexos portadores de *Diabetes Mellitus* tipo 1 diagnosticados em idade maior ou igual a 18 anos.
2. Grupo Controle (Controle): homens ou mulheres com idade maior ou igual a 35 anos e menor ou igual a 57 anos para parear com o grupo com diabetes tipo 1.

Critério de exclusão: pacientes com diagnóstico de DM1 antes dos 18 anos não foram incluídos no estudo. A presença de diabetes foi determinada segundo os critérios da Associação Americana de Diabetes (ADA, 2019) e Sociedade Brasileira de Diabetes (SBD, 2017).

3.3. DOSAGENS BIOQUÍMICAS

A TABELA 1 apresenta os exames realizados, suas metodologias e valores de referência.

TABELA 1- CARACTERÍSTICAS DA METODOLOGIA EMPREGADA PARA A QUANTIFICAÇÃO DOS BIOMARCADORES EM ESTUDO

Dosagem	Princípio do Método	CVa	Intervalo de Referência
1,5 anidroglicitol	Enzimático Glycomark	3,4	>10 µg/mL
Ácido úrico	Uricase, 4-aminoantipirina (4-AAP), ácido 2, 4, 6-tribromo-3-hidroxibenzóico	1,6	2,6 – 6,0 mg/dL
Albumina	Reação com verde de bromocresol	1,3	3,5 –5,0 g/dL
ALT	Ensaio cinético UV com L-alanina, cetogluturato, NADH e piridoxal fosfato	1,6	10 – 45 U/L
AST	Ensaio cinético UV com L-aspartato, cetogluturato, NADH e piridoxal fosfato	2,2	15 – 40 U/L
Colesterol Total	Enzimático colorimétrico com colesterol esterase, colesterol oxidase e peroxidase (Reação de Trinder)	1,3	<190 mg/dL
Creatinina	Picrato alcalino cinético	3,2	0,6–1,1 mg/dL
Gama GT		1,13	5-58 mg/dL
Glicose	Hexoquinase	1,71	60-100 mg/dL
HbA1C	Imunoturbidimétrico	0,74	<6,5%
HDL-colesterol	Ensaio homogêneo enzimático colorimétrico	5,1	Desejável > 60 mg/dL Baixo < 45 mg/dL
LDL-colesterol*	Cálculo pela equação de Friedewald		<130 mg/dL
Proteínas Totais	Reação do Biurero	1,4	6,0 – 8,0 g/dL
Triglicérides	Ensaio enzimático com lipase, glicerol-3-fosfato oxidase e peroxidase com Reação de Trinder	1,6	< 150 mg/dL
Úreia	Ensaio cinético com uréase, GLDH e NADH	1,1	15 – 44 mg/dL

LEGENDA: Determinações realizadas com reagentes, padrões e calibradores da Abbott, em sistema automatizado Architect Ci8200 (Abbott Diagnóstica Laboratórios do Brasil) e da Labtest em sistema automatizado Labmax 400 (Labtest) empregando-se reagentes, calibradores e controles fornecidos pelo fabricante. CVa, coeficiente de variação analítica inter-ensaio, em porcentagem, para soro controle com concentração “normal”. *Equação de Friedewald, LDL-colesterol = Colesterol total – HDL-colesterol – Triglicérides/5.

FONTE: O autor (2018).

As determinações dos parâmetros bioquímicos foram realizadas em sistema automatizado Labmax 400 (Labtest AS) no Campus III da UFPR e Architect Ci8200, Abbott no laboratório do Hospital de Clínicas da UFPR, utilizando reagentes, calibradores e controles adequados ao sistema automatizado.

3.4. EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DO DNA GENÔMICO

O DNA genômico foi extraído a partir do *buffy coat* (Vacuette EDTAK₃ Greiner) pelo método de *salting out* modificado (LAHIRI; NURNBERGER, 1991), onde as proteínas celulares sofrem desidratação e precipitam quando submetidas a um ambiente salino saturado de cloreto de sódio.

A quantificação do DNA genômico foi realizada por espectrofotometria em 260 e 280 nm (S60, Biochrom). O critério de exclusão foram amostras que apresentaram concentração inferior a 20 ng/ μ L e grau de pureza menor que 1,5 ou superior a 2,1, em relação à razão $A_{260/280}$, o que caracteriza contaminação e baixa qualidade.

As amostras de DNA foram diluídas, sendo normalizadas na concentração final de 100 ng/ μ L, com água ultra pura estéril para análise de genotipagem pelo sistema PCR-RFLP (*Polimerase Chain Reaction - Restriction Fragment Length Polymorphism*). Para as análises com o sistema TaqMan®, as amostras foram diluídas até concentração final de 20 ng/ μ L em água ultra pura estéril. Ambas foram conservadas em freezer a -20°C.

3.5. GENOTIPAGEM DOS POLIMORFISMOS

A tabela 2 apresenta os genes e os polimorfismos genéticos estudados nesse trabalho.

A genotipagem do rs1946518 foi realizada utilizando a PCR em tempo real com sonda fluorescente específica do sistema TaqMan® (*Applied Biosystems, Foster City, CA, USA*). Essa técnica é caracterizada por amplificar sequências alvo e simultaneamente gerar um sinal do genótipo e discriminação alélica de forma eficiente (MEIJERMAN *et al.*, 2007). Sondas fluorescentes específicas TaqMan® para o alelo em estudo, marcado com

fluoróforos VIC e FAM, foi ligada a um silenciador (*quencher*). Enquanto a sonda não estiver ligada ao DNA, o sinal da fluorescência é baixo devido à presença do *quencher*, assim que a sonda, por complementaridade de bases, anelar-se ao DNA, o silenciador é clivado pela DNA polimerase, sendo então liberado, permitindo que o fluoróforo seja medido e quantificado (SCHLEINITZ; DISTEFANO; KOVACS, 2011).

TABELA 2 - CARACTERIZAÇÃO DOS POLIMORFISMOS EM ESTUDO

Genes	Designação Omin	Posição no cromossomo	Técnica	Polimorfismo
IL-18	600953	11q23.1	TaqMan®,	rs1946518 C>A
IL-6	147620	7p15.3	PCR-RFLP	rs1800795 G>C
IL-6R	147880	1q21.3	PCR-RFLP	rs8192284 A>C

LEGENDA: rs: dbps: *reference SNP database* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez>);
OMIN: *Online Mendelian Inheritance in Man*® (<http://omin.org/>);

FONTE: O autor (2018).

As genotipagens foram realizadas no equipamento 7500 Fast™ (*AppliedBiosystems, Foster City, CA, USA*), utilizando-se reagentes (*Master Mix*®, *SNP Genotyping Assay*®) e demais suplementos fornecidos pelo fabricante (*AppliedBiosystems*).

Os experimentos seguiram o protocolo descrito na TABELA 3, realizados em placas de 96 poços em câmara de fluxo laminar para evitar contaminação. A placa foi coberta com filme específico e posteriormente centrifugada (*HermleZ326K*) por 2 minutos a 4.000 rpm para remoção de bolhas e sedimentação da mistura. Em cada placa foram adicionados dois controles negativos (NTC: *no template control*), para avaliar a contaminação no sistema, os quais continham apenas a mistura de reação e água (sem DNA). Os grupos DM1 e CTRL foram ensaiados de forma aleatória, na mesma placa. Para todas as análises, a qualidade da genotipagem foi superior a 98% identificada pelo *software* do sistema 7500 Fast™.

A identificação das variações dos genes *IL-6* (rs1800795) e *IL-6R* (rs8192284) foram realizadas através da técnica de PCR-RFPL (*Polimerase Chain Reaction - Restriction Fragment Length Polymorphism*). As condições de PCR utilizadas para as amplificações estão descritas na TABELA 4. A reação

em cadeia da polimerase (PCR) foi realizada em termociclador Eppendorf (*Mastercycler gradient*).

TABELA 3 - PROTOCOLO PARA TÉCNICA TAQMAN®

Reagentes	rs1946518
Volume para reação de 8 µL	
Sonda TaqMan®	0,1 µL
Master Mix	3,0 µL
Água ultra pura estéril	1,9 µL
DNA (20 ng/µL)	3,0 µL
Ciclos Térmicos	
1 ciclos pré-PCR	60°C por 30 segundos
1 ciclo	95°C por 10 minutos
50 ciclos:	95°C por 15 segundos
	60°C por 90 segundos
1 ciclo pós-PCR	60°C por 30 segundos

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

Fonte: O autor (2018).

Para a identificação das regiões polimórficas do gene *IL-6* rs1800795 foram utilizados os seguintes oligonucleotídeos iniciadores (Invitrogen): F-5'-TTCCCCCTAGTTGTGTCTTGC-3' e R-5'-TGGGGCTGATTGGAAACCT-3' descritos por Ruzzo e colaboradores (2014).

Para a identificação das regiões polimórficas do gene *IL-6R* rs8192284 foram utilizados os seguintes oligonucleotídeos iniciadores (Invitrogen): F-5'-CCTCTTCCTCCTCTATCTTCAATTTT-3' e R-5'-AATGTGGGCAGTGGTACTGAA-3' descritos por Ruzzo e colaboradores (2014).

TABELA 4 - CONDIÇÕES PARA A REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE DA REGIÃO POLIMÓRFICA DO GENE *IL-6* rs1900795 e GENE *IL-6R* rs8192284

Reagentes	rs1800795 – Gene <i>IL-6</i> rs8192284 – Gene <i>IL-6R</i>			
	Concentração Final	Volumes		
Água Regente estéril		5,7 µL		
Tampão Taq 10x *	1x	1,0 µL		
<i>Primer Forward</i> (10 pmol/µL)	10 pmol	0,5 µL		
<i>Primer Reverse</i> (10 pmol/µL)	10 pmol	0,5 µL		
MgCl ₂ 25Mm	1,5 Mm	0,6 µL		
dNTP 5Mm	0,2 Mm	0,4 µL		
Taq DNA polimerase (5 U/µL)	4 U	0,3 µL		
DNA molde (100 ng/µL)	100 ng/µL	1,0 µL		
	Ciclos Térmicos	Temperatura – tempo		
	1 ciclos	95°C por 10 minutos		
	35 ciclos	{ 95°C por 15 segundos 60°C por 30 segundos 72°C por 30 segundos		
			1 ciclo	72°C por 5 minutos

LEGENDA: *Tampão TAQ 10X, (NH₄)₂SO₄ 750 mM, Tris-HCl (pH 8,8; 25°C); 0,1% (v/v) Tween 20. Taq DNA polymerase (Invitrogen).

Fonte: O autor (2018).

Os fragmentos do gene *IL-6* (rs1800795) e do gene *IL-6R* (rs8192284) amplificados através da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 2% com voltagem constante de 80 Volts (~22 mA), em temperatura ambiente durante cerca de 1 horas e 15 minutos, em tampão TBE 1x (Tris-hidroximetilaminometano 89 mmol/L; ácido bórico 89 mmol/L e EDTA 1 mmol/L, pH 8,2). Uma alíquota de 2 µL do produto de PCR, misturada a 3 µL de tampão de aplicação (glicerol 30%; azul de bromofenol 0,05% e xilenocianol 0,05%) foi aplicada no gel. Os produtos de PCR foram corados com solução de brometo de etídeo (0,5 µg/mL) e visualizados em transiluminador sob luz UV (302 nm). As imagens dos géis foram capturadas no sistema L-Pix (Loccus Biotecnologia).

Após a amplificação, os produtos de PCR dos rs1800795 e rs8192284 foram digeridos com as enzimas de restrição Hsp92 II e Hind III, respectivamente. As reações de restrição seguiram os protocolos detalhados na TABELA 5, sendo a incubação por 12 horas em banho-maria a 37°C.

TABELA 5 - PROTOCOLO PARA A REAÇÃO DE RESTRIÇÃO E DETECÇÃO DOS POLIMORFISMOS DOS GENES *IL-6* E *IL-6R*.

Reagentes	<i>IL-6</i>	<i>IL-6R</i>
	rs1800795	rs8192284
Produto de PCR (~20 ng/μL)	1,0 μL	1,0 μL
Tampão 10x (Sigma)*	0,5 μL	0,5 μL
Água ultrapura estéril	3,4 μL	3,4 μL
Enzima de Restrição (10 U/μL)	0,05 μL (Hsp 92II)	0,05 μL (Hind III)
BSA acetilada	0,05 μL	0,05 μL
Volume Final da reação	4,0 μL	4,0 μL
Temperatura de incubação	37°C	37°C
Tempo de incubação	12 horas	12 horas

LEGENDA: *Tampão TAQ 10X, Sigma, 500 mM, Tris-HCl (pH7,5; 37°C); 1M NaCl; 100 mM MgCl₂; 10 mM Dithioerythritol.**Tampão TAQ 10X Promega, 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 Hind III (Promega); Enzima Hsp 92 II (Promega).

Fonte: O autor (2018).

Os fragmentos de DNA de ambos os genes das reações de PCR-RFLP foram separados em eletroforese em gel de poliacrilamida (29:1) a 15%, em cuba mini Protean 3 BioRad (100x75x0,75mm).

3.6. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Através do teste de Kolmogorov-Smirnov foram analisadas as variáveis contínuas para normalidade. A verificação de *outliers* foi realizada pelo método gráfico disponível no programa Statistica 8.0.

Variáveis que apresentaram distribuição normal foram comparadas pelo teste “t” de Student para amostras não pareadas (bidirecional) ou análise de variância (ANOVA) quando a comparação envolvia mais de dois grupos, sendo os valores expressos em média e desvio padrão.

As variáveis que não apresentaram distribuição normal foram comparadas com o teste U de Mann-Whitney, ou o teste de Kruskal-Wallis (mais de 2 grupos), sendo os valores apresentados como mediana e intervalo interquartil (25%-75%).

Para as variáveis categóricas foram utilizados o teste do Chi-quadrado (χ^2) ou o teste Exato de Fischer bidirecional, conforme apropriado.

As análises de correlação foram realizadas através de testes descritos por Pearson (variáveis com distribuição normal) ou Spearman (variáveis sem distribuição normal). Os genótipos foram caracterizados como 1 (homozigoto usual); 2 (heterozigoto) e 3 (homozigoto raro) para todas as análises de correlação.

O programa Statistica para windows 8.0 (StatSoft Inc, Tulsa OK, USA) foi utilizado nas análises de dados.

A verificação do equilíbrio de Hardy-Weinberg, cálculos das frequências genotípicas e alélicas e o intervalo de confiança de 95% (IC95%) para os alelos de menor frequência (AMF) foram calculadas com o programa DeFinetti (<http://ihg.gsf.de/cgi-bin/hw/hwa1.pl>). Para comparações das frequências alélicas com outras populações, foi considerado semelhante quando a frequência do AMF (alelo menos frequente) se encontrava dentro do limite de 95% do intervalo de confiança. Frequências acima ou abaixo do 95%IC foram consideradas diferentes.

Uma probabilidade inferior a 5% ($P < 0,05$) foi considerada significativa em todas as análises.

Para os resultados que apresentaram significância, foi aplicado o teste de Odds Ratio (OR) que indica a relação entre a hipótese de acontecer um acontecimento entre diversas situações.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados estão descritos em três tópicos: caracterização das amostras (4.1), análises bioquímicas (4.2) e análises moleculares (4.3).

4.1. CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS

A estatística descritiva dos parâmetros antropométricos para os grupos em estudo (Controle e DM1) é apresentada na TABELA 6.

TABELA 6 - CARACTERIZAÇÃO DOS GRUPOS

Parâmetros	Controle (n=150)	DM1 (n=141)	P
Idade (anos)	44 (40-49)	45 (34-52)	0,602
Homens/Mulheres, n	53/97	48/93	0,817
Etnia (%)			
Euro-brasileiros	ND	80,2	
Afro-brasileiros	ND	19,8	
Peso (kg)	74 (64-83)	68 (60-82)	0,016
Altura (cm)	166,2 ± 8,9	163,3 ± 9,8	0,009
IMC (kg/m ²)	27,0 ± 4,2	25,8 ± 4,3	0,018
Tempo de Diabetes, anos	-	14,8 ± 10,8	-
Histórico Familiar DM	-	69,2%	-

LEGENDA: Os resultados são apresentados como média ± Desvio Padrão para variáveis com distribuição normal, ou mediana (intervalo interquartil, 25% - 75%) para variáveis sem distribuição normal. P, probabilidade teste t-Student bidirecional. Teste do Chi-quadrado. P<0,05 é significativo e destacado em negrito. -, ND, sem informação disponível.

Fonte: O autor (2018).

Ambos os grupos estudados foram pareados por gênero e idade (TABELA 6). A idade do diagnóstico do grupo DM1 foi entre 18 anos e 38 anos. Apesar das medianas entre os grupos serem próximas, a dispersão de idade foi maior no grupo DM1.

Neste estudo não foi possível comparar a etnia entre os grupos devido esta informação não estar disponível entre os participantes do grupo controle. No grupo DM1 houve prevalência na etnia euro-brasileiro (80,2%), conforme esperado pelas características da população do sul do Brasil. Possivelmente o

grupo controle apresenta uma distribuição étnica similar ao grupo DM1, visto que os participantes são provenientes da mesma região demográfica.

Houve uma diferença significativa em relação ao peso e IMC ($P < 0,05$), como esperado, uma vez que a patologia está frequentemente relacionada à redução de peso (ADA, 2015). Contudo, o IMC entre $18,5 \text{ kg/m}^3$ e 25 kg/m^2 para adultos é considerado como adequado (WHO, 2016). Ambos os grupos estudados apresentaram a média acima do valor de normalidade, $27,0 \text{ kg/m}^2$ para o grupo controle e $25,8 \text{ kg/m}^2$ para o grupo DM1. Pode-se associar esse aumento de peso entre indivíduos com DM1 com o efeito da insulinoterapia, hormônios ou também do aumento na ingestão calórica evitando os quadros de hipoglicemia (CONWAY *et al.*, 2010). Em um ensaio realizado pelo DCCT, foi observado que indivíduos em tratamento intensivo tiveram risco aumentado para estarem acima do peso em 33% e um ganho médio de 4,6 kg comparados ao grupo que recebeu tratamento convencional (PURNELL *et al.*, 2013). Em um estudo de coorte com pacientes DM1 avaliados por 18 anos foi verificado que o sobrepeso aumentou de 26,8% para 47%, e que a prevalência da obesidade aumentou 7 vezes durante estes 18 anos (CONWAY *et al.*, 2010).

A média de tempo de diabetes de 14,8 anos caracteriza o grupo DM1 como submetido à deficiência de insulina por logo prazo, e conseqüentemente mais susceptível a complicações associadas à patologia.

A prevalência de histórico familiar, o qual é um fator de risco para diabetes, foi de 69,2% dos pacientes entrevistados com DM1. Os pacientes relataram histórico familiar (pais, irmãos e avós) positivo para DM1 ou DM2. Estudos epidemiológicos mostraram uma associação positiva entre a história familiar de DM e o risco de novos casos da doença (CHERNAUSEK *et al.*, 2016). O risco aumenta em pacientes com histórico bi parental, e cujos diagnósticos foram em idades mais jovens (STONE *et al.*, 2013).

4.2. ANÁLISES BIOQUÍMICAS

A estatística descritiva dos parâmetros bioquímicos para os grupos em estudo (Controle e DM1) é apresentada na TABELA 7.

O grupo controle é formado por doadores de sangue saudáveis. Estes indivíduos foram orientados a se alimentarem antes da coleta para a doação de sangue, portanto, a glicemia do grupo controle foi obtida na ausência de jejum. As amostras do grupo DM1 foram coletadas após um jejum de aproximadamente 10 horas. A glicemia do grupo DM1 foi significativamente maior ($P < 0,001$) quando comparado aos dos controles saudáveis, o que mostra a consistência da classificação das amostras.

TABELA 7 – CONCENTRAÇÕES SÉRICAS DE PARÂMETROS BIOQUÍMICOS PARA OS GRUPOS EM ESTUDO

Parâmetros	Controle (n=150)	DM1 (n=141)	P
Glicemia (mg/dL)	96,0 (84-106)	171,0 (106-249)	< 0,001
HbA1C (%)	5,4 (5,2-5,6)	8,8 (7,6-9,7)	< 0,001
1,5 AG (µg/mL)	108,3 (102-114)	4,1 (2,3-5,9)	< 0,001
Colesterol (mg/dL)	175,0 (158-195)	171,0 (152-194)	0,235
HDL-C (mg/dL)	54,0 (44-63)	50,0 (40-63)	0,259
LDL-C (mg/dL)	93,2 (79-112)	98,8 (79-119)	0,169
Triglicerídeos (mg/dL)	138,0 (88-174)	89,0 (69-131)	< 0,001
n-HDL	121,5 (105-147)	119,0 (99 - 136)	0,431
Log (TG/HDL-C)	0,911 ± 0,66	0,688 ± 0,754	0,007
Proteína Total (g/dL)	6,9 (6,6-7,2)	8,2 (7,4 - 8,8)	< 0,001
Albumina (g/dL)	3,9 (3,8-4,0)	4,1 (3,8 - 4,3)	< 0,001
Ácido úrico (mg/dL)	3,7 (2,9 - 4,8)	4,7 (3,7 - 5,4)	< 0,001
Creatinina (mg/dL)	0,56 (0,48-0,67)	0,82 (0,80 - 1,0)	< 0,001
Uréia (mg/dL)	23,0 (20-27)	32,0 (25 - 39)	< 0,001
ALT	15,0 (11-19)	17,0 (9 - 22)	0,549
AST	21,0 (17-25)	16,0 (12 - 21)	< 0,001

LEGENDA: Os resultados são apresentados como média ± 1-Desvio Padrão ou mediana (intervalo interquartil 25% - 75%). P, probabilidade teste t-Student bidirecional. P*, probabilidade, teste U de Mann-Whitney.

Fonte: O autor (2018).

Os marcadores de perfil glicêmico foram estatisticamente diferentes entre os grupos. A partir dos resultados obtidos, podemos observar que o

grupo DM1 apresentou um controle glicêmico inadequado (glicemia em jejum acima de 130mg/dL, HbA1c >7% e 1,5AG <10µg/mL) (VAN LEEUWEN; BLADH, 2015; SBD, 2017; ADA, 2018).

Assim, a média de HbA1C para DM1 (8,8%) está acima do valor recomendado para um bom controle glicêmico. Nosso resultado corrobora com outro estudo realizado em adultos de diferentes cidades brasileiras. Tal estudo apresentou uma média de 9,1% de HbA1c (GOMES *et al.*, 2012), apenas 11,6% dos pacientes com DM1 atingiram a meta adequada de <7% para o parâmetro. Esses resultados refletem problemas com ajustes na dose de insulina, dificuldades no equilíbrio basal e educação deficiente sobre a doença (SBD, 2016).

O 1,5 anidroglicitol (1,5AG) é um marcador de controle glicêmico, é um poliol plasmático que está presente na dieta e que em condições de normoglicemia se mantém constante (YAMANOUCHI *et al.*, 1992). Em condições de hiperglicemia, onde a glicemia ultrapassa o limiar renal (>180 mg/dL), há uma redução das concentrações plasmáticas de 1,5AG, ocorrendo uma inibição competitiva com a glicose para a reabsorção tubular proximal (DUNGAN, 2008). A glicose é reabsorvida aumentando sua concentração sanguínea e o 1,5AG é eliminado pela urina, reduzindo assim a sua concentração. O 1,5AG reflete elevações transitórias da glicose (24-72 horas), podendo ser avaliado novamente dentro de 2 semanas (YAMANOUCHI *et al.*, 1992). Quando comparado com o HbA1C, o 1,5AG é mais eficaz pois permite a análise do controle glicêmico de curto prazo, o que permite um controle mais acurado e eficaz (JANUSZEWSKI *et al.*, 2012). As concentrações médias de 1,5AG encontradas para DM1 foram 4,1 µg/mL, esse resultado indica que os pacientes com DM1 no nosso estudo estão sujeitos a picos hiperglicêmicos. Valores reduzidos de 1,5AG estão relacionados com a hiperglicemia pós-prandial mesmo em indivíduos diabéticos com bom controle glicêmico quanto aos valores de HbA1C.

O perfil lipídico compreende a quantificação do colesterol total, HDL-C (HDL-colesterol), LDL-C (LDL-colesterol) e triglicerídeos. Em nosso estudo as médias de triglicerídeos foram significativamente menores ($P < 0,001$) para o grupo DM1 em relação ao grupo controle. A ausência de jejum no grupo controle pode ter afetado positivamente as concentrações de triglicerídeos, e o

uso de terapia hipolipemiante pelos pacientes com DM1, podem ser responsáveis por este resultado, os quais estão em concordância com outros estudos (GUY *et al.*, 2009; KRISHNAN *et al.*, 2011). Não houve diferença significativa em relação às concentrações de colesterol total, HDL-C, LDL-C e n-HDL-C entre os grupos. Em concordância com o reportado na literatura, o grupo DM1 apresenta o perfil lipídico dentro do intervalo preconizado pelas Diretrizes Brasileiras de Dislipidemia (Colesterol total <190 mg/dL; HDL-C >40 mg/dL; Triglicerídeos <150 mg/dL; LDL-C <130 mg/dL e n-HDL-C <130 mg/dL) (FALUDI *et al.*, 2017). Entretanto, sabe-se que pacientes com DM1 apresentam maior risco de desenvolver doenças cardiovasculares do que a população em geral (GROOP; POCIOT, 2014).

Proteínas totais e albumina apresentaram concentrações significativamente maiores no grupo DM1 quando comparados ao grupo controle, porém ambos os resultados estão dentro do intervalo de referência (Tabela 7). A albumina é frequentemente definida como um indicador de estado nutricional e/ou inflamatório. Portanto, as concentrações observadas nos grupos não sugerem alterações patológicas ou metabólicas. Pode-se sugerir que os grupos em estudos não apresentaram sinais de perda de proteína (proteinúria) ou carência nutricional (SHIMADA, 2013).

O ácido úrico pode desempenhar um importante papel pró-inflamatório por estimular a liberação de moléculas associadas ao processo inflamatório, como a proteína C reativa, a interleucina 6 e o TNF-alfa, conduzindo a lesão no endotélio vascular (BALDWIN *et al.*, 2011). Estudos demonstraram não haver relação casual entre o ácido úrico e o risco para o desenvolvimento de DM em europeus, mas altas concentrações de ácido úrico foram associadas com síndrome metabólica (BONAKDARAN; KHARAQANI, 2014), doenças cardiovasculares (VIAZZI *et al.*, 2014) e doença renal (MIKHAILIDIS; ATHYROS, 2014). As concentrações de ácido úrico foram significativamente menores ($P < 0,001$) no grupo controle em comparação com o grupo DM1 (Tabela 7). Relatos em outros estudos apresentam concordância com nossos resultados, onde o ácido úrico no soro de indivíduos com DM1 é maior, devido ao aumento da depuração de urato associado à glicosúria por mecanismo que ainda não foi elucidado (SHICHIRI; IWAMOTO; SHIIGAI, 1987; ESPARZA MARTIN; GARCIA NIETO, 2011).

Creatinina e uréia são biomarcadores de função renal. Ambas se apresentam em concentrações elevadas quando há quadro de insuficiência renal aguda e crônica. A creatinina é utilizada para o cálculo da estimativa de filtração glomerular, na triagem de doença renal crônica, sendo mais específica que a uréia. Na insuficiência renal crônica, a creatinina se altera apenas quando mais da metade dos néfrons cessam sua função, portanto, não pode ser considerado um marcador precoce (LEVEY *et al.*, 2007). As concentrações de creatinina e uréia foram significativamente maiores no grupo DM1. Estes valores sugerem que a maior parte dos pacientes do grupo DM1 não apresenta lesão renal manifesta, pois as concentrações estão dentro do intervalo de referência (CERIOTTI *et al.*, 2008). As concentrações maiores de creatinina e uréia no grupo DM1 podem sugerir uma discreta alteração renal.

As concentrações de aspartato amino transferase (AST) foram significativamente menores no grupo DM1, enquanto as concentrações de alanina amino transferase (ALT) não apresentaram diferença entre os grupos. Contudo, ambos os valores estão dentro do intervalo de referência. As aminotransferases são indicadores hepatocelulares. A ALT é encontrada principalmente no fígado e a AST pode ser encontrada em outros tecidos além do fígado sendo considerado um marcador menos específico para a função hepática (VOZAROVA *et al.*, 2002). Estudos recentes demonstraram que maior atividade das enzimas hepáticas, em particular, a ALT estão associadas à obesidade (LEE, Y. S. *et al.*, 2001), à resistência à insulina e ao DM2 (VOZAROVA *et al.*, 2002) e podem estar associadas a fatores de risco relacionados à doença hepática gordurosa não alcoólica (LEEDS *et al.*, 2009). Estudos prospectivos descobriram que a atividade de ALT era capaz de prever DM2 incidente, independente de fatores de risco clássicos (SATTAR *et al.*, 2004) ou obesidade (VOZAROVA *et al.*, 2002).

4.3. ANÁLISES MOLECULARES

As frequências genotípicas e alélicas dos genes *IL-18*, *IL-6* e *IL-6R* para os polimorfismos em estudo (indivíduos controle e DM1) apresentaram-se dentro do equilíbrio de *Hardy-Weinberg* (HWE; $P > 0,05$), evidenciando, sob determinadas condições, que as frequências alélicas na população estudada

permanecerão constantes de uma geração à outra. Desvios no equilíbrio de *Hardy-Weinberg* podem indicar novas mutações, fluxo gênico entre populações (migração) ou seleção de genótipos para reprodução (NAMIPASHAKI; RAZAGHI-MOGHADAM; ANSARI-POUR, 2015).

As frequências genóticas e alélicas para os polimorfismos em estudo estão apresentadas a seguir.

4.3.1 GENE *IL-18* – RS1946518

As frequências genóticas e alélicas e as comparações entre os grupos para o polimorfismo rs1946518 do gene *IL-18* estão apresentados na TABELA 8.

TABELA 8 - FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS DO POLIMORFISMO rs1946518 DO GENE *IL-18*, NA AMOSTRA EM ESTUDO

Polimorfismo		Controle (n= 150)	DM1 (n= 141)	P
(rs1946518)	C/C	31 (20,6)	41 (29,0)	0,251
C>A	C/A	85 (56,6)	71 (50,4)	
<i>IL-18</i>	A/A	34 (22,8)	29 (20,6)	
Frequência do Alelo				
[95% IC]	A	51,0 [45,0-57,0]	45,7 [40,0-52,0]	0,205
Dominante	AA+CA vs CC	119/31	41/100	0,097
Recessivo	AA vs CA+CC	24/126	102/39	0,916

LEGENDA: Valores dos genótipos são n (%); 95% IC: Intervalo de confiança de 95%; P, probabilidade, teste de χ^2 . Equilíbrio de Hardy-Weinberg (teste de χ^2). SNP rs1946518 grupo controle (P=0,101) e DM1 (P=0,863).

Fonte: O autor (2018).

As frequências genóticas e alélicas não se diferenciaram entre os grupos em estudo. Resultados similares foram encontrados em outros estudos com populações caucasóides (MARTIN, R. J. *et al.*, 2005; SZESZKO *et al.*, 2006; HADZIJA *et al.*, 2013). Entretanto, foram encontradas associações significativas com DM1 nas populações Asiática (IDE *et al.*, 2004; DONG, G. P. *et al.*, 2007; LEE, Y. H.; KIM; SONG, 2015) e Turca (ALTINOVA *et al.*, 2010). Uma vez que as frequências alélicas dos genes frequentemente diferem entre diferentes etnias, e que *IL-18* pode ter papel na susceptibilidade do DM1,

estudos adicionais são necessários para avaliar se polimorfismos no gene da *IL-18* contribuem na patogênese do DM1 em diversos grupos étnicos.

Estudos mostraram um aumento significativo da *IL-18* em pacientes com DM1 (NICOLETTI *et al.*, 2001; DONG, G. *et al.*, 2007; KATAKAMI *et al.*, 2007; ALTINOVA *et al.*, 2008; RYBA-STANISLAWOWSKA *et al.*, 2014). Pesquisas em populações Polonesas (KRETOWSKI *et al.*, 2002) e Japonesas (IDE *et al.*, 2004) relataram que o genótipo AA para o rs1946518 tem um efeito protetor para o DM1. Em adultos o genótipo CC foi associado com maior concentração de HbA1c quando comparados com os indivíduos com genótipos CA em uma população Turca.

Em nosso estudo não observamos associação do polimorfismo rs1946518 com a HbA1c e nem o efeito protetor do genótipo AA, em concordância com outros estudos realizados em populações Caucásicas (MARTIN, R. J. E. A., 2005; SZESZKO *et al.*, 2006) e Brasileira (TAVARES *et al.*, 2013).

A frequência do alelo A observado para o grupo controle (51%) e para o grupo DM1 (45,7%) foram semelhantes às descritas para as populações Japonesa (IDE *et al.*, 2004), Chinesa Han (DONG, G. P. *et al.*, 2007) e Brasileira do nordeste (TAVARES *et al.*, 2013) e foi superior à descrita para Caucásicas (SZESZKO *et al.*, 2006; TARNOWSKI *et al.*, 2017) (TABELA 9).

A *IL-18* é uma citocina pleiotrópica envolvida na regulação de resposta adquirida e inata exercendo papel chave em doenças auto-imunes através do controle da resposta imune das células T auxiliares Th1 e Th2 (NAKAHIRA *et al.*, 2002). Foi demonstrado que a *IL-18* exerce papel na patogênese do DM1 como uma citocina pró-inflamatória (THOMPSON; HUMPHRIES, 2007). A *IL-18* induz a produção de TNF- α , fatores estimulantes de colônias de granulócitos/macrófagos e IFN- γ , o que resulta em dano das células β -pancreáticas. Concentrações elevadas de *IL-18* foram detectados em estágios pré-clínicos de diabetes em parentes de primeiro grau de pacientes com DM1 (ACHENBACH *et al.*, 2005) e em pacientes com DM1 (KATAKAMI *et al.*, 2007). A superprodução de *IL-18* em DM1 pode ser devida a polimorfismos em regiões com funções reguladoras, e sabe-se que o polimorfismo rs1946518 altera a atividade transcricional do promotor do gene da *IL-18* (GIEDRAITIS *et al.*, 2001; KRETOWSKI *et al.*, 2002). O alelo C foi associado a níveis

transcricionais do RNAm de *IL-18* mais elevados em relação ao alelo A e ao risco para o DM1 (KRETOWSKI *et al.*, 2002).

TABELA 9 - COMPARAÇÕES ENTRE FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS DO POLIMORFISMO rs1946518 DO GENE *IL-18* COM DADOS DA LITERATURA

Grupo Étnico	Características	N	Alelo A%	Referência
Euro-brasileiros	DM1	141	51,0	
	Saudáveis	150	45,7	
Japão	DM1	151	46,6	(IDE <i>et al.</i> , 2004)
	Saudáveis	169	55,3	
Irã	DM1	112	48,1	(MOJTAHEDI <i>et al.</i> , 2006)
	Saudáveis	194	41,2	
Reino Unido	DM1	1560	39,2	(SZESZKO <i>et al.</i> , 2006)
	Saudáveis	1715	38,1	
Chineses Han	DM1	118	41,2	(DONG, G. P. <i>et al.</i> , 2007)
	Saudáveis	150	53,0	
Turcos	DM1	91	35,7	(ALTINOVA <i>et al.</i> , 2010)
	Saudáveis	87	35,6	
Brasileiros	DM1	181	43,0	(TAVARES <i>et al.</i> , 2013)
Nordestinos	Saudáveis	122	46,0	
Croatas	DM1	187	42,5	(HADZIJA <i>et al.</i> , 2013)
	Saudáveis	236	44,9	
Poloneses	DM1	204	38,5	(TARNOWSKI <i>et al.</i> , 2017)
	Saudáveis	207	44,7	

LEGENDA: Em negrito dados obtidos neste estudo e frequências do alelo A do polimorfismo rs1946518 em outros estudos que estão fora do limite de confiança descritos na Tabela 8 para os grupos em estudo; DM1: *Diabetes Mellitus* tipo 1. (dbSNP, 2018), <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>.

Fonte: O autor (2018).

Contudo, neste estudo não foi encontrada associação do polimorfismo rs1946518 com o DM1 em uma população Euro-Brasileira, em concordância com estudos realizados nas populações Tcheca, Inglesa e Iraniana (MARTIN, R. J. *et al.*, 2005; NOVOTA, P. K., K.; PINTEROVA, D.; NOVAK, J.; TRESLOVA, L.; ANDEL, M. ET AL, 2005; MOJTAHEDI *et al.*, 2006). Ainda, um estudo de meta-análise com o rs1946518, no qual foram avaliadas várias doenças auto-imunes, não relatou correlação com o início do diabetes (PAN; LENG; YE, 2011).

A patogênese do DM1 é complexa e não é influenciada apenas pelo perfil genético, mas também por fatores ambientais. Donge e colaboradores

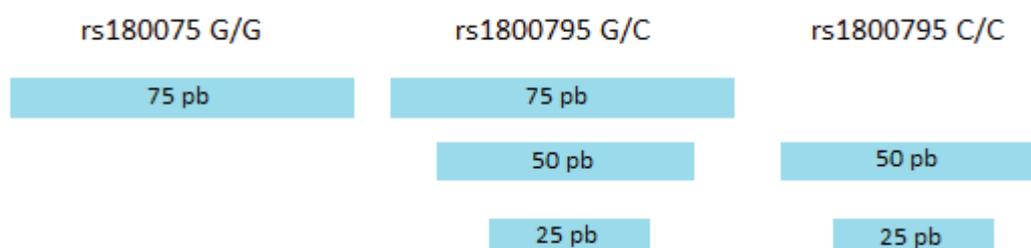
(2007), observaram que a diversidade genética e diferentes condições ambientais podem contribuir para alcançar resultados opostos em diferentes populações.

Portanto, o polimorfismo rs1946518 do gene *IL-18* não está associado ao DM1 na população em estudo.

4.4.2 GENE *IL-6* – rs1800795

A genotipagem do polimorfismo rs1800795 foi realizada através da técnica de PCR-RFLP (conforme descrito no tópico 3.5 de Materiais e Métodos), gerando os perfis de restrição detalhados na FIGURA 12.

FIGURA 12 – MAPA DE RESTRIÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS GENÓTIPOS OBTIDOS PELA DIGESTÃO COM A ENZIMA Hsp92 II PARA O POLIMORFISMO rs1800795.

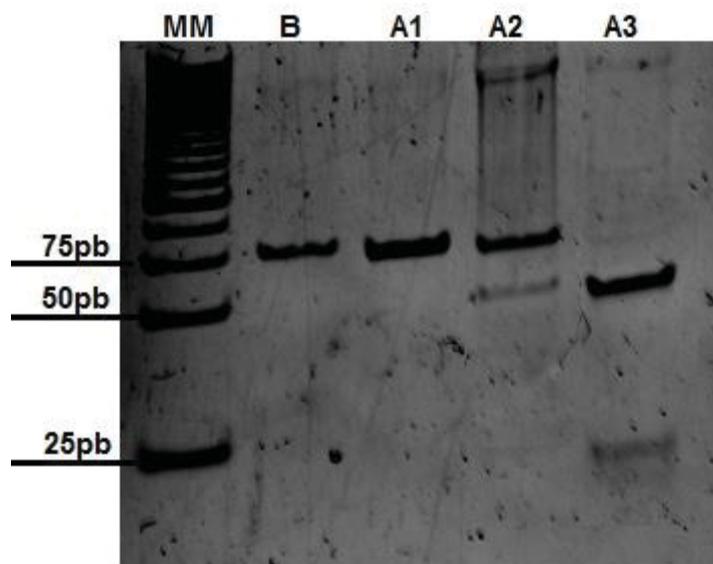


LEGENDA: Perfil de fragmentos de DNA após digestão com a enzima de restrição Hsp92 II dos genótipos do polimorfismo rs1800795 do gene *IL-6*. O indivíduo homocigoto GG apresenta um fragmento de 75 pb; o indivíduo heterocigoto CG apresenta 3 fragmentos (75pb, 50 pb e 25 pb) e o indivíduo homocigoto CC apresenta 2 fragmentos (50 pb e 25 pb).

Fonte: O autor (2018).

Após a etapa de restrição, os géis de poliácridamida foram analisados para os fragmentos descritos acima. Na FIGURA 13 é possível observar uma amostra sem a enzima de restrição utilizada como controle e as amostras incubadas com a enzima de restrição: um homocigoto GG apresentando um fragmento de 75 pb; o heterocigoto CG apresentando 75 pb, 50 pb e 25 pb; e homocigoto CC com fragmentos de 50 pb e 25 pb.

FIGURA 13 - PERFIL ELETROFORÉTICO DOS PRODUTOS DE RESTRIÇÃO PARA O POLIMORFISMO rs1800795 DO GENE *IL-6*.



LEGENDA: MM – marcador de massa molecular de 25 pb; B – produto de PCR, sem adição de enzima de restrição; A1 – amostra homocigoto GG apresentando fragmento de 75 pb; A2 – amostra heterocigoto GC apresentando 75 pb, 50 pb e 25 pb; A3 – amostra heterocigoto CC apresentando 50 pb e 25 pb.

Fonte: O autor (2018).

As frequências genotípicas e alélicas e as comparações entre os grupos para o polimorfismo rs1800795 do gene *IL-6* estão apresentados na tabela 10 e estão de acordo com o equilíbrio de *Hardy-Weinberg*.

As frequências genotípicas e alélicas não se diferenciaram entre os grupos em estudo, que está em concordância com o estudo de Tsiavou e colaboradores (2004) realizado em pacientes com LADA.

Os estudos genéticos com este polimorfismo em pacientes com DM1 com diagnóstico com idade inferior aos 18 anos de idade (média entre 6,7-16 anos) tem se mostrado inconsistentes. Um estudo mostrou que o alelo G conferia risco para o DM1 (JAHROMI, M.; MILLWARD, A.; DEMAINÉ, A., 2000), enquanto que outros estudos mostraram fraca associação entre o alelo C e o DM1 (COOPER *et al.*, 2007; MYSLIWIEC *et al.*, 2008; JAVOR *et al.*, 2010; URURAHY *et al.*, 2015).

TABELA 10 - FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS DO POLIMORFISMO rs1800795 DO GENE *IL-6*, NA AMOSTRA EM ESTUDO

Polimorfismo		Controle (n= 150)	DM1 (n= 141)	P
(rs1800795)	G/G	75 (50,0)	63 (44,7)	0,599
G>C	G/C	68 (45,3)	69 (48,9)	
IL-6	C/C	7 (4,7)	9 (6,4)	
Frequência do				
Alelo C		27,53	30,1	0,350
[95% IC]		[20,0-35,0]	[23,0-38,0]	
Dominante	GC+CC vs GG	75/75	78/63	0,749
Recessivo	CC vs GC+GG	7/143	9/132	0,521

LEGENDA: Valores dos genótipos são n (%); 95% IC: Intervalo de confiança de 95%; P, probabilidade, teste de χ^2 . Equilíbrio de Hardy-Weinberg (teste de χ^2). SNP rs1800795 grupo controle (P= 0,084) e DM1 (P=0,081).

Fonte: O autor (2018).

Estes estudos conduzidos em pacientes com DM1 de início na juventude implicam que as variantes genotípicas do polimorfismo rs1800795 possa influenciar a idade de início das doenças ou modular o risco do desenvolvimento do diabetes (JAHROMI, M. M.; MILLWARD, B. A.; DEMAINE, A. G., 2000; GILLESPIE *et al.*, 2005; HERMANN *et al.*, 2005). Inclusive, alguns estudos sugerem que o genótipo GG do polimorfismo rs1800795 é protetor para o início precoce do DM1, mas esta proteção pode ser perdida posteriormente com o avanço da idade (JAHROMI, M. M.; MILLWARD, B. A.; DEMAINE, A. G., 2000; GILLESPIE *et al.*, 2005; HERMANN *et al.*, 2005; MYSLIWSKA *et al.*, 2009).

Similar efeito foi descrito para a IL-10, onde polimorfismos modulam o grau de destruição e idade de início do DM1, o qual mostra que a variabilidade na idade de início desta doença é geneticamente determinada (IDE *et al.*, 2002).

A frequência do alelo C encontrada nesse estudo para o grupo controle (27,7%, IC 95% 22-23) e DM1 (31,1, IC 95% 26-36) é inferior ao relatado para Caucásios Ingleses (controle 42,6% e DM1 44,0%) (COOPER *et al.*, 2007), Gregos (controle 35,9%) (TSIAVOU *et al.*, 2004), Poloneses (controle 50,0% e DM1 58,8%) (MYSLIWSKA *et al.*, 2009) e Eslovacos (controle 38,6% e DM1 48,7%) (JAVOR *et al.*, 2010) (TABELA 11).

TABELA 11 - COMPARAÇÕES ENTRE FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS DO POLIMORFISMO rs1800795 DO GENE *IL-6* COM DADOS DA LITERATURA

Grupo Étnico	Características	N	Alelo C %	Referência
Euro-brasileiros	DM1	141	31,10	
	Saudáveis	150	27,05	
Britânicos	DM1	257	30,9	(JAHROMI, M.; MILLWARD A.; DEMAINE, A., 2000)
	Saudáveis	120	45,4	
Gregos	DM2	31	45,2	(TSIAVOU <i>et al.</i> , 2004)
	LADA	32	53,1	
	Saudáveis	39	35,9	
Britânicos	DM1	7785	44,0	(COOPER <i>et al.</i> , 2007)
	Saudáveis	8852	42,6	
Poloneses	DM1	210	58,8	(MYSLIWSKA <i>et al.</i> , 2009)
	Saudáveis	170	50,0	
Eslovacos	DM1	151	48,68	(JAVOR <i>et al.</i> , 2010)
	Saudáveis	140	38,57	
Chilenos	DM1	145	21,0	(PEREZ-BRAVO <i>et al.</i> , 2011)
	Saudáveis	103	14,1	
Egípcios	DCR	50	44,0	(SETTIN <i>et al.</i> , 2009)
	Saudáveis	98	50,5	
Brasileiros	DM1	210	24,6	(URURAHY <i>et al.</i> , 2015)
	Saudáveis	170	17,4	
Espanhóis	DM1	145	21,0	(PEREZ-BRAVO <i>et al.</i> , 2011)
	Saudáveis	103	14,1	

LEGENDA: Em negrito, dados obtidos neste estudo e frequências do alelo C do polimorfismo rs1800795 em outros estudos que estão fora do limite de confiança descritos na Tabela 10 para os grupos em estudo; DM1: *Diabetes Mellitus* tipo 1; DCR: Doença cardíaca reumática.(dbSNP, 2018), <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>.

Fonte: O autor (2018).

A frequência do alelo C na população Brasileira parece ser inferior a de outras populações Caucásicas, como demonstrado por um estudo na população Brasileira do Nordeste (URURAHY *et al.*, 2015), contudo diferente do reportado em nosso estudo.

Estudos anteriores mostraram que o alelo G do rs1800795 está correlacionado com uma maior produção de IL-6 e as concentrações plasmáticas de IL-6 foram maiores em indivíduos GC ou GG (FISHMAN *et al.*, 1998).

Um estudo Polonês associou o genótipo GG com um aumento à propensão de lesões renais em crianças e adolescentes com DM1

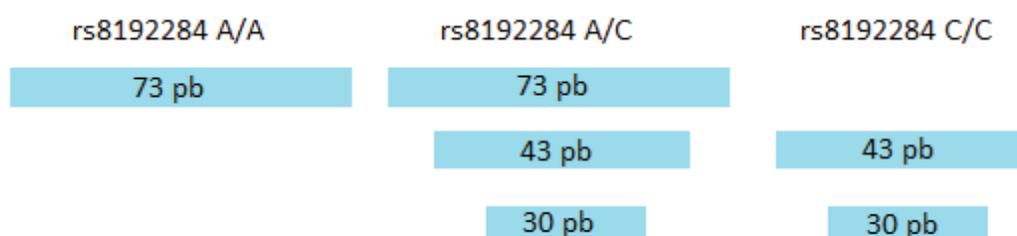
(MYSLIWSKA *et al.*, 2009). Ururary e colaboradores (2015) associaram o rs1800795 com maior concentração de HbA1C, resultado contrário ao presente estudo que não encontrou diferença significativa com os parâmetros bioquímicos.

Em síntese, o polimorfismo rs1800795 do gene da *IL-6* não foi associado ao DM1 na população em estudo.

4.4.3 GENE *IL-6R* - rs8192284

A genotipagem do polimorfismo rs8192284 (rs2228145) foi realizada através da técnica de PCR-RFLP (conforme descrito no tópico 3.5 de Materiais e Métodos), gerando os perfis de restrição detalhados na FIGURA 14.

FIGURA 14– MAPA DE RESTRIÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS GENÓTIPOS OBTIDOS PELA DIGESTÃO COM A ENZIMA HIND III PARA O POLIMORFISMO rs8192284

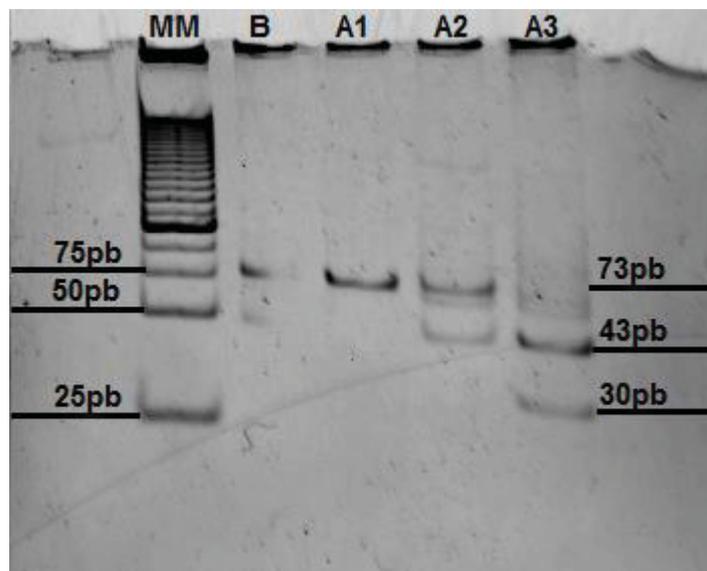


LEGENDA: Perfil de fragmentos de DNA após digestão com a enzima de restrição Hind III dos genótipos do polimorfismo rs8192284 do gene *IL-6R*. O indivíduo homozigoto AA apresenta um fragmento de 73 pb; o indivíduo heterozigoto AC apresenta 3 fragmentos (73pb, 43 pb e 30 pb) e o indivíduo homozigoto CC apresenta 2 fragmentos (43 pb e 30 pb).

Fonte: O autor (2018).

Após a etapa de restrição, os géis de poliacrilamida foram analisados para os fragmentos descritos acima. Na FIGURA 15 é possível observar uma amostra sem a enzima de restrição utilizada como controle e as amostras incubadas com a enzima de restrição: um homozigoto AA apresentando um fragmento de 73 pb; o heterozigoto AC apresentando 73 pb, 43 pb e 30 pb; e homozigoto CC com fragmentos de 43 pb e 30 pb.

FIGURA 15 - PERFIL ELETROFORÉTICO DOS PRODUTOS DE RESTRIÇÃO PARA O POLIMORFISMO rs8192284 DO GENE *IL-6R*



LEGENDA: MM – marcador de massa molecular de 25 pb; B - produto de PCR, sem adição de enzima de restrição; A1 – amostra homocigoto AA apresentando fragmento de 73 pb; A2 – amostra homocigoto CC apresentando fragmentos de 73 pb, 43 pb e 30 pb; A3 – amostra heterocigoto AC apresentando 43 pb e 30 pb.

Fonte: O autor (2018).

As frequências alélicas e genotípicas do polimorfismo rs8192284 estão apresentadas na tabela 12. O polimorfismo em estudo está no equilíbrio de Hardy-Weinberg ($P > 0,05$) em ambos os grupos.

O polimorfismo rs8192284 do gene *IL-6R* apresentou uma associação com o DM1, com diferenças significativas entre as frequências genotípicas e alélicas entre os grupos em estudo nos modelos co-dominantes, dominantes e recessivo (TABELA 12).

O alelo A, conferiu proteção para DM1, com razão de chance (*odds ratio*) de 0,59 (IC95% 0,36 - 0,97). Portanto, a presença do alelo A reduz o risco em 1,69 vezes para o desenvolvimento de DM1 em adultos.

TABELA 12 - FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS DO POLIMORFISMO rs8192284 DO GENE *IL-6R*, NA AMOSTRA EM ESTUDO

Polimorfismo		Controle (n= 150)	DM1 (n= 141)	P
(rs8192284)	A/A	59 (39,3)	39 (27,7)	0,046
A>C	A/C	78 (52,0)	80 (56,7)	
<i>IL-6R</i>	C/C	13 (8,7)	22 (15,6)	
Frequência do Alelo				
C		34,7	44,0	0,021
[95% IC]		[27,0 - 43,0]	[36,0 - 51,0]	
Dominante	AC+CC vs AA	91/59	102/39	0,035
Recessivo	CC vs AA+AC	13/137	22/119	0,069

LEGENDA: Valores dos genótipos são n (%); 95% IC: Intervalo de confiança de 95%; P, probabilidade, teste de χ^2 . Equilíbrio de *Hardy-Weinberg* (teste de χ^2). SNP rs8192284 grupo controle (P=0,070) e DM1 (P=0,072). OR para a frequência alélica OR=1,48 (1,06-2,07). OR para o modelo dominante OR=0,59 (0,36-0,97).

Fonte: O autor (2018).

Já o alelo C, de menor frequência, está associado à maior risco para DM1, com razão de chance de (*odds ratio*) calculado para a frequência alélica de 1,48 (IC95% 1,06 – 2,07). Estes resultados são contraditórios ao encontrado por Ferreira e colaboradores (2013), onde os autores encontraram que o alelo C confere proteção ao DM1 em indivíduos menores de 17 anos. Os autores discutem que estes resultados constituem um paradoxo, uma vez que o alelo C foi associado a altas concentrações da forma solúvel do receptor de IL-6 (sIL-6R) (REICH *et al.*, 2007; FERREIRA *et al.*, 2013) e de IL-6 (REICH *et al.*, 2007; COLLABORATION *et al.*, 2012; INTERLEUKIN-6 RECEPTOR MENDELIAN RANDOMISATION ANALYSIS *et al.*, 2012; NAITZA *et al.*, 2012).

Embora tenha sido demonstrado que os indivíduos que carregam o genótipo CC apresentam um aumento de quase 2 vezes de desenvolver a doença em relação aos demais genótipos (GARBERS *et al.*, 2014), o alelo C tem sido associado à proteção para várias doenças inflamatórias, tais como doença cardíaca coronariana e artrite reumatóide (FERREIRA *et al.*, 2013). Uma possível explicação para este paradoxo baseia-se na capacidade aumentada do complexo sIL-6R/sgp130 em tamponar as moléculas de IL-6 plasmáticas em indivíduos que carregam o genótipo CC do polimorfismo rs8192284 (SCHELLER; ROSE-JOHN, 2012).

Contudo, sabe-se que o alelo C prejudica a sinalização clássica da IL-6, devido à redução de concentração do receptor de membrana da IL-6 por estimular sua clivagem proteolítica gerando a forma solúvel (MULLBERG *et al.*, 1994; REICH *et al.*, 2007; LAMAS, 2011). Acredita-se que a sinalização clássica, sinalização através da interação da IL-6 com seu receptor na membrana plasmática, apresenta efeitos homeostáticos e antiinflamatórios. Já a sinalização trans, que ocorre através da interação da IL-6 com a forma solúvel de seu receptor, é considerada pró-inflamatória (ROSE-JOHN, 2017). Em contraste com o forte efeito do alelo C do polimorfismo rs8192284 sobre a sinalização clássica, o efeito desta variante sobre a sinalização trans não é claro. Além disso, foi demonstrado que monócitos isolados de pacientes com DM1 produzem espontaneamente elevadas concentrações de IL-6, a qual está ligada a diferenciação dos linfócitos na linhagem patogênica Th17 (BRADSHAW *et al.*, 2009). Hundhausen e colaboradores (2016) demonstraram uma resposta aumentada da IL-6 em células T CD4 e CD8 em indivíduos com DM1 estabelecida. Avaliaram o contexto do tempo de diagnóstico, e descobriram que as respostas aumentadas de IL-6 foram observadas em pacientes com duração da doença menos que 10 anos, mas que a sinalização de IL-6 declinou em indivíduos com a doença de longa duração (>20 anos). Os autores sugeriram que a sinalização desregulada de IL-6 no DM1 não se deve às alterações metabólicas agudas que ocorrem no momento do diagnóstico, nem é uma característica adquirida ao longo do tempo. Desta forma, estes achados corroboram com os nossos resultados de o alelo C estar conferindo risco ao DM1.

Além disso, os pacientes do estudo de Ferreira e colaboradores (2013) tiveram início da doença em idades inferiores a 17 anos, e os utilizados em nosso estudo, acima de 18 anos de idade. Já foi descrito na literatura polimorfismos em citocinas modulando o grau de destruição e idade de início do DM1 (IDE *et al.*, 2002).

A frequência do alelo C do polimorfismo Asp358Ala (rs2228145 ou rs8192284) do gene *IL-6R* encontrada neste estudo para o grupo controle (34,7%, IC 95%29-40) foi similar ao dos Americanos (39,6%) (QI; RIFAI; HU, 2007), Espanhóis (39,3%) (CENIT *et al.*, 2012), Poloneses (33,2) (KAPELSKI *et*

al., 2015) e inferior ao dos Coreanos (44,5%) (JEON *et al.*, 2013). Não encontramos informação sobre este polimorfismo em DM1 (TABELA 13).

TABELA 13 - COMPARAÇÕES ENTRE FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS DO POLIMORFISMO rs8192284 DO GENE *IL-6R* COM DADOS DA LITERATURA

Grupo Étnico	Características	N	Alelo C %	Referência
Euro-brasileiros	DM1	141	44,0	
	Saudáveis	150	34,7	
Poloneses	IAM	553	34,1	(SZPAKOWICZ <i>et al.</i> , 2017)
	Saudáveis	101	40,1	
Americanos	DM2	653	39,3	(QI; RIFAI; HU, 2007)
	Saudáveis	1038	39,6	
Espanhóis	ES	1013	38,7	(CENIT <i>et al.</i> , 2012)
	Saudáveis	1369	39,3	
Coreanos	LES	300	42,8	(JEON <i>et al.</i> , 2013)
	Saudáveis	299	44,5	
Chineses	Câncer gástrico	473	40,9	(ZHANG, J. Z. <i>et al.</i> , 2017)
	Saudáveis	474	43,9	
Poloneses	Esquizofrenia		39,0	(KAPELSKI <i>et al.</i> , 2015)
	Saudáveis		33,2	

LEGENDA: Em negrito, dados obtidos neste estudo e frequências do alelo C do polimorfismo rs8192284 em outros estudos que estão fora do limite de confiança descritos na Tabela 7 para os grupos em estudo; DM1: *Diabetes Mellitus* tipo 1; IAM: infarto agudo do miocárdio; ES: esclerose sistêmica; LES: Lúpus eritematoso sistêmico. (dbSNP, 2018), <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>.

Fonte: O autor (2018).

A busca de associação entre genótipos e biomarcadores foi realizada através de análise de variância. As análises para esse polimorfismo com os genótipos, concentrações séricas dos biomarcadores de ambos os grupos e dados clínicos dos pacientes com DM1, não mostraram associação entre o rs8192284 do gene da *IL-6R* e os biomarcadores.

Existem muitos exemplos na literatura, sugerindo que análises relevantes em diferentes populações de pacientes com doenças complexas resultam em dados controversos, devido a interações gene-ambiente/gene-gene ou suas diferentes origens étnicas e sua composição genética geral.

O crescente interesse no papel do IL6-R em doenças complexas e nas estratégias terapêuticas que visam à via do IL6-R, destacam o valor de novos estudos sobre os determinantes genéticos desse gene.

5. CONCLUSÕES

- O polimorfismo rs1946518 do gene da *IL-18* não foi associado ao DM1 na população em estudo.
- O polimorfismo rs1800795 do gene da *IL-6* não foi associado ao DM1 na população em estudo;
- O polimorfismo rs8192284 do gene *IL-6R* foi associado ao DM1 quando analisado no modelo recessivo sugerindo que a presença do alelo C confere maior risco à doença;
- As frequências para os alelos raros dos polimorfismos em estudo foram, no geral, similares aos descritos para outras populações Européias ou Caucásicas e menores quando comparados a Orientais.

REFERÊNCIAS

- ABEYWARDENA, M. Y. *et al.* Cardiovascular biology of interleukin-6. **Curr Pharm Des.** v. 15, n.15, p. 1809-21. 2009.
- ACHENBACH, P. *et al.* Natural history of type 1 diabetes. **Diabetes.** v. 54 Suppl 2, p. S25-31. 2005.
- ACHENBACH, P. *et al.* Characteristics of rapid vs slow progression to type 1 diabetes in multiple islet autoantibody-positive children. **Diabetologia.** v. 56, n.7, p. 1615-22. 2013.
- ADA. Classification and diagnosis of diabetes. Sec. 2. In Standards of Medical Care in Diabetes. **Diabetes Care.** v. 38(Suppl. 1);, p. S8–S16 2015.
- ADA. Standards of Medical Care in Diabetes 2016. **The Journal of clinical and applied research and education.** v. 39, p. 2016.
- ADA. Standards of Medical Care in Diabetes - 2018. **Diabetes Care.** v. 41, n.1, p. 172. 2018.
- ADA. Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes-2019. **Diabetes Care.** v. 42, n.Suppl 1, p. S13-S28. 2019.
- AGOSTINI, L. *et al.* NALP3 forms an IL-1beta-processing inflammasome with increased activity in Muckle-Wells autoinflammatory disorder. **Immunity.** v. 20, n.3, p. 319-25. 2004.
- AIDA, K. *et al.* RIG-I- and MDA5-initiated innate immunity linked with adaptive immunity accelerates beta-cell death in fulminant type 1 diabetes. **Diabetes.** v. 60, n.3, p. 884-9. 2011.
- AKITA, K. *et al.* Involvement of caspase-1 and caspase-3 in the production and processing of mature human interleukin 18 in monocytic THP.1 cells. **J Biol Chem.** v. 272, n.42, p. 26595-603. 1997.
- AL-LAHHAM, Y. *et al.* Interleukin-18 (rs187238) and glucose transporter 4 (rs5435) polymorphisms in Euro-Brazilians with type 1 diabetes. **Genet Mol Res.** v. 16, n.3, p. 2017.
- ALIZADEH, B. Z.; KOELEMAN, B. P. Genetic polymorphisms in susceptibility to Type 1 Diabetes. **Clin Chim Acta.** v. 387, n.1-2, p. 9-17. 2008.
- ALLEN, I. C. *et al.* The NLRP3 inflammasome mediates in vivo innate immunity to influenza A virus through recognition of viral RNA. **Immunity.** v. 30, n.4, p. 556-65. 2009.

ALNEK, K. *et al.* Increased Blood Levels of Growth Factors, Proinflammatory Cytokines, and Th17 Cytokines in Patients with Newly Diagnosed Type 1 Diabetes. **PLoS One**. v. 10, n.12, p. e0142976. 2015.

ALTINOVA, A. E. *et al.* Association of polymorphisms in the IL-18 and IL-12 genes with susceptibility to Type 1 diabetes in Turkish patients. **J Endocrinol Invest**. v. 33, n.7, p. 451-4. 2010.

ALTINOVA, A. E. *et al.* Serum IL-18 levels in patients with type 1 diabetes: relations to metabolic control and microvascular complications. **Cytokine**. v. 42, n.2, p. 217-21. 2008.

AMERICAN DIABETES, A. Standards of Medical Care in Diabetes 2016. **Diabetes Care**. v. 39, n.1, p. 81-90. 2016.

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

ARIF, S. *et al.* Blood and islet phenotypes indicate immunological heterogeneity in type 1 diabetes. **Diabetes**. v. 63, n.11, p. 3835-45. 2014.

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.

BABON, J. A. *et al.* Analysis of self-antigen specificity of islet-infiltrating T cells from human donors with type 1 diabetes. **Nat Med**. v. 22, n.12, p. 1482-1487. 2016.

BALDWIN, W. *et al.* Hyperuricemia as a mediator of the proinflammatory endocrine imbalance in the adipose tissue in a murine model of the metabolic syndrome. **Diabetes**. v. 60, n.4, p. 1258-69. 2011.

BANERJEE, S.; BOND, J. S. Prointerleukin-18 is activated by meprin beta in vitro and in vivo in intestinal inflammation. **J Biol Chem**. v. 283, n.46, p. 31371-7. 2008.

BARKHAUSEN, T. *et al.* Selective blockade of interleukin-6 trans-signaling improves survival in a murine polymicrobial sepsis model. **Crit Care Med**. v. 39, n.6, p. 1407-13. 2011.

BARNETT, R. Type 1 diabetes. **Lancet**. v. 391, n.10117, p. 195. 2018.

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.

BIDWELL, J. *et al.* Cytokine gene polymorphism in human disease: on-line databases. **Genes Immun**. v. 1, n.1, p. 3-19. 1999.

BONAKDARAN, S.; KHARAQANI, B. Association of serum uric acid and metabolic syndrome in type 2 diabetes. **Curr Diabetes Rev.** v. 10, n.2, p. 113-7. 2014.

BORASCHI, D.; DINARELLO, C. A. IL-18 in autoimmunity: review. **Eur Cytokine Netw.** v. 17, n.4, p. 224-52. 2006.

BOSSALLER, L. *et al.* Cutting edge: FAS (CD95) mediates noncanonical IL-1 β and IL-18 maturation via caspase-8 in an RIP3-independent manner. **J Immunol.** v. 189, n.12, p. 5508-12. 2012.

BOYLE, J. P. *et al.* Estimating prevalence of type 1 and type 2 diabetes in a population of African Americans with diabetes mellitus. **Am J Epidemiol.** v. 149, n.1, p. 55-63. 1999.

BRADSHAW, E. M. *et al.* Monocytes from patients with type 1 diabetes spontaneously secrete proinflammatory cytokines inducing Th17 cells. **J Immunol.** v. 183, n.7, p. 4432-9. 2009.

BRULL, D. J. *et al.* Interleukin-6 gene -174g>c and -572g>c promoter polymorphisms are strong predictors of plasma interleukin-6 levels after coronary artery bypass surgery. **Arterioscler Thromb Vasc Biol.** v. 21, n.9, p. 1458-63. 2001.

BRUNO, G. *et al.* Incidence of type 1 and type 2 diabetes in adults aged 30-49 years: the population-based registry in the province of Turin, Italy. **Diabetes Care.** v. 28, n.11, p. 2613-9. 2005.

CAMPBELL-THOMPSON, M. *et al.* Insulinitis and beta-Cell Mass in the Natural History of Type 1 Diabetes. **Diabetes.** v. 65, n.3, p. 719-31. 2016.

CENIT, M. C. *et al.* No evidence of association between functional polymorphisms located within IL6R and IL6ST genes and systemic sclerosis. **Tissue Antigens.** v. 80, n.3, p. 254-8. 2012.

CERIOTTI, F. *et al.* Reference intervals for serum creatinine concentrations: assessment of available data for global application. **Clin Chem.** v. 54, n.3, p. 559-66. 2008.

CHALARIS, A. *et al.* Apoptosis is a natural stimulus of IL6R shedding and contributes to the proinflammatory trans-signaling function of neutrophils. **Blood.** v. 110, n.6, p. 1748-55. 2007.

CHATENOUD, L.; BLUESTONE, J. A. CD3-specific antibodies: a portal to the treatment of autoimmunity. **Nat Rev Immunol.** v. 7, n.8, p. 622-32. 2007.

CHERNAUSEK, S. D. *et al.* Relationship Between Parental Diabetes and Presentation of Metabolic and Glycemic Function in Youth With Type 2 Diabetes: Baseline Findings From the TODAY Trial. **Diabetes Care.** v. 39, n.1, p. 110-7. 2016.

COLLABORATION, I. R. G. C. E. R. F. *et al.* Interleukin-6 receptor pathways in coronary heart disease: a collaborative meta-analysis of 82 studies. **Lancet**. v. 379, n.9822, p. 1205-13. 2012.

CONWAY, B. *et al.* Temporal patterns in overweight and obesity in Type 1 diabetes. **Diabet Med**. v. 27, n.4, p. 398-404. 2010.

COOPER, J. D. *et al.* The candidate genes TAF5L, TCF7, PDCD1, IL6 and ICAM1 cannot be excluded from having effects in type 1 diabetes. **BMC Med Genet**. v. 8, p. 71. 2007.

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.

COSTENBADER, K. H. *et al.* Reproductive and menopausal factors and risk of systemic lupus erythematosus in women. **Arthritis Rheum**. v. 56, n.4, p. 1251-62. 2007.

COSTENBADER, K. H. *et al.* Genes, epigenetic regulation and environmental factors: which is the most relevant in developing autoimmune diseases? **Autoimmun Rev**. v. 11, n.8, p. 604-9. 2012.

CULINA, S. *et al.* Islet-reactive CD8(+) T cell frequencies in the pancreas, but not in blood, distinguish type 1 diabetic patients from healthy donors. **Sci Immunol**. v. 3, n.20, p. 2018.

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.

DANIK, J. S. *et al.* Novel loci, including those related to Crohn disease, psoriasis, and inflammation, identified in a genome-wide association study of fibrinogen in 17 686 women: the Women's Genome Health Study. **Circ Cardiovasc Genet**. v. 2, n.2, p. 134-41. 2009.

DE BOSSCHER, K. *et al.* Glucocorticoids repress NF-kappaB-driven genes by disturbing the interaction of p65 with the basal transcription machinery, irrespective of coactivator levels in the cell. **Proc Natl Acad Sci U S A**. v. 97, n.8, p. 3919-24. 2000.

DEGHAN, A. *et al.* Meta-analysis of genome-wide association studies in >80 000 subjects identifies multiple loci for C-reactive protein levels. **Circulation**. v. 123, n.7, p. 731-8. 2011.

DELVECCHIO, M. *et al.* Monogenic Diabetes Accounts for 6.3% of Cases Referred to 15 Italian Pediatric Diabetes Centers During 2007 to 2012. **J Clin Endocrinol Metab**. v. 102, n.6, p. 1826-1834. 2017.

DENDORFER, U.; OETTGEN, P.; LIBERMANN, T. A. Multiple regulatory elements in the interleukin-6 gene mediate induction by prostaglandins, cyclic AMP, and lipopolysaccharide. **Mol Cell Biol**. v. 14, n.7, p. 4443-54. 1994.

DI CIANNI, G. *et al.* Prevalence and risk factors for gestational diabetes assessed by universal screening. **Diabetes Res Clin Pract.** v. 62, n.2, p. 131-7. 2003.

DIMEGLIO, L. A.; EVANS-MOLINA, C.; ORAM, R. A. Type 1 diabetes. **Lancet.** v. 391, n.10138, p. 2449-2462. 2018.

DINARELLO, C. A. IL-18: A TH1-inducing, proinflammatory cytokine and new member of the IL-1 family. **J Allergy Clin Immunol.** v. 103, n.1 Pt 1, p. 11-24. 1999.

DONG, G. *et al.* Serum interleukin-18 levels are raised in diabetic ketoacidosis in Chinese children with type 1 diabetes mellitus. **Indian Pediatr.** v. 44, n.10, p. 732-6. 2007.

DONG, G. P. *et al.* IL-18 gene promoter -137C/G and -607C/A polymorphisms in Chinese Han children with type 1 diabetes mellitus. **Int J Immunogenet.** v. 34, n.2, p. 75-9. 2007.

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.

DUNCAN, J. A. *et al.* Neisseria gonorrhoeae activates the proteinase cathepsin B to mediate the signaling activities of the NLRP3 and ASC-containing inflammasome. **J Immunol.** v. 182, n.10, p. 6460-9. 2009.

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

DUNLOP, R. J.; CAMPBELL, C. W. Cytokines and advanced cancer. **J Pain Symptom Manage.** v. 20, n.3, p. 214-32. 2000.

EISENBARTH, G. S. Autoimmune beta cell insufficiency—diabetes mellitus type 1. **Triangle.** v. 23, p. 14. 1984.

ELEFTHEROHORINO, H. *et al.* Pathway-driven gene stability selection of two rheumatoid arthritis GWAS identifies and validates new susceptibility genes in receptor mediated signalling pathways. **Hum Mol Genet.** v. 20, n.17, p. 3494-506. 2011.

ELLIOTT, P. *et al.* Genetic Loci associated with C-reactive protein levels and risk of coronary heart disease. **JAMA.** v. 302, n.1, p. 37-48. 2009.

ESCOBAR-MORREALE, H. F. *et al.* Association of polymorphisms in the interleukin 6 receptor complex with obesity and hyperandrogenism. **Obes Res.** v. 11, n.8, p. 987-96. 2003.

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

EVANS, J. M. *et al.* Socio-economic status, obesity and prevalence of Type 1 and Type 2 diabetes mellitus. **Diabet Med.** v. 17, n.6, p. 478-80. 2000.

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.

FERNANDES-ALNEMRI, T. *et al.* The pyroptosome: a supramolecular assembly of ASC dimers mediating inflammatory cell death via caspase-1 activation. **Cell Death Differ.** v. 14, n.9, p. 1590-604. 2007.

FERRARI, D. *et al.* Purinergic modulation of interleukin-1 beta release from microglial cells stimulated with bacterial endotoxin. **J Exp Med.** v. 185, n.3, p. 579-82. 1997.

FERREIRA, R. C. *et al.* Functional IL6R 358Ala allele impairs classical IL-6 receptor signaling and influences risk of diverse inflammatory diseases. **PLoS Genet.** v. 9, n.4, p. e1003444. 2013.

FILIPPINI, A.; TAFFS, R. E.; SITKOVSKY, M. V. Extracellular ATP in T-lymphocyte activation: possible role in effector functions. **Proc Natl Acad Sci U S A.** v. 87, n.21, p. 8267-71. 1990.

FISHMAN, D. *et al.* The effect of novel polymorphisms in the interleukin-6 (IL-6) gene on IL-6 transcription and plasma IL-6 levels, and an association with systemic-onset juvenile chronic arthritis. **J Clin Invest.** v. 102, n.7, p. 1369-76. 1998.

FOULIS, A. K. *et al.* The histopathology of the pancreas in type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus: a 25-year review of deaths in patients under 20 years of age in the United Kingdom. **Diabetologia.** v. 29, n.5, p. 267-74. 1986.

FOULIS, A. K.; STEWART, J. A. The pancreas in recent-onset type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus: insulin content of islets, insulinitis and associated changes in the exocrine acinar tissue. **Diabetologia.** v. 26, n.6, p. 456-61. 1984.

FRIGERIO, S.; HOLLANDER, G. A.; ZUMSTEG, U. Functional IL-18 Is produced by primary pancreatic mouse islets and NIT-1 beta cells and participates in the progression towards destructive insulinitis. **Horm Res.** v. 57, n.3-4, p. 94-104. 2002.

GARBERS, C. *et al.* Species specificity of ADAM10 and ADAM17 proteins in interleukin-6 (IL-6) trans-signaling and novel role of ADAM10 in inducible IL-6 receptor shedding. **J Biol Chem.** v. 286, n.17, p. 14804-11. 2011.

GARBERS, C. *et al.* The interleukin-6 receptor Asp358Ala single nucleotide polymorphism rs2228145 confers increased proteolytic conversion rates by ADAM proteases. **Biochim Biophys Acta.** v. 1842, n.9, p. 1485-94. 2014.

GARCIA-OSCOS, F. *et al.* Vagal nerve stimulation blocks interleukin 6-dependent synaptic hyperexcitability induced by lipopolysaccharide-induced acute stress in the rodent prefrontal cortex. **Brain Behav Immun.** v. 43, p. 149-58. 2015.

GIEDRAITIS, V. *et al.* Cloning and mutation analysis of the human IL-18 promoter: a possible role of polymorphisms in expression regulation. **J Neuroimmunol.** v. 112, n.1-2, p. 146-52. 2001.

GILLESPIE, K. M. *et al.* Is puberty an accelerator of type 1 diabetes in IL6-174CC females? **Diabetes.** v. 54, n.4, p. 1245-8. 2005.

GOMES, M. B. *et al.* Prevalence of adults with type 1 diabetes who meet the goals of care in daily clinical practice: a nationwide multicenter study in Brazil. **Diabetes Res Clin Pract.** v. 97, n.1, p. 63-70. 2012.

GRIVENNIKOV, S. *et al.* IL-6 and Stat3 are required for survival of intestinal epithelial cells and development of colitis-associated cancer. **Cancer Cell.** v. 15, n.2, p. 103-13. 2009.

GROOP, L.; POCIOT, F. Genetics of diabetes--are we missing the genes or the disease? **Mol Cell Endocrinol.** v. 382, n.1, p. 726-739. 2014.

GROSS, O. *et al.* Syk kinase signalling couples to the Nlrp3 inflammasome for anti-fungal host defence. **Nature.** v. 459, n.7245, p. 433-6. 2009.

GURCEL, L. *et al.* Caspase-1 activation of lipid metabolic pathways in response to bacterial pore-forming toxins promotes cell survival. **Cell.** v. 126, n.6, p. 1135-45. 2006.

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

HADZIJA, M. P. *et al.* Polymorphisms in the IL-18 and IL-12B genes and their association with the clinical outcome in Croatian patients with Type 1 diabetes. **Gene.** v. 512, n.2, p. 477-81. 2013.

HAMID, Y. H. *et al.* Variations of the interleukin-6 promoter are associated with features of the metabolic syndrome in Caucasian Danes. **Diabetologia.** v. 48, n.2, p. 251-60. 2005.

HAMID, Y. H. *et al.* Variation in the interleukin-6 receptor gene associates with type 2 diabetes in Danish whites. **Diabetes.** v. 53, n.12, p. 3342-5. 2004.

HANIFI-MOGHADDAM, P. *et al.* An association of autoantibody status and serum cytokine levels in type 1 diabetes. **Diabetes.** v. 52, n.5, p. 1137-42. 2003.

HASHIZUME, M.; HAYAKAWA, N.; MIHARA, M. IL-6 trans-signalling directly induces RANKL on fibroblast-like synovial cells and is involved in RANKL induction by TNF-alpha and IL-17. **Rheumatology (Oxford).** v. 47, n.11, p. 1635-40. 2008.

HASHIZUME, M.; MIHARA, M. High molecular weight hyaluronic acid inhibits IL-6-induced MMP production from human chondrocytes by up-regulating the ERK inhibitor, MKP-1. **Biochem Biophys Res Commun.** v. 403, n.2, p. 184-9. 2010.

HEIER, M. *et al.* Inflammation in childhood type 1 diabetes; influence of glycemic control. **Atherosclerosis**. v. 238, n.1, p. 33-7. 2015.

HEINRICH, P. C. *et al.* Interleukin-6-type cytokine signalling through the gp130/Jak/STAT pathway. **Biochem J**. v. 334 (Pt 2), p. 297-314. 1998.

HERMANN, C. *et al.* Association between interleukin-6 polymorphism and age-at-onset of type 1 diabetes. Epistatic influences of the tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1beta polymorphisms. **Eur Cytokine Netw**. v. 16, n.4, p. 277-81. 2005.

HIBI, M. *et al.* Molecular cloning and expression of an IL-6 signal transducer, gp130. **Cell**. v. 63, n.6, p. 1149-57. 1990.

HIRANO, T.; NAKAJIMA, K.; HIBI, M. Signaling mechanisms through gp130: a model of the cytokine system. **Cytokine Growth Factor Rev**. v. 8, n.4, p. 241-52. 1997.

HODES, G. E.; MENARD, C.; RUSSO, S. J. Integrating Interleukin-6 into depression diagnosis and treatment. **Neurobiol Stress**. v. 4, p. 15-22. 2016.

HOLMAN, N.; YOUNG, B.; GADSBY, R. Current prevalence of Type 1 and Type 2 diabetes in adults and children in the UK. **Diabet Med**. v. 32, n.9, p. 1119-20. 2015.

HOPE, S. V. *et al.* Practical Classification Guidelines for Diabetes in patients treated with insulin: a cross-sectional study of the accuracy of diabetes diagnosis. **Br J Gen Pract**. v. 66, n.646, p. e315-22. 2016.

HOPKINS, S. J. The pathophysiological role of cytokines. **Leg Med (Tokyo)**. v. 5 Suppl 1, p. S45-57. 2003.

HORIUCHI, S. *et al.* High-level production of alternatively spliced soluble interleukin-6 receptor in serum of patients with adult T-cell leukaemia/HTLV-I-associated myelopathy. **Immunology**. v. 95, n.3, p. 360-9. 1998.

HOSHINO, T.; WILTROUT, R. H.; YOUNG, H. A. IL-18 is a potent coinducer of IL-13 in NK and T cells: a new potential role for IL-18 in modulating the immune response. **J Immunol**. v. 162, n.9, p. 5070-7. 1999.

HULL, C. M.; PEAKMAN, M.; TREE, T. I. M. Regulatory T cell dysfunction in type 1 diabetes: what's broken and how can we fix it? **Diabetologia**. v. 60, n.10, p. 1839-1850. 2017.

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

HUNDHAUSEN, C. *et al.* Enhanced T cell responses to IL-6 in type 1 diabetes are associated with early clinical disease and increased IL-6 receptor expression. **Sci Transl Med**. v. 8, n.356, p. 356ra119. 2016.

IDE, A. *et al.* Association of interleukin-18 gene promoter polymorphisms in type 1 diabetes and autoimmune thyroid disease. **Ann N Y Acad Sci.** v. 1005, p. 436-9. 2003.

IDE, A. *et al.* Association between IL-18 gene promoter polymorphisms and CTLA-4 gene 49A/G polymorphism in Japanese patients with type 1 diabetes. **J Autoimmun.** v. 22, n.1, p. 73-8. 2004.

IDE, A. *et al.* Genetic association between interleukin-10 gene promoter region polymorphisms and type 1 diabetes age-at-onset. **Hum Immunol.** v. 63, n.8, p. 690-5. 2002.

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.

IN'T VELD, P. *et al.* Beta-cell replication is increased in donor organs from young patients after prolonged life support. **Diabetes.** v. 59, n.7, p. 1702-8. 2010.

INSEL, R. A. *et al.* Staging presymptomatic type 1 diabetes: a scientific statement of JDRF, the Endocrine Society, and the American Diabetes Association. **Diabetes Care.** v. 38, n.10, p. 1964-74. 2015.

INTERLEUKIN-6 RECEPTOR MENDELIAN RANDOMISATION ANALYSIS, C. *et al.* The interleukin-6 receptor as a target for prevention of coronary heart disease: a mendelian randomisation analysis. **Lancet.** v. 379, n.9822, p. 1214-24. 2012.

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.

JAHROMI, M.; MILLWARD, A.; DEMAINE, A. A CA repeat polymorphism of the IFN-gamma gene is associated with susceptibility to type 1 diabetes. **J Interferon Cytokine Res.** v. 20, n.2, p. 187-90. 2000.

JAHROMI, M. M.; MILLWARD, B. A.; DEMAINE, A. G. A polymorphism in the promoter region of the gene for interleukin-6 is associated with susceptibility to type 1 diabetes mellitus. **J Interferon Cytokine Res.** v. 20, n.10, p. 885-8. 2000.

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.

JAVOR, J. *et al.* Polymorphisms in the genes encoding TGF-beta1, TNF-alpha, and IL-6 show association with type 1 diabetes mellitus in the Slovak population. **Arch Immunol Ther Exp (Warsz).** v. 58, n.5, p. 385-93. 2010.

JEON, J. Y. *et al.* The interleukin 6 receptor alpha gene polymorphisms are associated with clinical manifestations of systemic lupus erythematosus in Koreans. **Int J Immunogenet.** v. 40, n.5, p. 356-60. 2013.

JONES, A. G.; HATTERSLEY, A. T. The clinical utility of C-peptide measurement in the care of patients with diabetes. **Diabet Med.** v. 30, n.7, p. 803-17. 2013.

JOSTOCK, T. *et al.* Soluble gp130 is the natural inhibitor of soluble interleukin-6 receptor transsignaling responses. **Eur J Biochem.** v. 268, n.1, p. 160-7. 2001.

KALINA, U. *et al.* Genomic organization and regulation of the human interleukin-18 gene. **Scand J Immunol.** v. 52, n.6, p. 525-30. 2000.

KAMIMURA, D.; ISHIHARA, K.; HIRANO, T. IL-6 signal transduction and its physiological roles: the signal orchestration model. **Rev Physiol Biochem Pharmacol.** v. 149, p. 1-38. 2003.

KAPELSKI, P. *et al.* Association study of functional polymorphisms in interleukins and interleukin receptors genes: IL1A, IL1B, IL1RN, IL6, IL6R, IL10, IL10RA and TGFB1 in schizophrenia in Polish population. **Schizophr Res.** v. 169, n.1-3, p. 1-9. 2015.

KAPLANSKI, G. Interleukin-18: Biological properties and role in disease pathogenesis. **Immunol Rev.** v. 281, n.1, p. 138-153. 2018.

KATAKAMI, N. *et al.* Serum interleukin-18 levels are increased and closely associated with various soluble adhesion molecule levels in type 1 diabetic patients. **Diabetes Care.** v. 30, n.1, p. 159-61. 2007.

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

KIM, E. Y.; MOUDGIL, K. D. Regulation of autoimmune inflammation by pro-inflammatory cytokines. **Immunol Lett.** v. 120, n.1-2, p. 1-5. 2008.

KNIP, M. *et al.* Humoral beta-cell autoimmunity in relation to HLA-defined disease susceptibility in preclinical and clinical type 1 diabetes. **Am J Med Genet.** v. 115, n.1, p. 48-54. 2002.

KRETOWSKI, A. *et al.* Interleukin-18 promoter polymorphisms in type 1 diabetes. **Diabetes.** v. 51, n.11, p. 3347-9. 2002.

KRISCHER, J. P. *et al.* The 6 year incidence of diabetes-associated autoantibodies in genetically at-risk children: the TEDDY study. **Diabetologia.** v. 58, n.5, p. 980-7. 2015.

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

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.

KROGVOLD, L. *et al.* Function of Isolated Pancreatic Islets From Patients at Onset of Type 1 Diabetes: Insulin Secretion Can Be Restored After Some Days in a Nondiabetogenic Environment In Vitro: Results From the DiViD Study. **Diabetes**. v. 64, n.7, p. 2506-12. 2015.

KUBASZEK, A. *et al.* The C-174G promoter polymorphism of the IL-6 gene affects energy expenditure and insulin sensitivity. **Diabetes**. v. 52, n.2, p. 558-61. 2003.

KUNZ, M.; IBRAHIM, S. M. Cytokines and cytokine profiles in human autoimmune diseases and animal models of autoimmunity. **Mediators Inflamm**. v. 2009, p. 979258. 2009.

KURIC, E. *et al.* Demonstration of Tissue Resident Memory CD8 T Cells in Insulitic Lesions in Adult Patients with Recent-Onset Type 1 Diabetes. **Am J Pathol**. v. 187, n.3, p. 581-588. 2017.

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.

LAMAS, J. R., L.; TORNERO-ESTEBAN, P. ET AL. Mechanisms underlying the generation of soluble IL-6 soluble receptor (sIL-6R) in rheumatoid arthritis: mRNA alternative splicing and proteolytic cleavage as independent contributors. **Arthritis Rheum**. v. 63, p. 383. 2011.

LARCOMBE, L. A. *et al.* Functional gene polymorphisms in canadian aboriginal populations with high rates of tuberculosis. **J Infect Dis**. v. 198, n.8, p. 1175-9. 2008.

LEBEL-BINAY, S. *et al.* Interleukin-18: biological properties and clinical implications. **Eur Cytokine Netw**. v. 11, n.1, p. 15-26. 2000.

LEE, Y. H.; KIM, J. H.; SONG, G. G. Interleukin-18 promoter -607 C/A and -137 G/C polymorphisms and susceptibility to type 1 diabetes: A meta-analysis. **Hum Immunol**. v. 76, n.8, p. 537-45. 2015.

LEE, Y. S. *et al.* The relationship of histologic activity to serum ALT, HCV genotype and HCV RNA titers in chronic hepatitis C. **J Korean Med Sci**. v. 16, n.5, p. 585-91. 2001.

LEEDS, J. S. *et al.* Abnormal liver function tests in patients with Type 1 diabetes mellitus: prevalence, clinical correlations and underlying pathologies. **Diabet Med**. v. 26, n.12, p. 1235-41. 2009.

LEETE, P. *et al.* Differential Insulitic Profiles Determine the Extent of beta-Cell Destruction and the Age at Onset of Type 1 Diabetes. **Diabetes**. v. 65, n.5, p. 1362-9. 2016.

LEVEY, A. S. *et al.* Chronic kidney disease as a global public health problem: approaches and initiatives - a position statement from Kidney Disease Improving Global Outcomes. **Kidney Int.** v. 72, n.3, p. 247-59. 2007.

LEWIS, E. C.; DINARELLO, C. A. Responses of IL-18- and IL-18 receptor-deficient pancreatic islets with convergence of positive and negative signals for the IL-18 receptor. **Proc Natl Acad Sci U S A.** v. 103, n.45, p. 16852-7. 2006.

LIBERMANN, T. A.; BALTIMORE, D. Activation of interleukin-6 gene expression through the NF-kappa B transcription factor. **Mol Cell Biol.** v. 10, n.5, p. 2327-34. 1990.

LIPPONEN, K. *et al.* Effect of HLA class I and class II alleles on progression from autoantibody positivity to overt type 1 diabetes in children with risk-associated class II genotypes. **Diabetes.** v. 59, n.12, p. 3253-6. 2010.

LONG, A. E. *et al.* Rising incidence of type 1 diabetes is associated with altered immunophenotype at diagnosis. **Diabetes.** v. 61, n.3, p. 683-6. 2012.

LUNDBERG, M. *et al.* Expression of Interferon-Stimulated Genes in Insulitic Pancreatic Islets of Patients Recently Diagnosed With Type 1 Diabetes. **Diabetes.** v. 65, n.10, p. 3104-10. 2016.

LUST, J. A. *et al.* Isolation of an mRNA encoding a soluble form of the human interleukin-6 receptor. **Cytokine.** v. 4, n.2, p. 96-100. 1992.

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

MARIATHASAN, S. *et al.* Cryopyrin activates the inflammasome in response to toxins and ATP. **Nature.** v. 440, n.7081, p. 228-32. 2006.

MARINO, I. *et al.* A gain of function polymorphism in the interleukin 6 receptor influences RA susceptibility. **Ann Rheum Dis.** v. 69, n.6, p. 1191-4. 2010.

MARLEAU, A. M.; SARVETNICK, N. E. IL-18 is required for self-reactive T cell expansion in NOD mice. **J Autoimmun.** v. 36, n.3-4, p. 263-77. 2011.

MARTIN, R. J. *et al.* Interleukin 18 promoter polymorphisms are not strongly associated with type I diabetes in a UK population. **Genes Immun.** v. 6, n.2, p. 171-4. 2005.

MARTIN, R. J. E. A. Interleukin 18 promoter polymorphisms are not strongly associated with type I diabetes in a UK population. **Genes Immun.** v. 6, n.2, p. 171-174. 2005.

MARTINO, L. *et al.* Mast cells infiltrate pancreatic islets in human type 1 diabetes. **Diabetologia.** v. 58, n.11, p. 2554-62. 2015.

MARTINON, F.; BURNS, K.; TSCHOPP, J. The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta. **Mol Cell**. v. 10, n.2, p. 417-26. 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, K. A. *et al.* Identification of Tetraspanin-7 as a Target of Autoantibodies in Type 1 Diabetes. **Diabetes**. v. 65, n.6, p. 1690-8. 2016.

MEIJERMAN, I. *et al.* Pharmacogenetic screening of the gene deletion and duplications of CYP2D6. **Drug Metab Rev**. v. 39, n.1, p. 45-60. 2007.

MELZER, D. *et al.* A genome-wide association study identifies protein quantitative trait loci (pQTLs). **PLoS Genet**. v. 4, n.5, p. e1000072. 2008.

MIHARA, M. *et al.* IL-6/IL-6 receptor system and its role in physiological and pathological conditions. **Clin Sci (Lond)**. v. 122, n.4, p. 143-59. 2012.

MIKHAILIDIS, D. P.; ATHYROS, V. G. Dyslipidaemia in 2013: New statin guidelines and promising novel therapeutics. **Nat Rev Cardiol**. v. 11, n.2, p. 72-4. 2014.

MOJTAHEDI, Z. *et al.* Association of IL-18 promoter polymorphisms with predisposition to Type 1 diabetes. **Diabet Med**. v. 23, n.3, p. 235-9. 2006.

MORGAN, N. G. Bringing the human pancreas into focus: new paradigms for the understanding of Type 1 diabetes. **Diabet Med**. v. 34, n.7, p. 879-886. 2017.

MORGAN, N. G. *et al.* Islet inflammation in human type 1 diabetes mellitus. **IUBMB Life**. v. 66, n.11, p. 723-34. 2014.

MULLBERG, J. *et al.* The soluble human IL-6 receptor. Mutational characterization of the proteolytic cleavage site. **J Immunol**. v. 152, n.10, p. 4958-68. 1994.

MULLBERG, J. *et al.* The soluble interleukin-6 receptor is generated by shedding. **Eur J Immunol**. v. 23, n.2, p. 473-80. 1993.

MUNDER, M. *et al.* Murine macrophages secrete interferon gamma upon combined stimulation with interleukin (IL)-12 and IL-18: A novel pathway of autocrine macrophage activation. **J Exp Med**. v. 187, n.12, p. 2103-8. 1998.

MURAKAMI, M.; HIRANO, T. The pathological and physiological roles of IL-6 amplifier activation. **Int J Biol Sci**. v. 8, n.9, p. 1267-80. 2012.

MURUVE, D. A. *et al.* The inflammasome recognizes cytosolic microbial and host DNA and triggers an innate immune response. **Nature**. v. 452, n.7183, p. 103-7. 2008.

MYSLIWIEC, M. *et al.* Interleukin 6 -174(G>C) gene polymorphism is related to celiac disease and autoimmune thyroiditis coincidence in diabetes type 1 children. **Diabetes Res Clin Pract.** v. 82, n.1, p. 108-12. 2008.

MYSLIWSKA, J. *et al.* The -174GG interleukin-6 genotype is protective from retinopathy and nephropathy in juvenile onset type 1 diabetes mellitus. **Pediatr Res.** v. 66, n.3, p. 341-5. 2009.

NADEEM, A. *et al.* Association of IL-6 C-174G (rs 1800795) single nucleotide polymorphism with type 2 diabetes mellitus in Pakistani population. **J Pak Med Assoc.** v. 67, n.3, p. 428-433. 2017.

NAITZA, S. *et al.* A genome-wide association scan on the levels of markers of inflammation in Sardinians reveals associations that underpin its complex regulation. **PLoS Genet.** v. 8, n.1, p. e1002480. 2012.

NAKAHIRA, M. *et al.* Synergy of IL-12 and IL-18 for IFN-gamma gene expression: IL-12-induced STAT4 contributes to IFN-gamma promoter activation by up-regulating the binding activity of IL-18-induced activator protein 1. **J Immunol.** v. 168, n.3, p. 1146-53. 2002.

NAKANISHI, K. *et al.* Interleukin-18 is a unique cytokine that stimulates both Th1 and Th2 responses depending on its cytokine milieu. **Cytokine Growth Factor Rev.** v. 12, n.1, p. 53-72. 2001a.

NAKANISHI, K. *et al.* Interleukin-18 regulates both Th1 and Th2 responses. **Annu Rev Immunol.** v. 19, p. 423-74. 2001b.

NAMIPASHAKI, A.; RAZAGHI-MOGHADAM, Z.; ANSARI-POUR, N. The Essentiality of Reporting Hardy-Weinberg Equilibrium Calculations in Population-Based Genetic Association Studies. **Cell J.** v. 17, n.2, p. 187-92. 2015.

NARAZAKI, M. *et al.* Soluble forms of the interleukin-6 signal-transducing receptor component gp130 in human serum possessing a potential to inhibit signals through membrane-anchored gp130. **Blood.** v. 82, n.4, p. 1120-6. 1993.

NAUCK, M. *et al.* The interleukin-6 G(-174)C promoter polymorphism in the LURIC cohort: no association with plasma interleukin-6, coronary artery disease, and myocardial infarction. **J Mol Med (Berl).** v. 80, n.8, p. 507-13. 2002.

NICOLETTI, F. *et al.* Serum levels of the interferon-gamma-inducing cytokine interleukin-18 are increased in individuals at high risk of developing type I diabetes. **Diabetologia.** v. 44, n.3, p. 309-11. 2001.

NISHIMOTO, N. *et al.* IL-6 inhibits the proliferation of fibroblastic synovial cells from rheumatoid arthritis patients in the presence of soluble IL-6 receptor. **Int Immunol.** v. 12, n.2, p. 187-93. 2000.

NORTH, R. A. Molecular physiology of P2X receptors. **Physiol Rev.** v. 82, n.4, p. 1013-67. 2002.

NOVOTA, P. *et al.* Interleukin IL-18 gene promoter polymorphisms in adult patients with type 1 diabetes mellitus and latent autoimmune diabetes in adults. **Immunol Lett.** v. 96, n.2, p. 247-51. 2005.

NOVOTA, P. K., K.; PINTEROVA, D.; NOVAK, J.; TRESLOVA, L.; ANDEL, M. ET AL. Interleukin IL-18 gene promoter polymorphisms in adult patients with type 1 diabetes mellitus and latent autoimmune diabetes in adult. **Immunol Lett.** v. 96, p. 247-251. 2005.

OGURTSOVA, K. *et al.* IDF Diabetes Atlas: Global estimates for the prevalence of diabetes for 2015 and 2040. **Diabetes Res Clin Pract.** v. 128, p. 40-50. 2017.

OKAMURA, H. *et al.* Cloning of a new cytokine that induces IFN-gamma production by T cells. **Nature.** v. 378, n.6552, p. 88-91. 1995.

OLEE, T. *et al.* IL-18 is produced by articular chondrocytes and induces proinflammatory and catabolic responses. **J Immunol.** v. 162, n.2, p. 1096-100. 1999.

OMOTO, Y. *et al.* Human mast cell chymase cleaves pro-IL-18 and generates a novel and biologically active IL-18 fragment. **J Immunol.** v. 177, n.12, p. 8315-9. 2006.

OMOTO, Y. *et al.* Granzyme B is a novel interleukin-18 converting enzyme. **J Dermatol Sci.** v. 59, n.2, p. 129-35. 2010.

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.

OUNISSI-BENKALHA, H.; POLYCHRONAKOS, C. The molecular genetics of type 1 diabetes: new genes and emerging mechanisms. **Trends Mol Med.** v. 14, n.6, p. 268-75. 2008.

PAN, H. F.; LENG, R. X.; YE, D. Q. Lack of association of interleukin-18 gene promoter -607 A/C polymorphism with susceptibility to autoimmune diseases: a meta-analysis. **Lupus.** v. 20, n.9, p. 945-51. 2011.

PEREZ-BRAVO, F. *et al.* [-174 G/C polymorphism of interleukin 6 gene in women with type 1 diabetes]. **Rev Med Chil.** v. 139, n.2, p. 158-64. 2011.

PERREGAUX, D. G. *et al.* ATP acts as an agonist to promote stimulus-induced secretion of IL-1 beta and IL-18 in human blood. **J Immunol.** v. 165, n.8, p. 4615-23. 2000.

PETRILLI, V. *et al.* Activation of the NALP3 inflammasome is triggered by low intracellular potassium concentration. **Cell Death Differ.** v. 14, n.9, p. 1583-9. 2007.

PICCINI, A. *et al.* ATP is released by monocytes stimulated with pathogen-sensing receptor ligands and induces IL-1 β and IL-18 secretion in an autocrine way. **Proc Natl Acad Sci U S A.** v. 105, n.23, p. 8067-72. 2008.

PIHOKER, C. *et al.* Prevalence, characteristics and clinical diagnosis of maturity onset diabetes of the young due to mutations in HNF1A, HNF4A, and glucokinase: results from the SEARCH for Diabetes in Youth. **J Clin Endocrinol Metab.** v. 98, n.10, p. 4055-62. 2013.

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.

PUREN, A. J. *et al.* Interleukin-18 enhances lipopolysaccharide-induced interferon- γ production in human whole blood cultures. **J Infect Dis.** v. 178, n.6, p. 1830-4. 1998.

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

QI, L.; RIFAI, N.; HU, F. B. Interleukin-6 receptor gene variations, plasma interleukin-6 levels, and type 2 diabetes in U.S. Women. **Diabetes.** v. 56, n.12, p. 3075-81. 2007.

RABE, B. *et al.* Transgenic blockade of interleukin 6 transsignaling abrogates inflammation. **Blood.** v. 111, n.3, p. 1021-8. 2008.

RAFIQ, S. *et al.* A common variant of the interleukin 6 receptor (IL-6r) gene increases IL-6r and IL-6 levels, without other inflammatory effects. **Genes Immun.** v. 8, n.7, p. 552-9. 2007.

RAM, R.; MORAHAN, G. Effects of Type 1 Diabetes Risk Alleles on Immune Cell Gene Expression. **Genes (Basel).** v. 8, n.6, p. 2017.

RAY, A.; PREFONTAINE, K. E. Physical association and functional antagonism between the p65 subunit of transcription factor NF- κ B and the glucocorticoid receptor. **Proc Natl Acad Sci U S A.** v. 91, n.2, p. 752-6. 1994.

REDDY, P. Interleukin-18: recent advances. **Curr Opin Hematol.** v. 11, n.6, p. 405-10. 2004.

REDDY, S. *et al.* Distribution of IL-1 β immunoreactive cells in pancreatic biopsies from living volunteers with new-onset type 1 diabetes: comparison with donors without diabetes and with longer duration of disease. **Diabetologia.** v. 61, n.6, p. 1362-1373. 2018.

REICH, D. *et al.* Admixture mapping of an allele affecting interleukin 6 soluble receptor and interleukin 6 levels. **Am J Hum Genet.** v. 80, n.4, p. 716-26. 2007.

RICHARDSON, S. J. *et al.* Islet cell hyperexpression of HLA class I antigens: a defining feature in type 1 diabetes. **Diabetologia.** v. 59, n.11, p. 2448-2458. 2016.

RIDKER, P. M. *et al.* Loci related to metabolic-syndrome pathways including LEPR, HNF1A, IL6R, and GCKR associate with plasma C-reactive protein: the Women's Genome Health Study. **Am J Hum Genet.** v. 82, n.5, p. 1185-92. 2008.

ROEP, B. O. *et al.* Islet inflammation and CXCL10 in recent-onset type 1 diabetes. **Clin Exp Immunol.** v. 159, n.3, p. 338-43. 2010.

ROSE-JOHN, S. IL-6 trans-signaling via the soluble IL-6 receptor: importance for the pro-inflammatory activities of IL-6. **Int J Biol Sci.** v. 8, n.9, p. 1237-47. 2012.

ROSE-JOHN, S. The Soluble Interleukin 6 Receptor: Advanced Therapeutic Options in Inflammation. **Clin Pharmacol Ther.** v. 102, n.4, p. 591-598. 2017.

ROSE-JOHN, S. *et al.* Structural and functional studies on the human interleukin-6 receptor. Binding, cross-linking, internalization, and degradation of interleukin-6 by fibroblasts transfected with human interleukin-6-receptor cDNA. **J Biol Chem.** v. 266, n.6, p. 3841-6. 1991.

ROSE-JOHN, S.; NEURATH, M. F. IL-6 trans-signaling: the heat is on. **Immunity.** v. 20, n.1, p. 2-4. 2004.

ROTHER, H. *et al.* Systemic production of interferon-gamma inducing factor (IGIF) versus local IFN-gamma expression involved in the development of Th1 insulinitis in NOD mice. **J Autoimmun.** v. 10, n.3, p. 251-6. 1997.

ROTONDI, M. *et al.* Role of chemokines in endocrine autoimmune diseases. **Endocr Rev.** v. 28, n.5, p. 492-520. 2007.

RUZZO, A. *et al.* Genetic modulation of the interleukin 6 (IL-6) system in patients with advanced gastric cancer: a background for an alternative target therapy. **BMC Cancer.** v. 14, p. 357. 2014.

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.

SABERZADEH-ARDESTANI, B. *et al.* Type 1 Diabetes Mellitus: Cellular and Molecular Pathophysiology at A Glance. **Cell J.** v. 20, n.3, p. 294-301. 2018.

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

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.

SATTAR, N. *et al.* Elevated alanine aminotransferase predicts new-onset type 2 diabetes independently of classical risk factors, metabolic syndrome, and C-reactive protein in the west of Scotland coronary prevention study. **Diabetes**. v. 53, n.11, p. 2855-60. 2004.

SBD. Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes. **Sociedade Brasileira de Diabetes**. v. p. 2016.

SCHELLER, J. *et al.* The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. **Biochim Biophys Acta**. v. 1813, n.5, p. 878-88. 2011.

SCHELLER, J.; ROSE-JOHN, S. The interleukin 6 pathway and atherosclerosis. **Lancet**. v. 380, n.9839, p. 338. 2012.

SCHLEINITZ, D.; DISTEFANO, J. K.; KOVACS, P. Targeted SNP genotyping using the TaqMan(R) assay. **Methods Mol Biol**. v. 700, p. 77-87. 2011.

SCHOTTENFELD, D.; BEEBE-DIMMER, J. Chronic inflammation: a common and important factor in the pathogenesis of neoplasia. **CA Cancer J Clin**. v. 56, n.2, p. 69-83. 2006.

SCHUETT, H. *et al.* How much is too much? Interleukin-6 and its signalling in atherosclerosis. **Thromb Haemost**. v. 102, n.2, p. 215-22. 2009.

SCHULTE, W.; BERNHAGEN, J.; BUCALA, R. Cytokines in sepsis: potent immunoregulators and potential therapeutic targets--an updated view. **Mediators Inflamm**. v. 2013, p. 165974. 2013.

SEDIMBI, S. K.; HAGGLOF, T.; KARLSSON, M. C. IL-18 in inflammatory and autoimmune disease. **Cell Mol Life Sci**. v. 70, n.24, p. 4795-808. 2013.

SETTIN, A. *et al.* Gene polymorphisms of TNF-alpha-308 (G/A), IL-10(-1082) (G/A), IL-6(-174) (G/C) and IL-1Ra (VNTR) in Egyptian cases with type 1 diabetes mellitus. **Autoimmunity**. v. 42, n.1, p. 50-5. 2009.

SHEPHERD, M. *et al.* Systematic Population Screening, Using Biomarkers and Genetic Testing, Identifies 2.5% of the U.K. Pediatric Diabetes Population With Monogenic Diabetes. **Diabetes Care**. v. 39, n.11, p. 1879-1888. 2016.

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

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

SKYLER, J. S. *et al.* Differentiation of Diabetes by Pathophysiology, Natural History, and Prognosis. **Diabetes**. v. 66, n.2, p. 241-255. 2017.

SKYLER, J. S. *et al.* Effects of oral insulin in relatives of patients with type 1 diabetes: The Diabetes Prevention Trial--Type 1. **Diabetes Care**. v. 28, n.5, p. 1068-76. 2005.

SMITH, A. J.; HUMPHRIES, S. E. Cytokine and cytokine receptor gene polymorphisms and their functionality. **Cytokine Growth Factor Rev**. v. 20, n.1, p. 43-59. 2009.

SPOOREN, A. *et al.* Interleukin-6, a mental cytokine. **Brain Res Rev**. v. 67, n.1-2, p. 157-83. 2011.

STEHLIK, C. *et al.* Apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase recruitment domain is a regulator of procaspase-1 activation. **J Immunol**. v. 171, n.11, p. 6154-63. 2003.

STEPHENS, O. W. *et al.* An intermediate-risk multiple myeloma subgroup is defined by sIL-6r: levels synergistically increase with incidence of SNP rs2228145 and 1q21 amplification. **Blood**. v. 119, n.2, p. 503-12. 2012.

STONE, K. *et al.* Interleukin-6 receptor polymorphism is prevalent in HIV-negative Castleman Disease and is associated with increased soluble interleukin-6 receptor levels. **PLoS One**. v. 8, n.1, p. e54610. 2013.

STOYAN, T. *et al.* Recombinant soluble human interleukin-6 receptor. Expression in Escherichia coli, renaturation and purification. **Eur J Biochem**. v. 216, n.1, p. 239-45. 1993.

STUTZ, A.; GOLENBOCK, D. T.; LATZ, E. Inflammasomes: too big to miss. **J Clin Invest**. v. 119, n.12, p. 3502-11. 2009.

SUGAWARA, S. *et al.* Neutrophil proteinase 3-mediated induction of bioactive IL-18 secretion by human oral epithelial cells. **J Immunol**. v. 167, n.11, p. 6568-75. 2001.

SZESZKO, J. S. *et al.* Analysis of polymorphisms of the interleukin-18 gene in type 1 diabetes and Hardy-Weinberg equilibrium testing. **Diabetes**. v. 55, n.2, p. 559-62. 2006.

SZPAKOWICZ, A. *et al.* The rs2228145 polymorphism in the interleukin-6 receptor and its association with long-term prognosis after myocardial infarction in a pilot study. **Arch Med Sci**. v. 13, n.1, p. 93-99. 2017.

TAGA, T. *et al.* Receptors for B cell stimulatory factor 2. Quantitation, specificity, distribution, and regulation of their expression. **J Exp Med**. v. 166, n.4, p. 967-81. 1987.

TALAAT, I. M. *et al.* Association between type 1, type 2 cytokines, diabetic autoantibodies and 25-hydroxyvitamin D in children with type 1 diabetes. **J Endocrinol Invest**. v. 39, n.12, p. 1425-1434. 2016.

TANAKA, T.; KISHIMOTO, T. The biology and medical implications of interleukin-6. **Cancer Immunol Res.** v. 2, n.4, p. 288-94. 2014.

TARNOWSKI, M. *et al.* IL16 and IL18 gene polymorphisms in women with gestational diabetes. **Ginekol Pol.** v. 88, n.5, p. 249-254. 2017.

TAVARES, N. A. *et al.* Interleukin 18 (IL18) gene promoter polymorphisms are associated with type 1 diabetes mellitus in Brazilian patients. **Cytokine.** v. 62, n.2, p. 286-9. 2013.

TERRY, C. F.; LOUKACI, V.; GREEN, F. R. Cooperative influence of genetic polymorphisms on interleukin 6 transcriptional regulation. **J Biol Chem.** v. 275, n.24, p. 18138-44. 2000.

THOMAS, N. J. *et al.* Frequency and phenotype of type 1 diabetes in the first six decades of life: a cross-sectional, genetically stratified survival analysis from UK Biobank. **Lancet Diabetes Endocrinol.** v. 6, n.2, p. 122-129. 2018.

THOMPSON, S. R.; HUMPHRIES, S. E. Interleukin-18 genetics and inflammatory disease susceptibility. **Genes Immun.** v. 8, n.2, p. 91-9. 2007.

TODD, J. A.; BELL, J. I.; MCDEVITT, H. O. HLA-DQ beta gene contributes to susceptibility and resistance to insulin-dependent diabetes mellitus. **Nature.** v. 329, n.6140, p. 599-604. 1987.

TSIAVOU, A. *et al.* TNF-alpha, TGF-beta1, IL-10, IL-6, gene polymorphisms in latent autoimmune diabetes of adults (LADA) and type 2 diabetes mellitus. **J Clin Immunol.** v. 24, n.6, p. 591-9. 2004.

TSUTSUI, H. *et al.* Caspase-1-independent, Fas/Fas ligand-mediated IL-18 secretion from macrophages causes acute liver injury in mice. **Immunity.** v. 11, n.3, p. 359-67. 1999.

TSUTSUI, H. *et al.* IFN-gamma-inducing factor up-regulates Fas ligand-mediated cytotoxic activity of murine natural killer cell clones. **J Immunol.** v. 157, n.9, p. 3967-73. 1996.

URURAHY, M. A. *et al.* Association of polymorphisms in IL6 gene promoter region with type 1 diabetes and increased albumin-to-creatinine ratio. **Diabetes Metab Res Rev.** v. 31, n.5, p. 500-6. 2015.

VECCHIO, F. *et al.* Abnormal neutrophil signature in the blood and pancreas of presymptomatic and symptomatic type 1 diabetes. **JCI Insight.** v. 3, n.18, p. 2018.

VERGE, C. F. *et al.* Prediction of type I diabetes in first-degree relatives using a combination of insulin, GAD, and ICA512bdc/IA-2 autoantibodies. **Diabetes.** v. 45, n.7, p. 926-33. 1996.

VIAZZI, F. *et al.* Ultrasound Doppler renal resistive index: a useful tool for the management of the hypertensive patient. **J Hypertens.** v. 32, n.1, p. 149-53. 2014.

VOZAROVA, B. *et al.* High alanine aminotransferase is associated with decreased hepatic insulin sensitivity and predicts the development of type 2 diabetes. **Diabetes**. v. 51, n.6, p. 1889-95. 2002.

WANG, M. C.; BOHMANN, D.; JASPER, H. JNK extends life span and limits growth by antagonizing cellular and organism-wide responses to insulin signaling. **Cell**. v. 121, n.1, p. 115-25. 2005.

WASSEL, C. L. *et al.* Association of genomic loci from a cardiovascular gene SNP array with fibrinogen levels in European Americans and African-Americans from six cohort studies: the Candidate Gene Association Resource (CARE). **Blood**. v. 117, n.1, p. 268-75. 2011.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Global Report on Diabetes. v. p. 2016.

WILLCOX, A. *et al.* Analysis of islet inflammation in human type 1 diabetes. **Clin Exp Immunol**. v. 155, n.2, p. 173-81. 2009.

WINKLER, C. *et al.* Feature ranking of type 1 diabetes susceptibility genes improves prediction of type 1 diabetes. **Diabetologia**. v. 57, n.12, p. 2521-9. 2014.

WINKLER, C. *et al.* A strategy for combining minor genetic susceptibility genes to improve prediction of disease in type 1 diabetes. **Genes Immun**. v. 13, n.7, p. 549-55. 2012.

WOLF, J.; ROSE-JOHN, S.; GARBERS, C. Interleukin-6 and its receptors: a highly regulated and dynamic system. **Cytokine**. v. 70, n.1, p. 11-20. 2014.

WOLFORD, J. K. *et al.* Variants in the interleukin 6 receptor gene are associated with obesity in Pima Indians. **Mol Genet Metab**. v. 80, n.3, p. 338-43. 2003.

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

YAMASAKI, K. *et al.* Cloning and expression of the human interleukin-6 (BSF-2/IFN beta 2) receptor. **Science**. v. 241, n.4867, p. 825-8. 1988.

YOSHIMOTO, T. *et al.* IL-18 induction of IgE: dependence on CD4⁺ T cells, IL-4 and STAT6. **Nat Immunol**. v. 1, n.2, p. 132-7. 2000.

ZHANG, J. Z. *et al.* Association of genetic variations in IL-6/IL-6R pathway genes with gastric cancer risk in a Chinese population. **Gene**. v. 623, p. 1-4. 2017.

ZHANG, Y. H.; LIN, J. X.; VILCEK, J. Interleukin-6 induction by tumor necrosis factor and interleukin-1 in human fibroblasts involves activation of a nuclear factor binding to a kappa B-like sequence. **Mol Cell Biol**. v. 10, n.7, p. 3818-23. 1990.

ZIEGLER, A. G. *et al.* Primary prevention of beta-cell autoimmunity and type 1 diabetes - The Global Platform for the Prevention of Autoimmune Diabetes (GPPAD) perspectives. **Mol Metab.** v. 5, n.4, p. 255-262. 2016.

ZIEGLER, A. G. *et al.* Seroconversion to multiple islet autoantibodies and risk of progression to diabetes in children. **JAMA.** v. 309, n.23, p. 2473-9. 2013.

ANEXO 1 – TERMO DE APROVAÇÃO DO COMITE DE ÉTICA

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 II (n= 100) e gestacional (n=100), recrutados na Unidade de Diabetes do Serviço de Endocrinologia e Metabologia do Hospital de Clínicas (HC) da UFPR/SEMPR, 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 tem 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 Co-Participante: Hospital de Clinicas da UFPR.

CURITIBA, 16 de Abril de 2012

Assinado por: Claudia Seely Rocco

ANEXO 2 – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE) ASSINADO PELOS PARTICIPANTES DA PESQUISA

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 a 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
--

- a) 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.
- b) 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

<p>Comitê de Ética em Pesquisa do Setor de Ciências da Saúde da UFPR Telefone: (41) 3360-7259 e-mail: cometica.saude@ufpr.br</p>
--

ANEXO 3 – QUESTIONÁRIO APLICADO AOS INDIVÍDUOS PARTICIPANTES DA PESQUISA

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 – PCR EM TEMPO REAL PARA O GENE *IL-18*

Gráfico de discriminação alélica do SNP rs1946518. Em azul estão amostras homocigotas para o alelo T (TT); em verde, amostras heterocigotas com genótipo GT e em vermelho, amostras homocigotas para o alelo G (GG).

Allelic Discrimination Plot