

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

PRISCILA IANZEN DOS SANTOS

ASSOCIAÇÃO DE MARCADORES GENÉTICOS COM DIABETES TIPO 1 DE INÍCIO
NA INFÂNCIA, ADOLESCÊNCIA E EM ADULTOS

CURITIBA

2023

PRISCILA IANZEN DOS SANTOS

ASSOCIAÇÃO DE MARCADORES GENÉTICOS COM DIABETES TIPO 1 DE INÍCIO
NA INFÂNCIA, ADOLESCÊNCIA E IDADE ADULTA

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Medicina Interna e Ciências da Saúde do Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Medicina Interna e Ciências da Saúde.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Angelica Beate Winter Boldt

Coorientador: Prof. Dr. Emilton Lima Junior

CURITIBA

2023

S237 Santos, Priscila lanzen dos
Associação de marcadores genéticos com diabetes tipo 1 de início na infância, adolescência e idade adulta [recurso eletrônico] / Priscila lanzen dos Santos. – Curitiba, 2023.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação Medicina Interna e Ciências da Saúde, 2023.

Orientadora: Angelica Beate Winter Boldt – Coorientador: Emilton Lima Junior.

Bibliografia: p. 41-46.

1. Marcadores genéticos. 2. Antígenos HLA. 3. Diabetes mellitus tipo 1. 4. Centrômero. 5. Insulina. 6. Repetição de anquirina. 7. Tenascina. 8. Receptor IGF tipo 2. I. Universidade Federal do Paraná. II. Boldt, Angelica Beate Winter. III. Lima Junior, Emilton. IV. Título.

NLMC: WK 810

Catálogo na fonte elaborada pelo Sistema de Bibliotecas da UFPR,
Biblioteca de Ciências da Saúde – SD, com os dados fornecidos pelo autor.
Bibliotecário: Francisco José Cordeiro CRB9/1734.

ATA Nº044

ATA DE SESSÃO PÚBLICA DE DEFESA DE MESTRADO PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRA EM MEDICINA INTERNA E CIÊNCIAS DA SAÚDE

No dia trinta de outubro de dois mil e vinte e três às 08:00 horas, na sala Virtual do PPGMICS - UFPR: <https://tinyurl.com/2d33dr4w>, Veiculada pela plataforma Microsoft TEAMS, foram instaladas as atividades pertinentes ao rito de defesa de dissertação da mestranda **PRISCILA IANZEN DOS SANTOS**, intitulada: **"ASSOCIAÇÃO DE MARCADORES GENÉTICOS COM DIABETES DO TIPO 1 DE INÍCIO NA INFÂNCIA E ADOLESCÊNCIA E DE INÍCIO NA IDADE ADULTA"**, sob orientação da Profa. Dra. ANGELICA BEATE WINTER BOLDT. A Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação MEDICINA INTERNA E CIÊNCIAS DA SAÚDE da Universidade Federal do Paraná, foi constituída pelos seguintes Membros: ANGELICA BEATE WINTER BOLDT (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ), KARIN BRAUN PRADO (DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA BÁSICA), TÁRCIO TEODORO BRAGA (UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO). A presidência iniciou os ritos definidos pelo Colegiado do Programa e, após exarados os pareceres dos membros do comitê examinador e da respectiva contra argumentação, ocorreu a leitura do parecer final da banca examinadora, que decidiu pela APROVAÇÃO. Este resultado deverá ser homologado pelo Colegiado do programa, mediante o atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca dentro dos prazos regimentais definidos pelo programa. A outorga de título de mestra está condicionada ao atendimento de todos os requisitos e prazos determinados no regimento do Programa de Pós-Graduação. Nada mais havendo a tratar a presidência deu por encerrada a sessão, da qual eu, ANGELICA BEATE WINTER BOLDT, lavrei a presente ata, que vai assinada por mim e pelos demais membros da Comissão Examinadora.

Curitiba, 30 de Outubro de 2023.

Assinatura Eletrônica

30/10/2023 20:20:28.0

ANGELICA BEATE WINTER BOLDT

Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica

31/01/2024 18:40:48.0

KARIN BRAUN PRADO

Avaliador Externo (DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA BÁSICA)

Assinatura Eletrônica

31/10/2023 15:54:50.0

TÁRCIO TEODORO BRAGA

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO)



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO MEDICINA INTERNA E
CIÊNCIAS DA SAÚDE - 40001016012P1

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação MEDICINA INTERNA E CIÊNCIAS DA SAÚDE da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **PRISCILA IANZEN DOS SANTOS** intitulada: "**ASSOCIAÇÃO DE MARCADORES GENÉTICOS COM DIABETES DO TIPO 1 DE INÍCIO NA INFÂNCIA E ADOLESCÊNCIA E DE INÍCIO NA IDADE ADULTA**", sob orientação da Profa. Dra. ANGELICA BEATE WINTER BOLDT, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestra 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, 30 de Outubro de 2023.

Assinatura Eletrônica

30/10/2023 20:20:28.0

ANGELICA BEATE WINTER BOLDT

Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica

31/01/2024 18:40:48.0

KARIN BRAUN PRADO

Avaliador Externo (DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA BÁSICA)

Assinatura Eletrônica

31/10/2023 15:54:50.0

TÁRCIO TEODORO BRAGA

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO)

RESUMO

O Brasil ocupa o terceiro lugar entre os países com maior prevalência de Diabetes *Mellitus* tipo 1 (DM1), doença autoimune que leva à morte das células beta pancreáticas e afeta cerca de cem mil pessoas antes dos 20 anos, e mais de 450 mil, acima desta idade. A suscetibilidade a DM1 está associada a mais de 60 *loci*, sabidamente com maior importância do complexo HLA. Contudo, a maior parte das associações genéticas em populações europeias ou asiáticas ainda não foram validadas na população miscigenada brasileira, e as diferenças de associação entre DM1 de início precoce ou tardio ainda são pouco compreendidas. Neste trabalho, foram comparadas as genotipagens obtidas por espectrometria de massa (Iplex) de 35 polimorfismos candidatos/reportados no catálogo GWAS entre 159 pacientes com menos de 14 anos e diagnosticados antes dos 12 anos de idade e 208 crianças saudáveis na mesma faixa etária; assim como entre 91 pacientes adultos com idade ≥ 18 anos e diagnosticados após os 18 anos e 174 adultos saudáveis. Dentre os 35 polimorfismos selecionados, 8 permaneceram associados por regressão logística uni e/ou multivariada, na população sul-brasileira, sendo que 2 compõem um haplótipo do gene *AMT*. Somente uma variante foi associada a suscetibilidade aumentada a ambos tipos de DM1, de início precoce (infantil) e tardio (adulto), pertencente ao complexo *HLA*: *HLA-DQB1_rs3129716*C* (OR=5,38, $p<0,0001$). A sua exclusão do modelo permitiu identificar mais cinco variantes independentemente associadas a DM1 (também de idade e sexo), presentes nos genes: *AMT* (OR=1,67, $p<0,045$) e *INS-IGF2* (OR=0,47, $p=0,011$) para DM1 de início infantil, e *LINC00243*, *CENPW* e *ANKRD55* (OR=2,35, $p=0,040$; OR=0,29, $p<0,0001$ e OR=0,60, $p=0,034$, respectivamente) para a forma adulta da DM1. Três variantes foram associadas a proteção: *INS-IGF2_rs17885785*T* para DM1 infantil, e *ANKRD55_rs7731626*A* e *CENPW_rs9388486*T* para DM1 adulto. Enquanto *ANKRD55_rs7731626*A* parece exercer papel pleiotrópico de eQTL em diferentes situações autoimunes, os outros dois estão associados ao desenvolvimento de células beta e produção de insulina. Os únicos polimorfismos associados a propensão a DM1, além do encontrado no gene *HLA-DQB1*, compõem um haplótipo do gene *AMT* (DM1 infantil) e alteram a sequência do transcrito mais comum de um lncRNA (*LINC00243_rs886424*T*, DM1 adulto). Enquanto o primeiro parece regular o metabolismo de colesterol, este último regula muitos genes em diversos tecidos, incluindo genes do complexo HLA, clássicos e não clássicos, classes I e II – sendo possível que a alteração de sua sequência também altere sua atividade reguladora. Por fim, vários dos genes mencionados apresentam associação funcional com DM2, indicando vias etiológicas comuns. Contudo, as diferenças de associação genética a DM1 de início infantil e adulto reforçam as diferenças etiológicas entre ambas as doenças, revelando novos alvos terapêuticos a serem avaliados futuramente em estudos funcionais.

Palavra-chave: *HLA-DQB1*; DM1; *CENPW*; insulina; *ANKRD55*; lncRNA; *IGF2R-AS*.

ABSTRACT

Brazil ranks third among the countries with the highest prevalence of Type 1 Diabetes Mellitus (DM1), an autoimmune disease that leads to the death of pancreatic beta cells and affects around 100,000 people before the age of 20 and more than 450,000 over this age. Susceptibility to DM1 is associated with more than 60 loci, the most important of which is known to be the HLA complex. However, most genetic associations in European or Asian populations have not yet been validated in the mixed Brazilian population, and the differences in association between early- and late-onset DM1 remain poorly understood. In this study, the genotyping obtained by mass spectrometry (Iplex) of 35 candidate/reported polymorphisms in the GWAS catalog were compared between 159 patients under 14 years of age and diagnosed before the age of 12 and 208 healthy children in the same age group; as well as between 91 adult patients aged ≥ 18 years and diagnosed after the age of 18 and 174 healthy adults. Among the 35 polymorphisms selected, eight remained associated with the disease by uni- and/or multivariate logistic regression in the South Brazilian population, two of which form a haplotype of the *AMT* gene. Only one variant was associated with increased susceptibility to both types of DM1, early-onset (childhood) and late-onset (adult), belonging to the HLA complex: *HLA-DQB1_rs3129716*C* (OR=5.38, $p<0.0001$). Their exclusion from the model made it possible to identify five more variants independently associated with DM1 (also of age and gender), present in the genes: *AMT* (OR=1.67, $p<0.045$) and *INS-IGF2* (OR=0.47, $p=0.011$) for childhood-onset DM1, and *LINC00243*, *CENPW* and *ANKRD55* (OR=2.35, $p=0.040$; OR=0.29, $p<0.0001$ and OR=0.60, $p=0.034$, respectively) for the adult form of DM1. Three variants were associated with protection: *INS-IGF2_rs17885785*T* for childhood DM1, and *ANKRD55_rs7731626*A* and *CENPW*rs9388486*T* for adult DM1. While *ANKRD55_rs7731626*A* appears to play a pleiotropic role in eQTLs across different autoimmune conditions, the other two are associated with beta cell development and insulin production. The only polymorphisms associated with a propensity to DM1, apart from the one found in the *HLA-DQB1* gene, make up a haplotype of the *AMT* gene (childhood DM1) and alter the sequence of the most common lncRNA transcript (*LINC00243_rs886424*T*, adult DM1). While the former appears to regulate cholesterol metabolism, the latter regulates many genes in various tissues, including classic and non-classic class I and II HLA complex genes - it is possible that altering their sequence also alters their regulatory activity. Finally, several of the genes mentioned have a functional association with type 2 diabetes (DM2), indicating common etiological pathways. However, the differences in genetic association with childhood- and adult-onset DM1 reinforce the etiological differences between the two diseases, revealing new therapeutic targets for evaluation in future functional studies.

Keywords: *HLA-DQB1*; *DM1*; *CENPW*; insulin; *ANKRD55*; *lncRNA*; *IGF2R-AS*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Número de pessoas com diabetes em todo o mundo e por região IDF em 2021-2045 (20-79 anos).....	16
Figura 2. Localização cromossômica das variantes associadas a DM1 nas análises uni e multivariadas.....	33

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Características dos grupos amostrais com e sem DM1	21
Tabela 2. Análise de equilíbrio de Hardy e Weinberg infantil.....	25
Tabela 3. Equilíbrio de Hardy-Weinberg em adultos.....	27
Tabela 4. Regressão Logística Univariada por SNP	29
Tabela 5: Análises multivariadas considerando os SNPs para o gene <i>HLA-DQB1</i>	34
Tabela 6: Análises multivariadas desconsiderando <i>HLA-DQB1</i>	34

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACA - autoanticorpos para córtex adrenal

ACP - autoanticorpos de células parietais

ADA - American Diabetes Association

AMA - autoanticorpos mitocondriais

anti- IA2b - tirosina fosfatase 2 das ilhotas

Anti-FI - Autoanticorpos contra os fatores intrínsecos

anti-IA2 - antígeno 2 do insulinoma

Anti-TTG - autoanticorpos para transglutaminase tecidual

AP - Anemia

CAD - cetoacidose diabética

CpG – 5'-Citosina-fosfato-Guanina-3'

DA - doença de Addison

DG - Doença de Graves

DM1 – Diabetes *mellitus* tipo 1

eQTLs – Expression quantitative trait loci

FDR - False discovery rate

FOP - insuficiência ovariana primária

GAD65 - isoforma 65 da descarboxilase do ácido

GWAS - Genome Wide Association Studies

HA - hepatite autoimune

HAI - hipotireoidismo autoimune

HLA – Human Leucocyte Antigen; Antígeno leucocitário humano

IAA anticorpos contra insulina

ICA - anticorpos citoplasmáticos de ilhotas

ISPAD - International Society for Pediatric and Adolescent Diabetes

miRNAs – Micro RNAs

NGS – Next Generation Sequencing

NIH - National Center for Biotechnology Information

SCS/UFPR - Comitê de Ética em Pesquisa do Setor de Ciências da Saúde

SEMPR - Serviço de Endocrinologia e Metabologia do Hospital de Clínicas da UFPR

SMA - autoanticorpos de músculo liso

SNPs - polimorfismos de nucleotídeo único

T1D – Type 1 Diabetes

TPO - Anticorpo antitireoperoxidase

TRAb - autoanticorpos contra receptores tireoidianos

ZnT8 - isoforma 8 do transportador de zinco

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
2.1 DOENÇAS AUTOIMUNES	14
2.2 DIABETES <i>MELITUS</i> TIPO 1 – ETIOLOGIA	14
2.3 EPIDEMIOLOGIA DO DM1	15
2.4 HISTÓRIA NATURAL DO DM1	17
2.5 MARCADORES DE SUSCETIBILIDADE A DM1	18
3. OBJETIVOS	19
3.1 OBJETIVOS GERAIS	19
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19
4. MATERIAS E MÉTODOS	20
4.1 AMOSTRAS	20
4.2 COLETA E EXTRAÇÃO DE DNA.....	22
4.3 PARAMETROS BIOQUÍMICOS	22
4.4 GENOTIPAGEM.....	23
4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA	23
5. RESULTADOS.....	25
5.1 POLIMORFISMOS ASSOCIADOS COM DM1	25
6. DISCUSSÃO	35
7. CONCLUSÃO	39
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	41
9. APÊNDICE	47
9.1 APÊNDICE 1: ARTIGO PUBLICADO EM CO-AUTORIA	47

1. INTRODUÇÃO

O Diabetes *mellitus* tipo 1 (DM1) é uma doença altamente heterogênea influenciada por diversos fatores, como idade, predisposição genética e interações ambientais. Além disso, os mecanismos envolvidos na comunicação entre as células β pancreáticas e as células do sistema imunológico contribuem para o desencadeamento e a amplificação da resposta imune e a morte progressiva das células β (MARTINS, 2022; LEETE et al., 2016).

O risco geral de DM1 na população é moderadamente baixo (com exceção de algumas populações, como as da Sardenha e Finlândia, com mais de 35% de prevalência), e a maioria dos estudos encontrou diferenças significativas nos fatores genéticos, imunológicos, metabólicos e características clínicas do DM1 em pessoas com diferentes ancestralidades (ZAJEC et al., 2022). Este risco é 15 vezes maior entre os familiares de indivíduos com DM1 (REDONDO; STECK; PUGLIESE, 2018). Crianças nascidas em famílias com DM1 têm riscos diferentes dependendo se a mãe (3%), o pai (5%) ou um irmão (8%) têm a doença. O acompanhamento a longo prazo de crianças nascidas com risco genético aumentado para diabetes tipo 1 revelou que as crianças que desenvolveram dois ou mais autoanticorpos de ilhotas tiveram maior probabilidade de eventualmente serem diagnosticadas com diabetes tipo 1 (POCIOT; LERNMARK, 2016; VANDEWALLE et al., 2021). Outra sugestão da contribuição genética para o DM1 é uma associação entre doenças, variantes nos genes relacionados com a função imune e a ocorrência de DM1 (ZAJEC et al., 2022). Estudos de associação de amplitude genômica (*Genome Wide Association Studies* - GWAS) identificaram mais de 60 *loci* envolvidos com a suscetibilidade genética associada ao DM1, demonstrando ser uma doença poligênica (ZHU et al., 2019). A idade de início do DM1 em várias populações euro-descendentes é mais frequentemente entre 5 e 7 anos e na puberdade ou próximo a ela, no entanto pode ocorrer em qualquer faixa etária (HARJUTSALO; SJÖBERG; TUOMILEHTO, 2008; MAAHS et al., 2010), e existem diferenças genéticas entre pacientes com DM1 com início na infância e na fase adulta (SABBAH et al., 2000). O DM1 com início na infância (<20 anos) está fortemente associado à suscetibilidade genética por *HLA* (SABBAH et al., 2000), já o DM1 de início na idade adulta apresenta menor risco genético e menor gravidade da doença (JERRAM; LESLIE, 2017b). A investigação do diabetes autoimune em indivíduos que desenvolvem a doença na infância e na idade adulta pode ajudar a elucidar a associação da autoimunidade de início precoce e de início tardio e pode impactar o diagnóstico

e tratamento futuro da doença.

Diante disso, o presente estudo tipo caso-controle, objetiva determinar a associação e a frequência de polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) em genes descritos na literatura para DM1, na população em estudo.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. DOENÇAS AUTOIMUNES

Doenças autoimunes ocorrem quando há perda de tolerância imunológica, ou seja, a resposta imune é direcionada para um ou mais órgãos próprios, sendo a origem, a fisiopatologia e os processos subjacentes dessas doenças, muitas vezes não compreendidos. No entanto, o desenvolvimento da doença autoimune é dependente da suscetibilidade genética dos indivíduos, e também pode ser modulado por fatores ambientais. O acometimento de uma doença autoimune em um indivíduo pode ser um marcador de risco para outras doenças autoimunes, tais como doença celíaca, doença de Graves (DG), hipotireoidismo autoimune (HAI), anemia perniciosa (AP), doença de Addison (DA), hepatite autoimune (HA) e insuficiência ovariana primária (FOP) (ALLEN; HUBER; DEVENDRA, 2008).

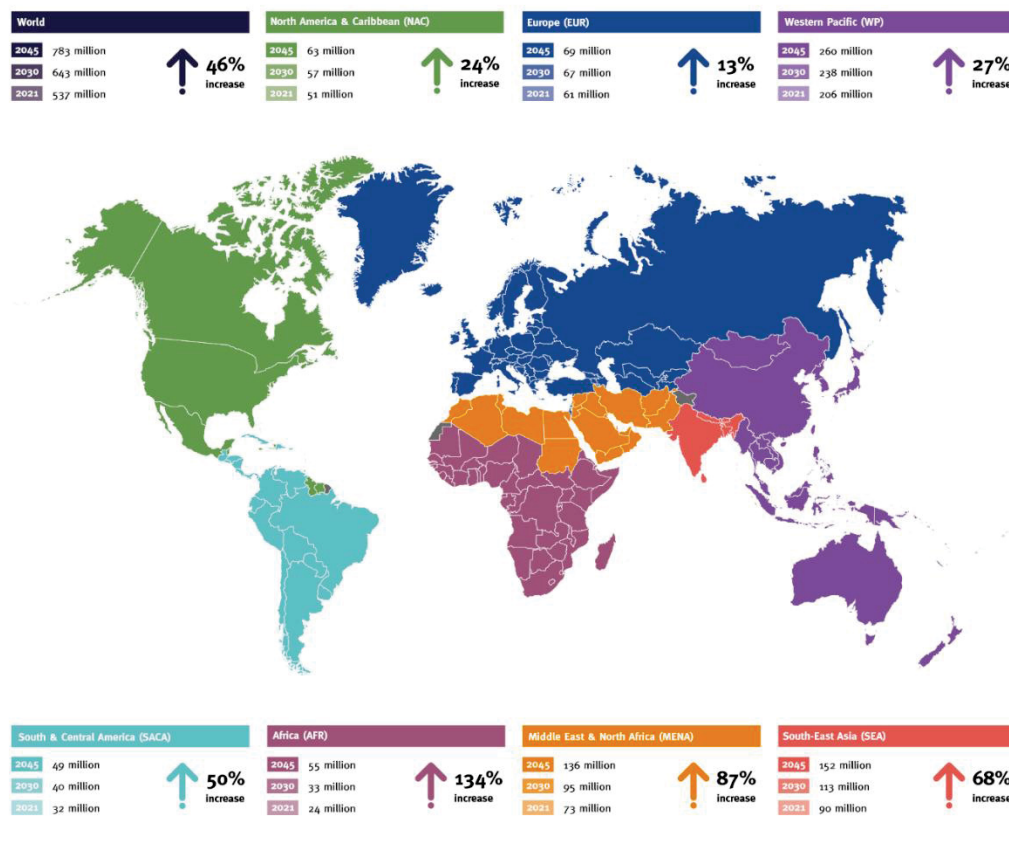
2.2. DIABETES *MELITUS* TIPO 1 – ETIOLOGIA

O DM1 é uma doença complexa e multifatorial que envolvem interações imunológicas, ambientais e genéticas. No DM1, há destruição autoimune das células β nas ilhotas pancreáticas, causando a deficiência acentuada de insulina. Embora a etiologia exata da DM1 ainda seja desconhecida, há uma predisposição genética devido a alelos específicos do HLA (DR e DQ) (LUCIER; WEINSTOCK, 2023). Essa associação é mais pronunciada na DM1 de início na juventude, em comparação com a DM1 de início na idade adulta (LESLIE *et al*, 2021), sendo que vários genes contribuem para a herdabilidade (KIM *et al.*, 2021). Estudos anteriores demonstraram a idade precoce de início é um dos fatores de alto risco para a progressão da DM1, juntamente com alelos de risco para o antígeno leucocitário humano (HLA) e presença de múltiplos autoanticorpos (GALLAGHER; GOLAND; GREENBAUM, 2011; KARJALAINEN *et al.*, 1989; MERGER; LESLIE; BOEHM, 2013; SABBAH *et al.*, 2000).

O DM1 é causado por disfunção autoimune consequente apoptose das células β no pâncreas, levando à necessidade de insulinoterapia exógena por toda a vida. A doença é decorrente de um diálogo complexo entre macrófagos invasores ou residentes e células T liberando quimiocinas e citocinas no microambiente das ilhotas. As quimiocinas e citocinas fornecem sinais proapoptóticos célula-célula e entre células β , tais como produtos de degradação da insulina ou outros componentes dos grânulos de núcleo denso de células β ou por estresse, células β feridas ou moribundas que atraem e ativam células imunes para as ilhotas (EIZIRIK; COLLI; ORTIS, 2009). Esse diálogo é determinado pelo background genético e idade do hospedeiro, bem como por fatores ambientais, como infecções virais e

sistemática e metanálise relatou que a prevalência mundial de DM1 foi de 9,5%, com uma incidência de 15 por 100.000 pessoas (MOBASSERI et al., 2020). Em todo o mundo, há também uma considerável variação geográfica na incidência. Em contraste, países da Ásia e América Latina, tais como a China e Venezuela respectivamente, apresentam taxas muito baixas em relação aos países europeus, principalmente a Finlândia e países do norte da Europa que apresentam taxas aproximadamente 400 vezes maiores que aqueles países. O Brasil ocupa o sexto lugar no *ranking* com 15,7 milhões de indivíduos com diabetes entre os adultos com idade de 20 a 79 anos (MAGLIANO; BOYKO, 2021; MARTINS, 2022). Estimativas globais (figura 1) para o DM1 em crianças e adolescentes de 0-14 anos em 2021 mostrou que o número de casos existentes de DM1 foi de 651.700 e o número de novos casos de DM1 por ano foi de 108.300.

Figura 1. Número de pessoas com diabetes em todo o mundo e por região IDF em 2021-2045 (20-79 anos)



Fonte: IDF (2021): IDF DIABETES ATLAS. Disponível em: "https://diabetesatlas.org/idfawp/resource-files/2021/07/IDF_Atlas_10th_Edition_2021.pdf"

O Brasil ficou em terceiro lugar no *ranking* com 92.300 casos existentes e 8.900 novos casos por ano entre 0 e 19 anos.

2.4. HISTÓRIA NATURAL DO DM1

O desenvolvimento da DM1 ocorre em três estágios. O estágio 1 é assintomático e caracterizado por glicemia de jejum normal, tolerância à glicose normal e presença de autoanticorpos pancreáticos >2 . Os critérios diagnósticos do estágio 2 incluem a presença de autoanticorpos pancreáticos (geralmente múltiplos) e disglycemia: glicemia de jejum alterada (glicemia de jejum 100 a 125 mg/dL) ou tolerância à glicose diminuída (2 horas pós-75 g de glicose de carga de glicose 140 a 199 mg/dL) ou HbA1c de 5,7% a 6,4%. Entretanto, os indivíduos permanecem assintomáticos. No estágio 3, encontra-se o diabetes, definido por hiperglicemia (glicose ao acaso ≥ 200 mg/dL) com sintomas clínicos, glicemia de jejum ≥ 126 mg/dL, glicemia ≥ 200 mg/dL duas horas após ingestão de 75 g de glicose durante teste oral de tolerância

à glicose e/ou HbA1c $\geq 6,5\%$. Caso o indivíduo apresente sintomas clássicos de hiperglicemia ou crise hiperglicêmica, recomenda-se a realização de dois exames (simultâneos ou em momentos diferentes) para confirmação do diagnóstico. Se houver um início agudo dos sintomas acompanhado de hiperglicemia, como ocorre mais frequentemente na DM1 de início na juventude, a HbA1c pode ser enganosa no momento do diagnóstico, e critérios de glicose devem ser

usados (ŠKRHA, 2022). A DM1, especialmente em crianças, classicamente se apresenta com sintomas hiperglicêmicos, que podem ser súbitos e incluem polidipsia, poliúria, polifagia, enurese noturna, visão turva, perda de peso não intencional, fadiga e fraqueza. Se não for avaliada e tratada prontamente, pode se tornar uma emergência médica. Além da hiperglicemia, anormalidades eletrolíticas podem estar presentes. Se esses indivíduos não forem tratados, a cetoacidose diabética (CAD) pode se desenvolver, necessitando de hospitalização e tratamento com fluidos intravenosos, insulina, potássio e monitoramento cuidadoso. Quase um terço dos jovens apresenta CAD (DABELEA et al., 2014)

No diabetes de início na idade adulta, o início dos sintomas é mais variável do que na juventude, e a CAD é menos comum. Pode ser difícil distinguir DM1 e DM2. GAD65 deve ser o anticorpo inicial testado quando se suspeita de diagnóstico de DM1 em adultos. Se negativo e/ou se disponível, IA2 e/ou ZnT8 também devem ser medidos. Os níveis de peptídeo C podem ser usados quando há uma dúvida sobre qual tipo de diabetes está presente. Um peptídeo C aleatório deve ser colhido com glicose sérica concomitante. Se a duração do diabetes exceder três anos, e o peptídeo C >600 pmol/L sugere-se fortemente um quadro de diabetes tipo 2. Um valor de peptídeo C baixo (<200 pmol/L) ou indetectável confirma o diagnóstico de DM1 (HOLT et al., 2022).

2.5. MARCADORES DE SUSCETIBILIDADE A DM1

Diabetes tipo 1 é uma doença multifatorial e poligênica onde a taxa de concordância em gêmeos é de 30–50% demonstrando que a suscetibilidade genética é relevante para sua etiologia. Outros mecanismos de susceptibilidade incluem efeitos epigenéticos e pós-transcricionais que regulam a transmissão e expressão dos genes herdados, sendo que o complexo HLA constitui a região de suscetibilidade mais relevante, especialmente os grupos de alelos *HLA-DRB*03* e **04*, e *DQA1*05:01-DQB1*02:01* e *DQA1*03:01-DQB1*03:02*. Dos pares de irmãos afetados com DM1, 55% compartilham ambos, 38% compartilham um e 7% não compartilham nenhum haplótipo do MHC. Se a idade de início for superior a 15 anos, há mais heterogeneidade nos alelos associados ao *DRB1*, mas mais semelhança nos alelos associados ao *DPB1*. Além desta região, outras 40 regiões do genoma conferem susceptibilidade ao diabetes tipo 1, a exemplo de estudos de ligação que identificaram uma região genética próxima ao gene *HLA-G* não clássico de classe I como um marcador independente de suscetibilidade (DE ALBUQUERQUE et al., 2016; GORODEZKY et al., 2006; WINKLER et al., 2014).

Fatores ambientais, como dieta e infecção viral, têm sido associados a um risco aumentado de DM1 em indivíduos geneticamente suscetíveis. A exposição precoce aos enterovírus pode induzir autoimunidade, porque 10–20% das crianças com infecção congênita por rubéola e os marcadores de suscetibilidade HLA desenvolvem DM1. Outros mecanismos de susceptibilidade incluem efeitos epigenéticos e pós-transcricionais que regulam a transmissão e expressão dos genes herdados sugerindo uma interação com fatores ambientais ou efeito epigenético com outros genes (GORODEZKY et al., 2006).

Além do complexo HLA há evidências de que a metilação do DNA em vários sítios CpGs pode estar associado ao risco futuro de DCV (doença cardiovascular) no diabetes tipo 1 e contribuir para o risco independentemente dos fatores de risco cardiometabólicos tradicionais tais associações dependentes de glicemia apoia a existência de vias heterogêneas para o desenvolvimento de DCV no diabetes tipo 1 (MILLER et al., 2023).

Devido ao aumento da prevalência global e ao crescente número de casos de diabetes, a classificação incorreta do diabetes é um grande desafio na área da saúde. O diagnóstico de DM1 na idade adulta pode resultar em erros potenciais, devido a inúmeros fatores, incluindo o aumento das taxas de obesidade, levando a uma discriminação imprecisa entre DM1 e DM2, particularmente em adultos jovens (SHOAIB et al., 2023).

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVOS GERAIS

Identificar polimorfismos genéticos associados ao desenvolvimento do diabetes tipo 1 e contribuir para a compreensão da patogênese da doença de início precoce e tardio.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 3.2.1. Avaliar a presença de associação entre polimorfismos genéticos e a DM1 infantil em crianças sul-brasileiras;
- 3.2.2. Avaliar a presença de associação entre polimorfismos genéticos e a DM1 em indivíduos sul-brasileiros que desenvolveram a doença na idade adulta;
- 3.2.3. Avaliar se ambas as condições apresentam associações genéticas, em comum;
- 3.2.4. Explorar o potencial funcional das variantes associadas através de análises *in silico*.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. AMOSTRAS

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética do Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná, em duas instâncias, para análise de crianças e adultos (CAAE 01038112.0.0000.0102 e CAAE 24676613.6.0000.0102). Dados clínicos e antropométricos foram obtidos de todos os participantes, sendo que as crianças incluídas (com o consentimento dos pais) tinham idade entre 6 e 14 anos e os adultos, idade acima de 18 anos. Os pacientes apresentaram diagnóstico clinicamente confirmado de DM1, de acordo com os critérios estabelecidos pela Sociedade Internacional de Diabetes Pediátrico e Adolescente (ISPAD) (LIBMAN et al., 2022), American Diabetes Association (ŠKRHA, 2022) e Sociedade Brasileira de Diabetes (RODACKI, M et al., 2022). Indivíduos com doença renal verificada pelos níveis séricos de creatinina ou doença cardiovascular foram excluídos, assim como os que apresentavam processos infecciosos e anemia, verificados por hemograma, urinálise e parâmetros laboratoriais. Os indivíduos incluídos neste estudo eram predominantemente de ascendência europeia e de pele branca (81%) e foram classificados como euro-brasileiros. Outras contribuições foram de afro-brasileiros (18%) e orientais e nativos americanos (1%).

Ao total, 382 indivíduos foram incluídos no grupo controle: 208 crianças em escolas públicas de Curitiba e 174 adultos doadores do banco de sangue do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná (HC-UFPR), sendo 49% e 50% do sexo feminino, respectivamente. Já no grupo de 250 pacientes, foram incluídos 159 crianças e 91 adultos atendidos no HC-UFPR, sendo 50% e 79% do sexo feminino, respectivamente. Demais características estão listadas na TABELA 1.

Tabela 1. Características dos grupos amostrais com e sem DM1.

	Paciente Infantil	Controle Infantil	P	Paciente Adulto	Controle Adulto	P
N	159	208		91	174	
Sexo feminino (%)	78 (50,6)	99 (47,8)	0,760	66 (77,6)	84 (59,1)	<0,0001
Idade média em anos (mín-máx)	11,16 (2-16)	10,2 (5-16)	<0,0001	44,76 (19-75)	38,77 (12-68)	<0,0001
Tempo médio de diagnóstico em anos (mín-máx)	4,57 (0,08-15)			16,74 (0,08-56)		
IMC médio (mín-máx)	19,16 (13-34)	19,01 (13,25-34,95)	ns	27,37 (18,65 – 43,42)	26,2 (15,82-39,96)	ns
Euro-brasileiro	84 (59,6)	n.i.		64 (75,3)	n.i.	
Histórico familiar de DM1 (%)	99 (66,4)	n.i.		54 (63,5)	n.i.	
Glicose	248,4 ± 105,8	94,03 ± 14,58	<0,0001	209,4 ± 106,2	95,49 ± 19,23	<0,0001
Colesterol total	172,6 ± 33,80	153,3 ± 28,25	<0,0001	177,7 ± 35,92	176,3 ± 32,03	0,8039
HDL	55,20 ± 12,94	52,31 ± 13,12	<0,005	51,10 ± 16,12	52,78 ± 12,89	0,1756
LDL	101,0 ± 27,08	81,25 ± 22,12	<0,0001	101,0 ± 28,78	95,34 ± 26,13	0,1905
nHDL	117,4 ± 30,62	101,0 ± 24,44	<0,0001	125,3 ± 30,51	123,1 ± 31,53	0,8431
VLDL	15,89 ± 7,94	20,75 ± 8,84	<0,0001	24,97 ± 18,70	25,74 ± 12,67	<0,05
Triglicerídeos	79,46 ± 39,7	103,8 ± 44,22	<0,0001	135,4 ± 112,4	136,6 ± 82,65	<0,05
Proteínas Totais	7,42 ± 0,77	7,54 ± 0,80	0,1799	8,05 ± 0,	7,13 ± 0,76	<0,0001
Albumina	4,26 ± 0,45	4,32 ± 0,33	0,5288	4,06 ± 0,43	4,00 ± 0,31	<0,05
Creatinina	0,71 ± 0,13	0,56 ± 0,17	<0,0001	0,88 ± 0,16	0,61 ± 0,18	<0,0001
Uréia	27,70 ± 7,60	23,14 ± 6,19	<0,0001	31,74 ± 9,07	23,92 ± 6,60	<0,0001
Ácido Úrico	3,19 ± 0,99	3,64 ± 0,86	<0,0001	3,75 ± 1,32	4,62 ± 1,29	<0,0001

FONTE: O AUTOR (2023). Legenda: Análise comparativa dos parâmetros de caracterização populacional entre pacientes e controles dos grupos infantil e adulto (Teste de Mann-Whitney, controle vs. paciente); n.i: não informado; IMC: índice de massa corporal; N: número de indivíduos; DM1: diabetes mellitus tipo 1; mín: mínimo; máx; máximo; ns: não significativo. Os dados foram expressos média ± desvio padrão da média. NOTA: para 5 pacientes infantis, não havia informação para histórico familiar de DM1 e para 13, não havia informação sobre “raça” ou “cor” segundo o IBGE. A cor “branca” corresponde a ascendência predominantemente europeia (“euro-brasileira”).

4.2. COLETA E EXTRAÇÃO DE DNA

Amostras de sangue periférico foram obtidas pela punção do membro superior dos participantes e cerca de 8 mL foram coletados em tubos com e sem EDTA, após assepsia local. Todos os DM1 usaram insulina antes da coleta de sangue. Cada participante foi identificado com um código, visando manter o sigilo dos dados pessoais. A extração de DNA das amostras foi realizada da camada leuco-plaquetária pelo método de *salting out* modificado, com desidratação de proteína e precipitação em ambiente saturado com cloreto de sódio (LAHIRI; NURNBERGER, 1991).

4.3. PARAMETROS BIOQUÍMICOS

Para as coletas de sangue total foram utilizados tubos secos contendo 7,2 mg do anticoagulante K₂EDTA (BD Vacutiner), e para as coletas de soro foram utilizados tubos com gel separador (BD Vacutiner).

As amostras coletadas em tubo contendo anticoagulante foram homogeneizadas durante 15 minutos e fracionadas em alíquota de aproximadamente 1,0 mL para determinação de hemoglobina glicada. O volume restante foi centrifugado a 3.500 rpm por 20 minutos (centrífuga Hermle Z 306 K) para a obtenção do *buffy coat* (camada de leucócitos utilizada na extração do DNA genômico). Já as amostras coletadas com gel separador foram centrifugadas por 10 minutos a 6.000 rpm (centrífuga Compacta Hermle Z 206A) imediatamente após a coleta, aliquotadas em microtubos de 0,5 mL e armazenadas em freezer -20° e -80° para posterior dosagem dos parâmetros bioquímicos. Amostras hemolisadas, lipêmicas e/ou ictéricas foram excluídas dos ensaios. Estas amostras fazem parte do Biorrepositório do Laboratório de Bioquímica Clínica da UFPR, homologado pela Portaria N° 2.201, de 14 de setembro de 2011.

Os ensaios foram realizados nas dependências físicas do laboratório de Bioquímica Clínica Campus Jardim Botânico, do Departamento de Análises Clínicas da UFPR, utilizando equipamentos e material disponíveis.

As determinações de parâmetros bioquímicos foram realizadas em sistema automatizado Labmax 400 (Labtest Diagnóstica SA) utilizando reagentes, calibradores e controles adequados ao sistema automatizado.

4.4. GENOTIPAGEM

A genotipagem de 35 polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs – vide Tabela 2), selecionados pela associação apresentada em estudos genômicos previamente realizados (GOPAL KRISHNAN et al., 2020; JULIER et al., 1991; KARAKOSE et al., 2020; KIM et al., 2021; LI et al., 2015a; LIU; YUAN; PARK, 2022; LIU et al., 2020; MENA et al., 2022; NARISAWA et al., 2012; SADEGHI et al., 2020; SIDARALA et al., 2020; VAN LAERE et al., 2003; WEKSBERG et al., 1993; YANG et al., 2019; ZHANG et al., 2019) foi realizada por espectrometria de massa, com a plataforma iPLEX do sistema MassARRAY (Agena Bioscience, San Diego, EUA), em colaboração com o Institut für Klinische Molekularbiologie (IKMB), ChristianAlbrechts-Universität, Kiel, Alemanha. Os genótipos foram identificados utilizando o software MassARRAY Typer (v4.0) (Agena Bioscience, San Diego, EUA) com configurações padrão.

4.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

As frequências alélicas e genotípicas foram obtidas por meio contagem direta. O teste de conformidade com o equilíbrio de Hardy-Weinberg foi realizado no programa PLINK v1.9 (<http://pngu.mgh.harvard.edu/~purcell/plink/>) (CHANG et al., 2015; PURCELL et al., 2007). As análises de associação entre as variáveis clínico-demográficas e a DM2 foram conduzidas na plataforma STATA 9.1, com os modelos dominante, recessivo e aditivo para as variantes de menor frequência. No modelo dominante, supõe-se que indivíduos portadores do alelo menos comum apresentam aumento ou redução da suscetibilidade ao fenótipo estudado (sem diferenciar entre homozigotos e heterozigotos). No modelo recessivo, somente homozigotos para o alelo menos frequente, estariam mais predispostos ou resistentes a desenvolver o mesmo. Já no modelo aditivo, homozigotos para o alelo investigado estariam mais predispostos ou resistentes, que heterozigotos, e estes por sua vez, mais predispostos ou resistentes, que homozigotos para o alelo mais comum. Os dados foram analisados utilizando regressão logística uni e multivariada, reportando odds ratio (OR) com intervalo de confiança de 95%. Para comparação de dois grupos em relação a variáveis quantitativas, foi considerado o teste t de Student para amostras independentes, ou o teste não paramétrico de Mann-Whitney. Para comparação de mais de dois grupos em relação a variáveis quantitativas foi considerado o modelo de análise de variâncias com uma fonte de variação, ou o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis. Todos os dados passaram pela estatística descritiva, remoção de outliers e teste de normalidade de Shapiro-Wilk e Kolmogorov-Smirnov. Como todos os dados tiveram

distribuição anormal, foi utilizado o teste de Mann Whitney, a partir da mediana das populações amostrais. Para escolha dos testes foi avaliada a condição de normalidade das variáveis quantitativas. Valores de p menores do que 0,05 foram considerados como indicadores de significância estatística. Para comparações múltiplas, foi utilizada a correção de Benjamini-Hochberg. Para auxiliar a análise estatística deste trabalho, foi utilizado o programa “GraphPad Prism – versão 5.0”.

5. RESULTADOS

5.1. POLIMORFISMOS ASSOCIADOS COM DM1

A distribuição genotípica de todas as variantes, com exceção de rs3024493, rs1049053 e rs7903146, apresentou-se de acordo com o modelo de equilíbrio de Hardy-Weinberg em controles (Tabelas 2 e 3). Houve um excesso de heterozigotos para rs3024493 e rs1049053, e nenhum heterozigoto para rs7903146, possivelmente por erro de tipagem. O alelo alternativo do polimorfismo rs12229654 não foi encontrado. Este alelo ocorre com frequência entre 3 e 28% somente em populações orientais, razão pela qual possivelmente não foi detectado em nossa amostragem (HOWE et al., 2021). Este SNP, assim como aqueles cuja distribuição genotípica em controles estava fora do equilíbrio esperado de Hardy-Weinberg considerando $p < 0,01$, foram excluídos das análises seguintes. Os 31 SNPs que apresentaram valores de $p < 0,05$ na análise univariada (Tabela 4) foram selecionadas para análise multivariada, conforme Tabelas 5 e 6.

Tabela 2. Análise de equilíbrio de Hardy e Weinberg para controles e pacientes infantis.

SNP	CR	GRUPO	A1	A2	GENO	O(HET)	E(HET)	P
rs229544	22	DM1	G	A	15/78/56	0,524	0,462	0,155
rs229544	22	Co	G	A	24/94/82	0,470	0,458	0,760
rs481843	11	Co	T	C	0/34/170	0,167	0,153	0,370
rs481843	11	DM1	T	C	0/24/130	0,156	0,144	0,601
rs486394	11	DM1	C	A	13/63/74	0,420	0,417	1,000
rs486394	11	Co	C	A	20/84/98	0,416	0,425	0,742
rs496300	21	Co	C	T	12/71/12	0,348	0,357	0,697
rs496300	21	DM1	C	T	14/61/75	0,407	0,417	0,845
rs632057	6	DM1	T	G	10/69/70	0,463	0,419	0,244
rs632057	6	Co	T	G	24/88/87	0,442	0,450	0,875
rs886424	6	DM1	T	C	2/37/113	0,243	0,233	1,000
rs886424	6	Co	T	C	2/33/166	0,164	0,167	0,675
rs998584	6	Co	A	C	47/101/5	0,498	0,499	1,000
rs998584	6	DM1	A	C	28/79/42	0,530	0,496	0,508
rs1009360	2	DM1	C	T	25/81/44	0,540	0,492	0,319
rs1009360	2	Co	C	T	27/101/7	0,510	0,476	0,372
rs1049053	6	DM1	C	T	0/17/138	0,110	0,104	1,000
rs1049053	6	Co	C	T	0/73/129	0,361	0,296	0,001
rs1801282	3	Co	G	C	2/36/166	0,177	0,177	1,000
rs1801282	3	DM1	G	C	3/25/123	0,166	0,184	0,188
rs2304672	2	Co	C	G	0/25/178	0,123	0,116	1,000

rs2304672	2	DM1	C	G	0/23/129	0,151	0,140	1,000
rs2980888	8	DM1	T	C	9/57/87	0,373	0,370	1,000
rs2980888	8	Co	T	C	7/79/118	0,387	0,352	0,230
rs3024493	1	Co	T	C	0/14/2	0,875	0,492	0,007
rs3024493	1	DM1	T	C	0/13/2	0,867	0,491	0,008
rs3024505	1	Co	A	G	2/42/160	0,206	0,200	1,000
rs3024505	1	DM1	A	G	1/35/117	0,229	0,213	0,699
rs3129716	6	Co	C	T	4/35/160	0,176	0,193	0,255
rs3129716	6	DM1	C	T	12/72/65	0,483	0,437	0,260
rs3741892	12	Co	C	G	43/112/4	0,549	0,500	0,207
					9			
rs3741892	12	DM1	C	G	32/71/48	0,470	0,494	0,621
rs3746923	21	DM1	T	C	21/71/57	0,477	0,471	1,000
rs3746923	21	Co	T	C	26/93/77	0,475	0,466	0,879
rs4976210	5	Co	T	C	15/62/12	0,310	0,354	0,108
					3			
rs4976210	5	DM1	T	C	4/50/95	0,336	0,314	0,600
rs6711016	2	Co	A	C	11/69/12	0,338	0,347	0,689
					4			
rs6711016	2	DM1	A	C	7/49/95	0,325	0,330	0,807
rs7203793	16	DM1	G	C	20/55/71	0,377	0,439	0,091
rs7203793	16	Co	G	C	22/93/87	0,460	0,448	0,756
rs7725052	5	Co	T	C	42/115/4	0,567	0,500	0,069
					6			
rs7725052	5	DM1	T	C	39/69/42	0,460	0,500	0,330
rs7731626	5	Co	A	G	28/80/96	0,392	0,444	0,114
rs7731626	5	DM1	A	G	20/66/63	0,443	0,458	0,721
rs7903146	10	Co	T	C	22/0/181	0,000	0,193	0,000
rs7903146	10	DM1	T	C	18/0/133	0,000	0,210	0,000
rs9388486	6	Co	T	C	49/101/5	0,498	0,500	1,000
					3			
rs9388486	6	DM1	T	C	27/78/46	0,517	0,492	0,621
rs9814873	3	Co	G	A	6/59/138	0,291	0,289	1,000
rs9814873	3	DM1	G	A	8/65/80	0,425	0,389	0,305
rs11715915	3	Co	T	C	6/59/140	0,288	0,286	1,000
rs11715915	3	DM1	T	C	7/63/80	0,420	0,382	0,286
rs11932595	4	DM1	G	A	14/69/68	0,457	0,436	0,709
rs11932595	4	Co	G	A	30/94/81	0,459	0,469	0,766
rs12229654	12	Co	0	T	0/0/204	0,000	0,000	1,000
rs12229654	12	DM1	0	T	0/0/158	0,000	0,000	1,000
rs12919083	16	Co	C	A	16/84/10	0,414	0,408	1,000
					3			
rs12919083	16	DM1	C	A	13/55/81	0,369	0,396	0,410
rs17885785	11	Co	T	C	7/45/150	0,223	0,249	0,152
rs17885785	11	DM1	T	C	1/21/131	0,137	0,139	0,591
rs28751879	5	DM1	T	A	1/25/119	0,172	0,169	1,000
rs28751879	5	Co	T	A	0/36/166	0,178	0,162	0,376
rs61757629	5	Co	T	C	0/11/194	0,054	0,052	1,000

rs61757629	5	DM1	T	C	0/7/148	0,045	0,044	1,000
rs62107261	2	DM1	C	T	0/5/147	0,033	0,032	1,000
rs62107261	2	Co	C	T	1/11/191	0,054	0,062	0,180
rs68037604	11	DM1	T	G	5/47/99	0,311	0,306	1,000
rs68037604	11	Co	T	G	12/80/111	0,394	0,381	0,715
rs78788470	5	DM1	A	G	1/5/148	0,032	0,044	0,067
rs78788470	5	Co	A	G	1/9/195	0,044	0,052	0,129

FONTE: O Autor (2023). Legenda: SNP – polimorfismo de nucleotídeo único; CR: cromossomo; DM1 - pacientes; Co - controles; A1 – alelo 1; A 2 – alelo 2; GENO - genótipo; O(HET) – frequência observada de homozigotos; E(HET) - frequência esperada de heterozigotos; **em negrito** – significativo; P – valor de P <0,05

Tabela 3. Equilíbrio de Hardy-Weinberg em adultos

SNP	CR	GRUPO	A1	A2	GENO	O(HET)	E(HET)	P
rs229544	22	DM1	G	A	14/40/36	0,444	0,470	0,654
rs229544	22	Co	G	A	22/78/70	0,459	0,460	1,000
rs481843	11	DM1	T	C	1/14/75	0,156	0,162	0,518
rs481843	11	Co	T	C	3/19/150	0,111	0,135	0,045
rs486394	11	DM1	C	A	10/33/47	0,367	0,416	0,309
rs486394	11	Co	C	A	13/69/89	0,404	0,401	1,000
rs496300	21	DM1	C	T	5/41/43	0,461	0,409	0,305
rs496300	21	Co	C	T	6/68/96	0,400	0,360	0,201
rs632057	6	DM1	T	G	7/38/43	0,432	0,416	1,000
rs632057	6	Co	T	G	18/78/71	0,467	0,450	0,731
rs886424	6	DM1	T	C	1/15/72	0,171	0,175	0,574
rs886424	6	Co	T	C	0/17/154	0,099	0,094	1,000
rs998584	6	DM1	A	C	19/37/34	0,411	0,486	0,136
rs998584	6	Co	A	C	44/80/47	0,468	0,500	0,444
rs1801282	3	DM1	G	C	0/18/72	0,200	0,180	0,592
rs1801282	3	Co	G	C	2/24/145	0,140	0,150	0,306
rs2304672	2	DM1	C	G	0/7/83	0,078	0,075	1,000
rs2304672	2	Co	C	G	1/21/149	0,123	0,126	0,547
rs2980888	8	DM1	T	C	7/30/53	0,333	0,369	0,391
rs2980888	8	Co	T	C	13/71/87	0,415	0,406	0,853
rs3024493	1	DM1	T	C	0/8/0	1,000	0,500	0,025
rs3024493	1	Co	T	C	0/8/0	1,000	0,500	0,025
rs3024505	1	DM1	A	G	1/14/75	0,156	0,162	0,518
rs3024505	1	Co	A	G	0/40/132	0,233	0,206	0,133
rs3129716	6	DM1	C	T	2/31/57	0,344	0,313	0,508
rs3129716	6	Co	C	T	1/35/132	0,208	0,196	0,696
rs3741892	12	DM1	C	G	19/47/24	0,522	0,499	0,832
rs3741892	12	Co	C	G	39/96/36	0,561	0,500	0,128

rs3746923	21	DM1	T	C	17/47/26	0,522	0,495	0,674
rs3746923	21	Co	T	C	21/76/69	0,458	0,458	1,000
rs4976210	5	DM1	T	C	5/27/57	0,303	0,329	0,517
rs4976210	5	Co	T	C	8/48/111	0,287	0,310	0,324
rs6711016	2	DM1	A	C	4/26/59	0,292	0,309	0,729
rs6711016	2	Co	A	C	6/44/121	0,257	0,274	0,405
rs7203793	16	DM1	G	C	7/43/36	0,500	0,443	0,331
rs7203793	16	Co	G	C	23/73/69	0,442	0,461	0,614
rs7725052	5	DM1	C	T	21/46/23	0,511	0,500	1,000
rs7725052	5	Co	C	T	41/88/41	0,518	0,500	0,759
rs7731626	5	DM1	A	G	6/40/43	0,449	0,414	0,607
rs7731626	5	Co	A	G	20/84/65	0,497	0,465	0,411
rs7903146	10	DM1	T	C	8/0/81	0,000	0,164	0,000
rs7903146	10	Co	T	C	14/0/157	0,000	0,150	0,000
rs9388486	6	DM1	T	C	18/36/36	0,400	0,480	0,125
rs9388486	6	Co	T	C	48/83/40	0,485	0,499	0,760
rs9814873	3	DM1	G	A	6/37/47	0,411	0,396	1,000
rs9814873	3	Co	G	A	13/63/93	0,373	0,388	0,691
rs1009360	2	DM1	C	T	20/40/30	0,444	0,494	0,393
rs1009360	2	Co	C	T	35/83/50	0,494	0,496	1,000
rs1049053	6	DM1	C	T	0/23/63	0,267	0,232	0,346
rs1049053	6	Co	C	T	0/47/123	0,277	0,238	0,047
rs11715915	3	DM1	T	C	6/36/48	0,400	0,391	1,000
rs11715915	3	Co	T	C	13/62/96	0,363	0,382	0,548
rs11932595	4	DM1	G	A	19/42/29	0,467	0,494	0,669
rs11932595	4	Co	G	A	24/87/60	0,509	0,478	0,429
rs12229654	12	DM1	O	T	0/0/91	0,000	0,000	1,000
rs12229654	12	Co	O	T	0/0/169	0,000	0,000	1,000
rs12919083	16	DM1	C	A	5/42/40	0,483	0,419	0,206
rs12919083	16	Co	C	A	20/72/79	0,421	0,441	0,603
rs17885785	11	DM1	T	C	2/17/71	0,189	0,206	0,332
rs17885785	11	Co	T	C	7/47/115	0,278	0,296	0,436
rs28751879	5	DM1	T	A	03/09/71	0,108	0,164	0,015
rs28751879	5	Co	T	A	7/30/129	0,181	0,230	0,011
rs61757629	5	DM1	T	C	0/5/85	0,056	0,054	1,000
rs61757629	5	Co	T	C	0/13/157	0,076	0,074	1,000
rs62107261	2	DM1	C	T	0/3/87	0,033	0,033	1,000
rs62107261	2	Co	C	T	0/7/164	0,041	0,040	1,000
rs68037604	11	DM1	T	G	4/36/50	0,400	0,369	0,573
rs68037604	11	Co	T	G	14/62/95	0,363	0,388	0,430
rs78788470	5	DM1	A	G	0/6/84	0,067	0,064	1,000
rs78788470	5	Co	A	G	1/4/167	0,023	0,034	0,043

FONTE: O Autor (2023). Legenda: SNP – polimorfismo de nucleotídeo único; CR: cromossomo; DM1 - pacientes; Co - controles; A1 – alelo 1; A 2 – alelo 2; GENO - genótipo; O(HET) – frequência observada de homozigotos; E(HET) - frequência esperada de heterozigotos; **em negrito** – significativo; P – valor de P <0,05

Tabela 4. Regressão Logística Univariada por SNP

CR	Gene	SNP	Infantil						Adulto									
			MAF%			95%CI			MAF%			95%CI						
			DMI	CTRL	Modelo	DMI	CTRL	OR	P	95%CI	DMI	CTRL	Modelo	DMI	CTRL	OR	P	95%CI
22	CIQTNF5 Exon 1	rs229544, A>g	36,24	35,50	ADD	108/190	142/258	1,04	0,834	[0,75 - 1,43]	37,78	35,88	DOM	68/112	122/218	1,08	0,673	[0,62 - 1,77]
					REC	15/134	24/176	0,82	0,571	[0,41 -1,62]			REC	14/76	22/148	1,24	0,562	[0,60 - 2,56]
					ADD	24/284	34/374	0,96	0,892	[0,55 - 1,70]			ADD	16/164	25/319	1,19	0,570	[0,65 -2,18]
11	LINC02702	rs481843, C>t	7,79	8,33	DOM	24/130	34/170	0,96	0,892	[0,55 - 1,70]	8,89	7,27	DOM	15/75	22/150	1,42	0,340	[0,70 - 2,91]
					REC	0/154	0/204	x	x			REC	01/89	3/169	0,63	0,686	[0,06 - 6,10]	
					ADD	89/211	124/280	0,97	0,876	[0,70 - 1,35]			ADD	53/127	95/247	1,09	0,650	[0,74 - 1,62]
11	LINC02702	rs486394, C>a	29,67	30,69	DOM	76/74	104/98	0,98	0,927	[0,64 - 1,50]	29,44	27,78	DOM	43/47	82/89	1,02	0,946	[0,61 - 1,70]
					REC	13/137	20/182	0,86	0,680	[0,41 - 1,78]			REC	10/80	13/158	1,50	0,360	[0,63 - 3,57]
					ADD	89/211	95/313	1,37	0,068	[0,98 - 1,91]			ADD	51/127	80/260	1,33	0,204	[0,85 - 2,06]
21	Variante Intrônica	rs496300, T>c	29,67	23,28	DOM	75/75	83/121	1,44	0,093	[0,94 - 2,20]	28,65	23,53	DOM	46/43	74/96	1,36	0,544	[0,81 - 2,27]
					REC	14/136	12/192	1,64	0,229	[0,73 - 3,64]			REC	05/84	6/164	1,61	0,444	[0,47 - 5,42]
					ADD	89/209	136/262	0,82	0,236	[0 ,59 - 1,14]			ADD	52/124	114/220	0,80	0,276	[0,53 - 1,20]
6	Intergênico	rs632057, G>t	29,87	34,17	DOM	79/70	112/87	0,89	0,584	[0,58 - 1,36]	29,55	34,13	DOM	45/43	96/71	0,77	0,327	[0,46 - 1,30]
					REC	10/139	24/175	0,52	0,097	[0,24 - 1,13]			REC	07/81	18/149	0,71	0,450	[0,28 - 1,76]
					ADD	41/263	37/365	1,53	0,078	[0,95 - 2,47]			ADD	17/159	17/325	2,04	0,049	[1,00 - 4,15]
6	LINC00243 Exon 2	rs886424, C>t	13,49	9,20	DOM	39/113	35/166	1,62	0,065	[0,97 - 2,72]	9,66	4,97	DOM	16/72	17/154	1,99	0,068	[0,95 - 4,15]
					REC	2/150	2/199	1,32	0,784	[0,18 - 9,46]			REC	01/87	0/171	x	x	
					ADD	135/163	195/211	0,89	0,472	[0 ,66 - 1,21]			ADD	75/105	168/174	0,77	0,140	[0,54 - 1,10]
6	Variante Intrônica	rs998584, C>a	45,30	48,03	DOM	107/42	148/55	0,96	0,850	[0,60 - 1,53]	41,67	49,12	DOM	56/34	124/47	0,63	0,101	[0,37 - 1,10]
					REC	28/121	47/156	0,76	0,309	[0,45 - 1,29]			REC	19/71	44/127	0,78	0,437	[0,42 - 1,45]
					ADD	131/169	155/241	1,23	0,211	[0,89 1,68]			ADD	80/100	153/183	0,96	0,816	[0,67 - 1,37]
2	Variante Intrônica	rs1009360, T>c	43,67	39,14	DOM	106/44	128/70	1,32	0,237	[0,83 - 2,08]	19,10	16,37	DOM	60/30	118/50	0,85	0,550	[0,49 - 1,47]
					REC	25/125	27/171	1,27	0,433	[0,70 - 2,29]			REC	20/70	35/133	1,09	0,795	[0,58 - 2,02]

3	PPARG	rs1801282, C>g	10,26	9,80	ADD	31/271	40/368	1,04	0,865	[0,64 - 1,70]	18/162	28/314	1,23	0,514	[0,66 - 2,30]
					DOM	28/123	38/166	0,99	0,960	[0,57 - 1,70]	18/72	26/145	1,38	0,347	[0,70 - 2,67]
					REC	3/148	2/202	2,03	0,440	[0,34 - 12,32]	0/90	2/169	x	x	x
2	PER3 Exon 2	rs2304672, G>c	7,57	6,16	ADD	23/281	25/381	1,32	0,362	[0,72 - 2,42]	07/173	23/319	0,58	0,225	[0,24 - 1,40]
					DOM	23/129	25/178	1,32	0,362	[0,72 - 2,42]	07/83	22/149	0,59	0,255	[0,24 - 1,46]
					REC	0/152	0/203	x	x	x	0/90	1/170	x	x	x
8		rs2980888, C>t	24,51	22,79	ADD	75/231	93/315	1,12	0,545	[0,78 - 1,60]	44/136	97/245	0,82	0,340	[0,54 - 1,23]
					DOM	66/87	86/118	1,06	0,798	[0,70 - 1,61]	37/53	84/87	0,72	0,219	[0,43 - 1,21]
					REC	9/144	7/197	1,75	0,279	[0,63 - 4,80]	07/83	13/158	1,01	0,980	[0,39 - 2,63]
1	Intergênico entre MAPKAPK 2 e IL10	rs3024505 G>a	12,09	11,27	ADD	37/269	46/362	1,12	0,630	[0,70 1,80]	16/164	40/304	0,74	0,344	[0,39 - 1,39]
					DOM	36/117	44/160	1,16		[0,70 - 1,91]	15/75	40/132	0,67	0,237	[0,35 - 1,30]
					REC	1/152	2/202	0,66		[0,06 7,40]	01/89	0/172	x	x	x
6	HLA-DQB1	rs3129716, T>c	32,21	10,80	ADD	96/202	43/355	4,10	0,000	[2,67 - 6,30]	35/145	37/299	2,07	0,007	[1,21 - 3,52]
					DOM	84/65	39/160	5,30	0,000	[3,29 - 8,54]	33/57	36/132	2,12	0,009	1,21 - 3,74]
					REC	12/137	4/195	4,27	0,014	[1,35 - 13,52]	02/88	1/167	3,80	0,279	[0,34 - 42,44]
12	CRY1 Intron 10	rs3741892, G>t	44,70	48,53	ADD	135/167	198/210	0,72	0,127	[0,47 - 1,10]	85/95	174/168	0,83	0,480	[0,50 - 1,39]
					DOM	103/48	155/49	0,66	0,087	[0,42 - 1,06]	66/24	135/36	0,72	0,278	[0,40 - 1,31]
					REC	32/119	43/161	1,00	0,995	[0,60 - 1,67]	19/71	39/132	0,92	0,799	[0,50 - 1,72]
21	UBASH3A Intron 1	rs3746923, C>t	37,92	36,99	ADD	113/185	145/247	1,04	0,801	[0,76 - 1,42]	81/99	118/214	1,50	0,036	[1,03 - 2,18]
					DOM	92/57	119/77	1,04	0,846	[0,67 - 1,62]	64/26	97/69	1,75	0,046	[1,01 - 3,04]
					REC	21/128	26/170	1,07	0,824	[0,58 - 2,00]	17/73	21/145	1,61	0,183	[0,80 - 3,23]
5	NAIP Intron 4	rs4976210, C>t	19,46	23,00	ADD	58/240	92/308	0,82	0,273	[0,57 - 1,17]	37/141	64/270	1,10	0,671	[0,71 - 1,70]
					DOM	54/95	77/123	0,91	0,667	[0,58 - 1,41]	32/57	56/111	1,11	0,698	[0,65 - 1,90]
					REC	4/145	15/185	0,34	0,060	[0,11 - 1,05]	05/84	8/159	1,18	0,774	[0,37 - 3,73]
2		rs6711016, C>a	20,86	22,30	ADD	63/239	91/317	0,91	0,616	[0,64 - 1,31]	34/144	56/286	1,20	0,434	[0,76 - 1,90]
					DOM	56/95	80/124	0,90	0,648	[0,59 - 1,40]	30/59	50/121	1,25	0,435	[0,72 - 2,16]
					REC	7/144	11/193	0,85	0,738	[0,32 - 2,24]	04/85	6/165	1,28	0,709	[0,35 - 4,65]
16	CLEC16A Intron 18	rs7203793, C>t	32,53	33,91	ADD	95/197	137/267	0,93	0,665	[0,68 - 1,27]	57/115	119/211	0,86	0,451	[0,58 - 1,27]
					DOM	75/71	115/87	0,79	0,274	[0,51 - 1,21]	50/36	96/69	0,97	0,908	[0,57 - 1,65]
					REC	20/126	22/180	1,29	0,442	[0,67 - 2,46]	07/79	23/142	0,54	0,140	[0,22 - 1,31]

5	Intergênico entre RNU1-150 e PTGER4	rs7725052, C>t	49,00	147/153	199/207	1,00	0,998	[0,74 - 1,35]	ADD	88/92	170/170	1,05	0,808	[0,73 - 1,51]
			49,01	108/42	157/46	0,76	0,268	[0,47 - 1,24]	DOM	67/23	129/41	1,16	0,597	[0,67 - 2,00]
5	ANKRD55 Intron 6	rs7731626, G>a	35,57	86/63	108/96	1,19	0,412	[0,78 - 1,83]	DOM	46/43	104/65	0,66	0,124	[0,40 - 1,12]
			33,33	20/129	28/176	0,97	0,915	[0,52 - 1,80]	REC	06/83	20/149	0,56	0,239	[0,22 - 1,47]
3	AMT	rs11715915, C>t	25,67	77/223	71/339	1,71	0,005	[1,17 - 2,50]	ADD	48/132	88/254	1,05	0,821	[0,70 - 1,57]
			17,32	70/80	65/140	1,91	0,003	[1,24 - 2,95]	DOM	42/48	75/96	1,12	0,657	[0,67 - 1,88]
4	CLOCK	rs11932595, A>g	32,12	83/68	124/81	0,81	0,323	[0,53 - 1,23]	DOM	61/29	111/60	1,16	0,597	[0,67 - 2,00]
			37,56	14/137	30/175	0,59	0,126	[0,30 - 1,16]	REC	19/71	24/147	1,62	0,157	[0,83 - 3,14]
16	CLEC16A Intron 18	rs12919083, A>c	27,18	81/217	116/290	0,93	0,649	[0,66 - 1,29]	ADD	52/122	112/230	0,86	0,450	[0,57 - 1,28]
			28,57	68/81	100/103	0,85	0,465	[0,56 - 1,30]	DOM	47/40	92/79	0,97	0,908	[0,57 - 1,64]
11	INS-IGF2 Intro n 4	rs17885785, C>t	7,52	22/131	52/150	0,48	0,010	[0,28 - 0,84]	DOM	19/71	54/115	0,57	0,067	[0,31 - 1,04]
			14,60	1/152	7/195	0,18	0,114	[0,02 - 1,51]	REC	02/88	7/162	0,53	0,429	[0,11 - 2,58]
5	NAIP Intron 5	rs28751879, A>t	9,31	27/263	36/368	1,04	0,875	[0,61 - 1,80]	ADD	15/151	44/288	0,70	0,209	[0,40 - 1,22]
			8,91	26/119	36/166	1,00	0,997	[0,57 - 1,75]	DOM	12/71	37/129	0,58	0,134	[0,28 - 1,18]
5	NAIP Intron 3	rs61757629, C>t	2,26	1/144	0/202	x	x	x	REC	03/80	7/159	0,84	0,806	[0,21 - 3,33]
			2,68	7/303	11/399	0,83	0,714	[0,32 - 2,20]	ADD	5/175	13/327	0,71	0,529	[0,24 - 2,06]
2	LOC124905 962	rs62107261 T>c	1,65	5/147	12/191	x	x	x	DOM	05/85	13/157	0,71	0,529	[0,24 - 2,06]
			3,20	0/155	0/205	x	x	x	REC	0/90	0/170	x	x	x
11	Intergênico	rs68037604, G>t	18,87	57/245	104/302	0,68	0,039	[0,47 - 0,98]	ADD	3/177	7/335	0,80	0,748	[0,20 - 3,16]
			25,62	52/99	92/111	0,65	0,048	[0,42 - 1,00]	DOM	3/87	7/164	x	x	x
5			2,27	5/146	12/191	0,54	0,259	[0,19 - 1,57]	REC	4/86	14/157	0,51	0,255	[0,16 - 1,61]
			2,68	7/301	11/399	1,04	0,875	[0,61 - 1,80]	ADD	6/174	6/338	1,77	0,301	[0,60 - 5,21]

6	NAIP Intron 3	rs78788470, G>a	DOM	6/148	10/195	0,79	0,647	[0,28 - 2,21]	DOM	6/84	5/167	2,35	0,167	[0,70 - 7,95]
			REC	1/153	1/204	1,32	0,843	[0,08 - 21,35]	REC	0/90	1/171	x	x	
	CENPW Intron 1	rs9388486, C>t	43,71	132/170	199/207	0,81	0,161	[0,60 - 1,10]	ADD	72/108	179/163	0,63	0,010	[0,44 - 0,90]
			DOM	105/46	150/53	0,81	0,388	[0,51 - 1,30]	DOM	54/36	131/40	0,47	0,006	[0,27 - 0,81]
			REC	27/124	49/154	0,68	0,149	[0,40 - 1,15]	REC	18/72	48/123	0,63	0,141	[0,34 - 1,17]
3	AMT			81/225	71/335	1,75	0,004	[1,20 - 2,54]	ADD	49/131	89/249	1,05	0,828	[0,70 - 1,57]
	Downstrea	rs9814873	26,47	73/80	65/138	1,94	0,003	[1,25 - 3,00]	DOM	43/47	76/93	1,12	0,666	[0,67 - 1,87]
	m Variant	A>g		8/145	6/197	1,81	0,281	[0,62 - 5,33]	REC	06/84	13/156	0,86	0,763	[0,31 - 2,34]

FONTE: O Autor (2023). Legenda: CR – cromossomo; SNP – polimorfismo de nucleotídeo único; ADD - modelo genético aditivo; DOM – modelo genético dominante; REC – modelo genético recessivo; MAF – frequência do alelo menor; OR – odds ratio; p – valor de p <0,05; 95%IC – intervalo de confiança; X - análise não realizada; **Em negrito:** selecionado para a análise multivariada. *AMT* – aminomethyltransferase – clivagem da glicina; *ANKRD55* - domínio de repetição de anquirina 55; *HLA-DQB1* - complexo principal de histocompatibilidade, classe II, DQ beta 1; *LINC00243* – Variante de RNA longo não codificante; *CENPW* – proteína W do centrômero; *UBASH3A* – proteína A associada a ubiquitina contendo domínios SH3;

Tabela 5: Análises multivariadas considerando os SNPs para o gene *HLA-DQB1*

Gene	SNP	Modelo	Controle vs. paciente infantil			Controle vs. paciente adulto		
			OR	IC 95%	P	OR	IC 95%	P
	Idade		1,26	[1,12 - 1,43]	<0,0001	0,14	[0,23 - 0,83]	0,011
	Sexo					1,05	[1,02 - 1,07]	0,000
<i>AMT</i>	<i>rs9814873*G</i>	DOM	1,67	[1,01 - 2,76]	0,045			
<i>HLA-DQB1</i>	<i>rs3129716*C</i>	DOM	5,38	[3,22 - 9,00]	<0,0001			
		ADD				2,25	[1,26 - 4,05]	0,006
<i>INS-IGF2</i>	<i>rs17885785*T</i>	ADD	0,47	[0,27 - 0,84]	0,011			
<i>CENPW</i>	<i>rs9388486*T</i>	DOM				0,35	[0,19 - 0,65]	0,001

FONTE: O autor (2023). Legendas: SNP – polimorfismo de nucleotídeo único; ADD - modelo genético aditivo; DOM – modelo genético dominante; MAF – frequência do alelo menor; OR – odds ratio; p – valor de p; IC 95% – intervalo de confiança; *AMT* – aminomethyltransferase – clivagem da glicina; *HLA-DQB1* - complexo principal de histocompatibilidade, classe II, DQ beta 1; *CENPW* – proteína W do centrômero; *INS-IGF2* – fator de crescimento semelhante à insulina II.

Desconsiderando a variante associada do gene *HLA-DQB1*, dada a força da sua associação, observou-se duas outras variantes associadas com DM1 infantil e adulto (Tabela 6).

Tabela 6: Análises multivariadas desconsiderando *HLA-DQB1*.

Gene	SNP	Modelo	Controle vs. paciente infantil			Controle vs. paciente adulto		
			OR	IC 95%	P	OR	IC 95%	P
	Idade		1,27	[1,13 - 1,43]	0,000	0,14	[0,23 - 0,83]	0,011
	Sexo					1,05	[1,02 - 1,07]	0,000
<i>AMT</i>	<i>rs11715915*T</i>	DOM	1,90	[1,20 - 3,00]	0,006			
<i>INS-IGF2</i>	<i>rs17885785*T</i>	ADD	0,46	[0,25 - 0,83]	0,010			
<i>ANKRD55</i>	<i>rs7731626*A</i>	ADD				0,60	[0,37 - 0,96]	0,034
<i>LINC00243</i>	<i>rs88642*T</i>	ADD				2,35	[1,04 - 5,33]	0,040
<i>CENPW</i>	<i>rs9388486*T</i>	DOM				0,29	[0,15 - 0,55]	0,000

FONTE: O autor (2023). Legendas: SNP – polimorfismo de nucleotídeo único; ADD - modelo genético aditivo; DOM – modelo genético dominante; REC – modelo genético recessivo; MAF – frequência do alelo menor; OR – odds ratio; p – valor de p; 95%IC – intervalo de confiança; *AMT* – aminomethyltransferase; *ANKRD55* – proteína 55 contendo domínios repetitivos de anquirina; *CENPW* – proteína centromérica W; *LINC00243* – RNA longo não codificante intergênico 243; *INS-IGF2* – fator de crescimento semelhante à insulina II.

6. DISCUSSÃO

Neste trabalho, encontramos evidências genéticas que respaldam a hipótese de que existem diferentes vias etiológicas para DM1 juvenil e adulto. No entanto, ambas as formas compartilham alelos predisponentes do antígeno leucocitário humano (HLA). De fato, o alelo *rs3129716*C* do gene *HLA-DQB1* em 6p21.3 foi o único associado a suscetibilidade a DM1, independentemente da idade de início (infantil e adulto). O mesmo também é um eQTL (*expression quantitative trait loci*) associado com a modulação da expressão de genes vizinhos. Um destes é o pseudogene *CYP21A1P* (membro 1 da subfamília A da família 21 de citocromos P450), cuja expressão torna-se reduzida em 16 tecidos, especialmente no fígado; assim como o lncRNA *TNXA* (tenascina Xa, reduzida no fígado) e o componente C4a do complemento (reduzido no córtex cerebral). Já o gene que codifica o membro 2 da subfamília A da família 21 do citocromo P450, responsável por codificar a 21-hidroxilase esteroide - *CYP21A2*, apresenta um aumento sutil de expressão no tecido adiposo subcutâneo e sangue total, nos portadores deste alelo (“GTEx Portal”, [s.d.]). Não está claro se a modulação da expressão destes genes, investigado em doadores de origem europeia, interfere na propensão ao desenvolvimento de DM1.

Já o complexo HLA é conhecidamente associado a esta doença, uma vez que é responsável pela apresentação de antígenos a linfócitos T, modulando a propensão a autoimunidades em geral. Em brasileiros de Salvador - BA, a suscetibilidade a DM1 foi associada aos alelos *HLA-DRB1*03*, *-DRB1*04*, *-DQB1*02:01*, *-DQB1*03:02*, e a proteção, aos alelos *HLA-DQB1*06:02*, *-DQB1*03:01* e Antígenos -DR2 e -DR7 (ALVES et al., 2006). Interessantemente, o haplótipo protetor *DRB1*15:01 (DR15)-DQA1*01:02-DQB1*06:02 (DQ6)* é comum em eurodescendentes, ocorrendo em menos de 1% das pessoas com DM1. Dentre pacientes com DM1 que apresentam o haplótipo protetor, é mais frequente encontrar pacientes negativos para autoanticorpos de ilhotas de Langerhans, sendo que os que os apresentam também costumam ser portadores do alelo de risco *DQB1*03:02* (SIMMONS et al., 2020a). Este alelo de risco também aumenta a suscetibilidade a síndrome primária de antifosfolípido seguida por lúpus eritematoso sistêmico (SLE) (KAPITANY et al., 2009) e foi reportado como associado a casos graves de lúpus na Índia (SHANKARKUMAR et al., 2003). Isto está de acordo com os achados de estudos genômicos de associação (GWAS), que identificaram o alelo *HLA-DQB1 rs3129716*C* como associado com a suscetibilidade ao lúpus (4467 pacientes comparados a 9114 controles europeus) (DEMIRCI et al., 2016). Curiosamente, o mesmo também está associado com a doença inflamatória muscular conhecida como polimiosite (903 pacientes comparado a 10260 controles europeus (ROTHWELL et al., 2023).

Além da variante em *HLA-DQB1*, quatro outros polimorfismos foram associados à DM1 infantil. Dois destes, separados por 1218 pb, ocorrem em alto desequilíbrio de ligação em todo o mundo e apresentam 32% de frequência em populações europeias não finlandesas. Os mesmos compõem o haplótipo de risco “GT” no gene da aminometiltransferase (*AMT*) no cromossomo 3p21.31: *rs9814873*G* (variante a jusante do gene) e *rs11715915*T* (variante sinônima nos três principais transcritos alternativos no fígado -

ENST00000273588.9:c.954G>A e *p.Arg318=*, *ENST00000538581.6:c.810G>A* e *p.Arg270=*, *ENST000, mod00636199.1:c.516G>A* e *p.Arg172=*). A variante sinônima também foi associada aos níveis de glicose em jejum (LAGOU et al., 2021) e de ésteres de colesterol do tipo 16:0 (RHEE et al., 2013), e à redução de unidades funcionais de microbiota intestinal (BONDER et al., 2016). Interessantemente, a proporção anormal de éster de colesterol para triglicerídeos já foi descrita em pacientes com DM1 e está associada com o aumento da propensão a doenças cardiovasculares, nesta população de pacientes (GANJALI et al. 2017). Além disso, o gene *AMT* apresentou maior expressão gênica e proteica no fígado de ratos do modelo *Zucker diabetic fatty*, que desenvolvem obesidade e diabetes do tipo 2 (SIMMONS et al., 2020b). Finalmente, a variante *AMT_rs11715915*T* apresenta um efeito trans eQTL, associada a expressão do gene *CAMSAP1* (proteína 1 regulada por calmodulina e associada a spectrina) no cromossomo 9q34.3, em monócitos primários (P=0,0000035) (ZELLER et al., 2010) provavelmente com função imunológica (YI et al., 2021).

A variante *rs17885785*T* está associada a proteção a DM1 infantil. Esta variante ocorre no intron 4 do gene *INS-IGF2* e no exon do transcrito ENST00000381363 do gene antissense do fator de crescimento 2 da insulina (*IGF2-AS*, altamente expresso no fígado e transcrito majoritário deste gene, no pâncreas). *INS-IGF2* e *IGF2-AS* são, além disso, genes parcialmente sobrepostos ao gene da insulina - *INS*, em 11p15.5. De fato, variantes na região ocupada pelo gene *INS* explicam cerca de 10% do risco genético a DM1 (JERRAM; LESLIE, 2017a) e apresentam o maior tamanho de efeito, independente de HLA (ZANDA et al., 2014). Este alelo não parece ter um efeito eQTL importante no pâncreas ou no sangue, apesar de estar associado com a expressão aumentada de *IGF2-AS* no fígado (beta=0,57, P=0,00000004), e levemente aumentada do gene *ASCL2* (fator de transcrição 2 da família Achaete-scute bHLH) em monócitos (beta= 0,04, P= 0,00056). Interessantemente, *ASCL2* está associado a supressão de linfócitos T citotóxicos CD8+ (GARNIER et al., 2013; YANG et al., 2021). Em ratos do modelo Goto-Kakizaki de diabetes tipo 2 espontânea, a produção defeituosa de IGF2 e do receptor IGF1R no pâncreas causam uma deficiência na produção embrionária de células beta, corrigida pela suplementação de IGF2 (CALDERARI et al., 2007). Neste sentido, é interessante notar que a inibição da atividade do antissense *IGF2-AS* protege contra a apoptose induzida por glicose elevada em células epiteliais pigmentares da retina humana, na retinopatia diabética (YU et al., 2019).

O alelo *rs68037604*T*, em região intergênica próxima a *INS-IGF2* e que rompe um sítio CpG próximo ao gene da insulina, reconhecida por várias proteínas reguladoras na linhagem celular MCF7 (incluindo o regulador circadiano CLOCK), não está em desequilíbrio de ligação com *rs17885785*T*, porém também foi associado a proteção contra DM1 infantil na análise univariada. Esta variante apresenta-se associada com a expressão de dois genes em monócitos primários: *TSPAN32* (tetraspanina 32, beta= 0,07, P= 8,2e-7) e também o já mencionado *ASCL2* (beta=0,05, P= 0,0000011) (GARNIER et al., 2013). Interessantemente, *TSPAN32* apresenta papel central em doenças autoimunes como lúpus eritematoso sistêmico e esclerose múltipla, por estar envolvido na apresentação de antígenos e apresentar redução da sua expressão em linfócitos em condições autoimunes, correlacionada com o aumento da expressão de interferons do tipo 1 (BASILE et al., 2020; FAGONE et al., 2021).

Além do alelo *rs3129716*C* do gene *HLA-DQB1*, outros três alelos foram associados a DM1 em adultos, sendo dois com suscetibilidade: *rs3746923*T* do gene *UBASH3A* e *rs886424*T* do lncRNA *LINC00243*, e um com proteção - *rs9388486*T* do gene *CENPW*. Deficiência de *UBASH3A* (proteína A associada a ubiquitina e com domínios SH3) acelera o desenvolvimento de DM1 em modelo de camundongo diabético tipo 1, não obeso (NOD) (CHEN et al., 2020). O alelo associado com suscetibilidade a DM1 em adultos, neste estudo, ocorre em um haplótipo com cerca de 20-25% de frequência em populações eurodescendentes: *TCA (rs3746923*T_ rs80054410*C_ rs11203203*A)*. Os linfócitos T primários CD4⁺ dos portadores deste haplótipo apresentam um aumento da expressão de *UBASH3A* após estimulação do receptor TCR. Isto ocorre pela inibição da sinalização de NF- κ B e efeitos subsequentes no complexo I κ B quinase, resultando na redução da expressão do gene da interleucina 2 (GE et al. 2017). A variante *rs3746923*T* também está associada a modulação da expressão do gene *UBASH3A* e do gene vizinho *TMPRSS3* (protease transmembrana, serina 3) em células do sangue (P= 5.9e-11 e 2.7e-8, respectivamente) (GTEx CONSORTIUM, 2013; WESTRA et al., 2013a). Uma possível importância deste último gene na DM1, ainda não é conhecida.

A variante *rs886424*T* presente no exon do gene do lncRNA *LINC00243* (ENST00000399196.1) em 6p21.3, é reportada como eQTL em 349 instâncias (MUNZ et al., 2015). Está associada com a redução da expressão do gene *APOM* (apolipoproteína M) e *VARS2* (valil-RNAt-sintetase 2) no pâncreas (beta= -0,39 e -0,54, P= 0,00013 e 0,0000016, respectivamente). Também no pâncreas, a variante está associada ao aumento da expressão dos genes (em ordem crescente de expressão): *FLOT1* (flotilina 1), *CCHCR1* (proteína de haste alfa-helical coiled-coil 1), *RNF39* (proteína de dedo de anel 39), *HLA-C*, e *WASF5P* (beta entre 0,39 e 0,91, p=<0,00005) (GTEx v8). No sangue, é considerado o melhor SNP a explicar, dentro do bloco de desequilíbrio de ligação (com 45 SNPs ou mais), a modulação de dois genes vizinhos, a cerca de 70 Kb de distância: *FLOT1* e *IER3* (proteína de resposta precoce imediata 3) (FEHRMANN et al., 2011; WESTRA et al., 2013b). Além disso, atua como trans eQTL (provavelmente porque a forma alterada do lncRNA regula de forma diferenciada, os genes associados), aumentando a expressão de *HLA-DRB1* e *DQAI* em monócitos e macrófagos e, portanto, possivelmente a expressão de antígeno pelas moléculas de classe II a linfócitos T, intensificando a resposta autoimune (CODONI et al., 2016; ZELLER et al., 2010). Em contraste com *HLA-C*, que também é reportado como aumentado no pâncreas, fígado e sangue total de portadores da variante (que dista 454,5 Kb do gene), a expressão de genes de moléculas HLA não clássicas (*HLA-G*, *J*, *K*, *L*, *S* e *T*) apresenta-se reduzida em células do sangue total e linfócitos transformados dos portadores desta variante (entre -0,33 e - 0,74, GTEx v8) (GTEx CONSORTIUM, 2013). A forma mais comum deste lncRNA está expressa no sangue total, baço, pulmão e íleo intestinal (GTEx v8). Embora este gene ocorra na mesma região cromossômica que *HLA-DQB1*, as variantes menos comuns associadas a DM1 não estão em desequilíbrio de ligação, em populações eurodescendentes (apresentam r^2 de 27%, $D'=0,63$).

CENPW codifica a proteína centromérica W, pouco conhecida, que representa um dos genes-chave associado com a transcrição de insulina na linhagem celular pancreática MIN6 (ZHAO et al., 2021). Interessantemente, o seu alelo protetivo *rs9388486*T* está associado a diminuição da sua própria expressão em uma série de tecidos, incluindo sangue total, baço, tecido

adiposo subcutâneo, o nervo tibial e apêndice atrial do coração (beta entre -0,1 e -0,43, $P < 0,00012$, GTEx v8) e ocorre dentro de uma ilha com 27 sítios CpG, logo após um destes sítios.

Na análise multivariada, a variante *HLA-DQB1* *rs3129716**C permaneceu associada a uma suscetibilidade em média 5 e 2 vezes superior a DM1 infantil e adulto, respectivamente, após correção por sexo e idade e independentemente dos SNPs associados dos genes *AMT* e *INS-IGF2*, associados somente a forma infantil, e *CENPW*, somente associada a forma adulta. Excluindo o polimorfismo associado de *HLA-DQB1*, as variantes *ANKRD55* *rs7731626**A no intron 6 e *LINC00243* *rs886424**T no exon 2 surgiram como associadas a proteção e suscetibilidade a DM1 de início adulto, respectivamente. O SNP intrônico do gene *ANKRD55*, *rs7731626**A, está associado com a redução da sua própria expressão no baço e sangue total, e também do gene vizinho *IL6ST* (transdutor de sinal da família de citocinas tipo interleucina 6) no pâncreas (GTEx v8), sendo reconhecido por dezenas de proteínas reguladoras em linhagens celulares linfoblastoides, incluindo o translocador nuclear e receptor de aril hidrocarbono ou ARNT (cuja inibição é protetora contra o desenvolvimento de diabetes (HOANG et al., 2019) e STAT3 (que, quando mutado, pode induzir DM1 devido a um defeito na tolerância de linfócitos T CD8+ - (WARSHAUER et al., 2021). Interessantemente, esta mesma variante está associada com a proteção a artrite reumatoide em indivíduos de diferentes ancestralidades (beta= -0,19, $P = 2 \times 10^{-22}$) (LAUFER et al., 2019). Embora tenha sido associada apenas a forma adulta da DM1, no presente estudo, *rs7731626**A é reportado como associado a diferentes autoimunidades pediátricas, incluindo a DM1 infantil (LI et al., 2015b). Também é interessante observar que outro alelo do mesmo gene, *rs459193**G, com o qual o *rs7731626**A não está em desequilíbrio de ligação, está associado ao aumento da resistência insulínica (mensurada pela redução do índice de Matsuda), em um estudo de coorte dinamarquês (HARDER et al., 2013). Por fim, os polimorfismos intergênico *rs68037604**T e o do gene *UBASH3A* não permaneceram associados nas duas versões de modelos de regressão logística, o que pode ser devido ao poder estatístico deste tamanho amostral, composto por uma população miscigenada.

7. CONCLUSÃO

Tanto fatores genéticos como ambientais, conectados através de mediadores epigenéticos, parecem desempenhar um papel etiológico na DM1. Desvendar estes fatores tem sido empreendido pela investigação “ômica” desde o início deste século. Apesar de alguns sucessos, ainda não explicam grande parte da herdabilidade desta doença. Além disso, os esforços de estudos genômicos (GWAS) têm sido historicamente dedicados às populações europeias ou asiáticas, negligenciando as populações miscigenadas da América Latina. Neste trabalho, selecionamos 48 polimorfismos associados ao DM1 em GWAS, para validação em uma coorte bem caracterizada do Sul do Brasil, de DM1 de início infantil e adulto.

Dentre os 35 polimorfismos selecionados, oito permaneceram associados por regressão logística uni e/ou multivariada, na população sul-brasileira, sendo que dois compõem um haplótipo do gene *AMT*. Somente uma variante foi associada a suscetibilidade aumentada a ambos tipos de DM1, de início precoce (infantil) e tardio (adulto), pertencente ao gene *HLA-DQB1*. A sua exclusão do modelo permitiu identificar mais cinco variantes independentemente associadas a DM1, presentes nos genes: *AMT* e *INS-IGF2* para DM1 de início infantil, e *LINC00243*, *CENPW* e *ANKRD55* para a forma adulta da DM1.

Três variantes foram associadas a proteção: *INS-IGF2_rs17885785*T* para DM1 infantil, e *ANKRD55_rs7731626*A* e *CENPW_rs9388486*T* para DM1 adulto. Enquanto *ANKRD55_rs7731626*A* parece exercer papel pleiotrópico de eQTL em diferentes situações autoimunes, os outros dois estão associados ao desenvolvimento de células beta e produção de insulina. Os únicos polimorfismos associado a propensão a DM1, além do encontrado no gene *HLA-DQB1*, compõem um haplótipo do gene *AMT* (DM1 infantil) e alteram a sequência do transcrito mais comum de um lncRNA (*LINC00243_rs886424*T*, DM1 adulto). Enquanto o primeiro parece regular o metabolismo de colesterol, este último regula muitos genes em diversos tecidos, incluindo genes do complexo HLA, clássicos e não clássicos, classes I e II – sendo possível que a alteração de sua sequência também altere sua atividade reguladora. Por fim, vários dos genes mencionados apresentam associação funcional com DM2, indicando vias etiológicas comuns.

Em conclusão, o DM1, considerado por muito tempo como tendo uma etiologia única, apesar da idade de início variável. No entanto, embora o número/frequência de DM1 juvenil tenha permanecido o mesmo nas últimas décadas, a prevalência de DM1 com início na idade adulta está crescendo em todo o mundo a um ritmo impressionante (SUN et al., 2022). Além disso, os autoanticorpos insulínicos são muito mais comuns no DM1 juvenil e os sintomas normalmente aparecem mais rapidamente (LESLIE et al., 2021; VANDERNIET; JENKINS; DONAGHUE, 2022).

Neste trabalho, encontramos evidências genéticas para diferentes vias etiológicas para DM1 juvenil e adulto. No entanto, ambas as formas compartilham alelos predisponentes do antígeno leucocitário humano (HLA). Os resultados indicam que a propensão genética às duas formas de DM1 difere, e aponta para a importância dos genes próximos a insulina e do gene da

aminometiltransferase na forma infantil, assim como dos do lncRNA *LINC00243*, *CENPW* e *ANKRD55* na forma adulta.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALLEN, S.; HUBER, J.; DEVENDRA, D. Prevalence of organ-specific autoantibodies in childhood- and adult-onset type 1 diabetes. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1150, p. 260–262, dez. 2008.
- ALVES, C. et al. Distribuição e frequência de alelos e haplotipos HLA em brasileiros com diabetes melito tipo 1. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 50, p. 436–444, jun. 2006.
- BASILE, M. S. et al. Impaired Expression of Tetraspanin 32 (TSPAN32) in Memory T Cells of Patients with Multiple Sclerosis. **Brain Sciences**, v. 10, n. 1, p. 52, January 17 2020.
- BONDER, M. J. et al. The effect of host genetics on the gut microbiome. **Nature Genetics**, v. 48, n. 11, p. 1407–1412, nov. 2016.
- CALDERARI, S. et al. Defective IGF2 and IGF1R protein production in embryonic pancreas precedes beta cell mass anomaly in the Goto-Kakizaki rat model of type 2 diabetes. **Diabetologia**, v. 50, n. 7, p. 1463–1471, jul. 2007.
- CHANG, C. C. et al. Second-generation PLINK: rising to the challenge of larger and richer datasets. **GigaScience**, v. 4, n. 1, p. 7, dez. 2015.
- CHEN, Y.-G. et al. UBASH3A deficiency accelerates type 1 diabetes development and enhances salivary gland inflammation in NOD mice. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 12019, July 21. 2020.
- CODONI, V. et al. Preservation Analysis of Macrophage Gene Coexpression Between Human and Mouse Identifies PARK2 as a Genetically Controlled Master Regulator of Oxidative Phosphorylation in Humans. **G3 (Bethesda, Md.)**, v. 6, n. 10, p. 3361–3371, 13 out. 2016.
- 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. e938-945, abr. 2014.
- DE ALBUQUERQUE, R. S. et al. Association of HLA-G 3' untranslated region variants with type 1 diabetes mellitus. **Human Immunology**, v. 77, n. 4, p. 358–364, 2016.
- DEMIRCI, F. Y. et al. Identification of a New Susceptibility Locus for Systemic Lupus Erythematosus on Chromosome 12 in Individuals of European Ancestry. **Arthritis & Rheumatology (Hoboken, N.J.)**, vol. 68, no. 1, pp. 174–183, Jan. 2016.
- EIZIRIK, D. L.; COLLI, M. L.; ORTIS, F. The role of inflammation in insulinitis and beta-cell loss in type 1 diabetes. **Nature Reviews. Endocrinology**, v. 5, n. 4, p. 219–226, abr. 2009.
- EIZIRIK, D. L.; PASQUALI, L.; CNOP, M. Pancreatic β -cells in type 1 and type 2 diabetes mellitus: different pathways to failure. **Nature Reviews. Endocrinology**, v. 16, n. 7, p. 349–362, jul. 2020.
- FAGONE, P. et al. Altered Expression of TSPAN32 during B Cell Activation and Systemic Lupus Erythematosus. **Genes**, v. 12, n. 6, p. 931, 18 jun. 2021.

FEHRMANN, R. S. N. et al. Trans-eQTLs reveal that independent genetic variants associated with a complex phenotype converge on intermediate genes, with a major role for the HLA. **PLoS Genetics**, v. 7, n. 8, p. e1002197, ago. 2011.

GALLAGHER, M. P.; GOLAND, R. S.; GREENBAUM, C. J. Making progress: preserving beta cells in type 1 diabetes. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1243, p. 119–134, dez. 2011.

GARNIER, S. et al. Genome-wide haplotype analysis of cis expression quantitative trait loci in monocytes. **PLoS Genetics**, v. 9, n. 1, p. e1003240, 2013.

GOPAL KRISHNAN, P. D. et al. Rab GTPases: Emerging Oncogenes and Tumor Suppressive Regulators for the Editing of Survival Pathways in Cancer. **Cancers**, v. 12, n. 2, p. 259, January 21, 2020.

GORODEZKY, C. et al. HLA and autoimmune diseases: Type 1 diabetes (T1D) as an example. **1st Colombian Autoimmune Symposium**, v. 5, n. 3, p. 187–194, March 1. 2006.

GTEX CONSORTIUM. The Genotype-Tissue Expression (GTEx) project. **Nature Genetics**, v. 45, n. 6, p. 580–585, jun. 2013.

GTEx Portal. Disponível em: <<https://gtexportal.org/home/>>. Acesso em: 22 out. 2023.

HARDER, M. N. et al. Type 2 diabetes risk alleles near BCAR1 and in ANK1 associate with decreased β -cell function whereas risk alleles near ANKRD55 and GRB14 associate with decreased insulin sensitivity in the Danish Inter99 cohort. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 98, n. 4, p. E801-806, abr. 2013.

HARJUTSALO, V.; SJÖBERG, L.; TUOMILEHTO, J. Time trends in the incidence of type 1 diabetes in Finnish children: a cohort study. **Lancet (London, England)**, v. 371, n. 9626, p. 1777–1782, 24 Maio 2008.

HOANG, M. et al. The Loss of ARNT/HIF1 β in Male Pancreatic β -Cells Is Protective Against High-Fat Diet-Induced Diabetes. **Endocrinology**, v. 160, n. 12, p. 2825–2836, 1 dez. 2019.

HOLT, R. I. G. et al. Correction to: The management of type 1 diabetes in adults. A consensus report by the American Diabetes Association (ADA) and the European Association for the Study of Diabetes (EASD). **Diabetologia**, v. 65, n. 1, p. 255, Jan. 2022.

HOWE, K. L. et al. Ensembl 2021. **Nucleic Acids Research**, v. 49, n. D1, p. D884–D891, 8 jan. 2021.

ILONEN, J.; LEMPAINEN, J.; VEIJOLA, R. The heterogeneous pathogenesis of type 1 diabetes mellitus. **Nature Reviews. Endocrinology**, v. 15, n. 11, p. 635–650, nov. 2019.

JERRAM, S. T.; LESLIE, R. D. The Genetic Architecture of Type 1 Diabetes. **Genes**, v. 8, n. 8, p. 209, 2017a.

JERRAM, S. T.; LESLIE, R. D. The Genetic Architecture of Type 1 Diabetes. **Genes**, v. 8, n. 8, p. 209, 22 ago. 2017b.

JULIER, C. et al. Insulin-IGF2 region on chromosome 11p encodes a gene implicated in HLA-DR4-dependent diabetes susceptibility. **Nature**, v. 354, n. 6349, p. 155–159, nov. 1991.

- KAPITANY, A. et al. Human leukocyte antigen-DRB1 and -DQB1 genotyping in lupus patients with and without antiphospholipid syndrome. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1173, p. 545–551, set. 2009.
- KARAKOSE, E. et al. Aberrant methylation underlies insulin gene expression in human insulinoma. **Nature Communications**, v. 11, n. 1, p. 5210, 15 out. 2020.
- KARJALAINEN, J. et al. A comparison of childhood and adult type I diabetes mellitus. **The New England Journal of Medicine**, v. 320, n. 14, p. 881–886, 6 abr. 1989.
- KIM, S.-S. et al. A comprehensive integrated post-GWAS analysis of Type 1 diabetes reveals enhancer-based immune dysregulation. **PloS One**, v. 16, n. 9, p. e0257265, 2021.
- KRISCHER, J. P. et al. Characteristics of children diagnosed with type 1 diabetes before vs. after 6 years of age in the TEDDY cohort study. **Diabetologia**, v. 64, n. 10, p. 2247–2257, out. 2021.
- LAGOU, V. et al. Sex-dimorphic genetic effects and novel loci for fasting glucose and insulin variability. **Nature Communications**, v. 12, n. 1, p. 24, January 5, 2021.
- LAHIRI, D. K.; NURNBERGER, J. I. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. **Nucleic Acids Research**, v. 19, n. 19, p. 5444, 11 out. 1991.
- LAUFER, V. A. et al. Genetic influences on susceptibility to rheumatoid arthritis in African-Americans. **Human Molecular Genetics**, v. 28, n. 5, p. 858–874, March 1. 2019.
- LEETE, P. et al. Differential Insulinitic Profiles Determine the Extent of β -Cell Destruction and the Age at Onset of Type 1 Diabetes. **Diabetes**, vol. 65, no. 5, pp. 1362–1369, May 2016.
- LESLIE, R. D. et al. Adult-Onset Type 1 Diabetes: Current Understanding and Challenges. **Diabetes Care**, v. 44, n. 11, p. 2449–2456, 1 nov. 2021.
- LI, Y. R. et al. Meta-analysis of shared genetic architecture across ten pediatric autoimmune diseases. **Nature medicine**, v. 21, n. 9, p. 1018–1027, set. 2015a.
- LI, Y. R. et al. Meta-analysis of shared genetic architecture across ten pediatric autoimmune diseases. **Nature Medicine**, v. 21, n. 9, p. 1018–1027, set—2015 b.
- LIBMAN, I. et al. ISPAD Clinical Practice Consensus Guidelines 2022: Definition, epidemiology, and classification of diabetes in children and adolescents. **Pediatric Diabetes**, v. 23, n. 8, p. 1160–1174, dez. 2022.
- LIU, M.; YUAN, W.; PARK, S. Association between IL-10 rs3024505 and susceptibility to inflammatory bowel disease: A systematic review and meta-analysis. **Cytokine**, v. 149, p. 155721, jan. 2022.
- LIU, R.-T. et al. Correlations of IL-6 and IL-10 gene polymorphisms with childhood acute lymphoblastic leukemia. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**, vol. 24, no. 15, pp. 8048–8056, August. 2020.
- LUCIER, J.; WEINSTOCK, R. S. Type 1 Diabetes. Em: **StatPearls**. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2023.

MAAHS, D. M. et al. Epidemiology of type 1 diabetes. **Endocrinology and Metabolism Clinics of North America**, v. 39, n. 3, p. 481–497, set. 2010.

MAGLIANO, D.; BOYKO, E. J. **IDF diabetes atlas**. 10th edition ed. Brussels: International Diabetes Federation, 2021.

MARTINS, B. R. UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ. 2022.

MARTINS, B.R. **Estudo do 1,5-anidroglicitol e polimorfismos nos genes da insulina (ins) e do sistema antígeno leucocitário humano (HLA) no diabetes mellitus tipo 1 de início na infância e na idade adulta**. Tese de Doutorado—CURITIBA, PR, BRASIL: UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ, 2022.

MENA, J. et al. Genomic Multiple Sclerosis Risk Variants Modulate the Expression of the ANKRD55–IL6ST Gene Region in Immature Dendritic Cells. **Frontiers in Immunology**, v. 12, 2022.

MERGER, S. R.; LESLIE, R. D.; BOEHM, B. O. The broad clinical phenotype of Type 1 diabetes at presentation. **Diabetic Medicine: A Journal of the British Diabetic Association**, v. 30, n. 2, p. 170–178, Feb. 2013.

MILLER, R. G. et al. DNA methylation and 28-year cardiovascular disease risk in type 1 diabetes: the Epidemiology of Diabetes Complications (EDC) cohort study. **Clinical epigenetics**, v. 15, n. 1, p. 122–122, 2023.

MOBASSERI, M. et al. Prevalence and incidence of type 1 diabetes in the world: a systematic review and meta-analysis. **Health Promotion Perspectives**, v. 10, n. 2, p. 98–115, 2020.

MUNZ, M. et al. Multidimensional gene search with Genehopper. **Nucleic Acids Research**, v. 43, n. W1, pp. W98–W103, July 1, 2015.

NARISAWA, A. et al. Mutations in genes encoding the glycine cleavage system predispose to neural tube defects in mice and humans. **Human Molecular Genetics**, v. 21, n. 7, p. 1496–1503, 1 abr. 2012.

OLIVEIRA, L. C. et al. The Second Highest Prevalence of Celiac Disease Worldwide: Genetic and Metabolic Insights in Southern Brazilian Mennonites. **Genes**, v. 14, n. 5, p. 1026, 30 abr. 2023.

OSCANOA, J. et al. SNPnexus: a web server for functional annotation of human genome sequence variation (2020 update). **Nucleic Acids Research**, v. 48, n. W1, p. W185–W192, July 2 2020.

POCIOT, F.; LERNMARK, Å. Genetic risk factors for type 1 diabetes. **Lancet (London, England)**, v. 387, n. 10035, p. 2331–2339, 4 jun. 2016.

PURCELL, S. et al. PLINK: A Tool Set for Whole-Genome Association and Population-Based Linkage Analyses. **The American Journal of Human Genetics**, v. 81, n. 3, p. 559–575, 1 set. 2007.

REDONDO, M. J.; STECK, A. K.; PUGLIESE, A. Genetics of type 1 diabetes. **Pediatric Diabetes**, vol. 19, no. 3, pp. 346–353, May 2018.

RHEE, E. P. et al. A genome-wide association study of the human metabolome in a community-based cohort. **Cell Metabolism**, v. 18, n. 1, p. 130–143, July 2 2013.

RODAKCI, M et al. **Diretriz Oficial da Sociedade Brasileira de Diabetes (2022)**. , 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.29327/557753.2022-1>>

ROTHWELL, S. et al. Identification of Novel Associations and Localization of Signals in Idiopathic Inflammatory Myopathies Using Genome-Wide Imputation. **Arthritis & Rheumatology (Hoboken, N.J.)**, vol. 75, no. 6, pp. 1021–1027, June 2023.

SABBAH, E. et al. Genetic, autoimmune, and clinical characteristics of childhood- and adult-onset type 1 diabetes. **Diabetes Care**, v. 23, n. 9, p. 1326–1332, set. 2000.

SADEGHI, A. et al. Circulating levels of C1q/TNF- α -related protein 6 (CTRP6) in polycystic ovary syndrome. **IUBMB life**, v. 72, n. 7, p. 1449–1459, jul. 2020.

SHANKARKUMAR, U. et al. HLA-DRB1*03 and DQB1*0302 associations in a subset of patients severely affected with systemic lupus erythematosus from western India. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 62, n. 1, p. 92–93, Jan. 2003.

SHOAIB, M. et al. Evaluation of polygenic risk scores to differentiate between type 1 and type 2 diabetes. **Genetic epidemiology**, v. 47, n. 4, p. 303–313, 2023.

SIDARALA, V. et al. Mitophagy protects β cells from inflammatory damage in diabetes. **JCI insight**, v. 5, n. 24, p. e141138, 141138, 17 dez. 2020.

SIMELL, S. et al. Age at Development of Type 1 Diabetes- and Celiac Disease-Associated Antibodies and Clinical Disease in Genetically Susceptible Children Observed From Birth. **Diabetes care**, v. 33, n. 4, p. 774–779, 2010.

SIMMONS, K. M. et al. Failed Genetic Protection: Type 1 Diabetes in the Presence of HLA-DQB1*06:02. **Diabetes**, v. 69, n. 8, p. 1763–1769, ago. 2020a.

SIMMONS, R. M. et al. Obesity increases hepatic glycine dehydrogenase and aminomethyltransferase expression while dietary glycine supplementation reduces white adipose tissue in Zucker diabetic fatty rats. **Amino Acids**, v. 52, n. 10, p. 1413–1423, out. 2020b.

ŠKRHA, J. ADA Standards of Medical Care in Diabetes 2022 - whats new? **Vnitřní Lekarství**, v. 68, n. 2, p. 85–88, 2022.

SUN, H. et al. IDF Diabetes Atlas: Global, regional and country-level diabetes prevalence estimates for 2021 and projections for 2045. **Diabetes research and clinical practice**, v. 183, p. 109119–109119, 2022.

VAN LAERE, A.-S. et al. A regulatory mutation in IGF2 causes a major QTL effect on muscle growth in the pig. **Nature**, v. 425, n. 6960, p. 832–836, out. 2003.

VANDERNIET, J. A.; JENKINS, A. J.; DONAGHUE, K. C. Epidemiology of Type 1 Diabetes. **Current Cardiology Reports**, v. 24, n. 10, p. 1455–1465, out. 2022.

VANDEWALLE, J. et al. Combined glucocorticoid resistance and hyperlactatemia contributes to lethal shock in sepsis. **Cell Metabolism**, v. 33, n. 9, p. 1763- 1776.e5, set. 2021.

- WARSHAUER, J. T. et al. A human mutation in STAT3 promotes type 1 diabetes through a defect in CD8⁺ T cell tolerance. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 218, n. 8, p. e20210759, 2 ago. 2021.
- WEKSBERG, R. et al. Disruption of insulin-like growth factor 2 imprinting in Beckwith–Wiedemann syndrome. **Nature Genetics**, v. 5, n. 2, p. 143–150, out. 1993.
- WESTRA, H.-J. et al. Systematic identification of trans eQTLs as putative drivers of known disease associations. **Nature Genetics**, v. 45, n. 10, p. 1238–1243, out. 2013a.
- WESTRA, H.-J. et al. Systematic identification of trans eQTLs as putative drivers of known disease associations. **Nature Genetics**, v. 45, n. 10, p. 1238–1243, out. 2013b.
- WINKLER, C. et al. Feature ranking of type 1 diabetes susceptibility genes improves prediction of type 1 diabetes. **Diabetologia**, v. 57, n. 12, p. 2521–2529, 2014.
- YANG, Q. et al. Potential Mechanism of Immune Evasion Associated with the Master Regulator ASCL2 in Microsatellite Stability in Colorectal Cancer. **Journal of Immunology Research**, v. 2021, p. 5964752, 2021.
- YANG, X.-K. et al. UBASH3A gene polymorphisms and expression profile in rheumatoid arthritis. **Autoimmunity**, v. 52, n. 1, p. 21–26, Feb. 2019.
- YI, Y. et al. CAMSAP1 Mutation Correlates With Improved Prognosis in Small Cell Lung Cancer Patients Treated With Platinum-Based Chemotherapy. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 9, p. 770811, 2021.
- YU, X. et al. Long noncoding RNA IGF2AS regulates high-glucose-induced apoptosis in human retinal pigment epithelial cells. **IUBMB life**, v. 71, n. 10, p. 1611–1618, out. 2019.
- ZAJEC, A. et al. Pathogenesis of Type 1 Diabetes: Established Facts and New Insights. **Genes**, v. 13, n. 4, p. 706, 16 abr. 2022.
- ZANDA, M. et al. A Genome-Wide Assessment of the Role of Untagged Copy Number Variants in Type 1 Diabetes. **PLOS Genetics**, vol. 10, no. 5, p. e1004367, May 29, 2014.
- ZELLER, T. et al. Genetics and beyond--the transcriptome of human monocytes and disease susceptibility. **PLOS ONE**, vol. 5, no. 5, p. e10693, 18 May 2010.
- ZHANG, M. et al. HLA-DQB1 and HLA-DRB1 Variants Confer Susceptibility to Latent Autoimmune Diabetes in Adults: Relative Predispositional Effects among Allele Groups. **Genes**, v. 10, n. 9, p. 710, 13 set. 2019.
- ZHAO, R. et al. Single-cell heterogeneity analysis and CRISPR screens in MIN6 cell line reveal transcriptional regulators of insulin. **Cell Cycle (Georgetown, Tex.)**, v. 20, n. 19, p. 2053–2065, out. 2021.
- ZHU, M. et al. Identification of Novel T1D Risk Loci and Their Association With Age and Islet Function at Diagnosis in Autoantibody-Positive T1D Individuals: Based on a Two-Stage Genome-Wide Association Study. **Diabetes Care**, v. 42, n. 8, p. 1414–1421, ago. 2019.

9. APÊNDICE

9.1.APÊNDICE 1: ARTIGO PUBLICADO EM CO-AUTORIA

Article

The Second Highest Prevalence of Celiac Disease Worldwide: Genetic and Metabolic Insights in Southern Brazilian Mennonites

Luana Caroline Oliveira ^{1,2} , Amanda Coelho Dornelles ¹, Renato Mitsunori Nisihara ³, Estevan Rafael Dutra Bruginski ⁴, Priscila Ianzen dos Santos ^{1,5}, Gabriel Adelman Cipolla ^{1,2} , Stefanie Epp Boschmann ^{3,5}, Iara José de Messias-Reason ^{3,5}, Francinete Ramos Campos ⁴, Maria Luiza Petzl-Erler ^{1,2}  and Angelica Beate Winter Boldt ^{1,2,*}

- ¹ Laboratory of Human Molecular Genetics, Department of Genetics, Federal University of Paraná (UFPR), Centro Politécnico, Jardim das Américas, Curitiba 81531-990, Paraná, Brazil
 - ² Postgraduate Program in Genetics, Department of Genetics, Federal University of Paraná (UFPR), Centro Politécnico, Jardim das Américas, Curitiba 81531-990, Paraná, Brazil
 - ³ Laboratory of Molecular Immunopathology, Department of Clinical Pathology, Clinical Hospital, Federal University of Paraná (UFPR), Rua General Carneiro, 181 Prédio Central, 11° Andar, Alto da Glória, Curitiba 80060-240, Paraná, Brazil
 - ⁴ Postgraduate Program in Pharmaceutical Sciences, Laboratory of Bioscience and Mass Spectrometry, Department of Pharmacy, Federal University of Paraná (UFPR), Av. Pref. Lothário Meissner, 632, Jardim Botânico, Curitiba 80210-170, Paraná, Brazil
 - ⁵ Postgraduate Program in Internal Medicine, Federal University of Paraná (UFPR), Rua General Carneiro, 181 Prédio Central, 11° Andar, Alto da Glória, Curitiba 80060-240, Paraná, Brazil
- * Correspondence: angelicaboldt@gmail.com; Tel.: +55-41-99910-4470



Citation: Oliveira, L.C.; Dornelles, A.C.; Nisihara, R.M.; Bruginski, E.R.D.; Santos, P.L.; Cipolla, G.A.; Boschmann, S.E.; Messias-Reason, I.J.d.; Campos, F.R.; Petzl-Erler, M.L.; et al. The Second Highest Prevalence of Celiac Disease Worldwide: Genetic and Metabolic Insights in Southern Brazilian Mennonites. *Genes* **2023**, *14*, 1026. <https://doi.org/10.3390/genes14051026>

Academic Editor: Andreas R. Jancke

Received: 20 January 2023

Revised: 26 April 2023

Accepted: 27 April 2023

Published: 30 April 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Celiac disease (CD), despite its high morbidity, is an often-underdiagnosed autoimmune enteropathy. Using a modified version of the Brazilian questionnaire of the 2013 National Health Survey, we interviewed 604 Mennonites of Frisian/Flemish origin that have been isolated for 25 generations. A subgroup of 576 participants were screened for IgA autoantibodies in serum, and 391 participants were screened for HLA-DQ2.5/DQ8 subtypes. CD seroprevalence was 1:29 (3.48%, 95% CI = 2.16–5.27%) and biopsy-confirmed CD was 1:75 (1.32%, 95% CI = 0.57–2.59%), which is superior to the highest reported global prevalence (1:100). Half (10/21) of the patients did not suspect the disease. HLA-DQ2.5/DQ8 increased CD susceptibility (OR = 12.13 [95% CI = 1.56–94.20], $p = 0.003$). The HLA-DQ2.5 carrier frequency was higher in Mennonites than in Brazilians ($p = 7 \times 10^{-6}$). HLA-DQ8 but not HLA-DQ2.5 carrier frequency differed among settlements ($p = 0.007$) and was higher than in Belgians, a Mennonite ancestral population ($p = 1.8 \times 10^{-6}$), and higher than in Euro-Brazilians ($p = 6.5 \times 10^{-6}$). The glutathione pathway, which prevents reactive oxygen species-causing bowel damage, was altered within the metabolic profiles of untreated CD patients. Those with lower serological positivity clustered with controls presenting close relatives with CD or rheumatoid arthritis. In conclusion, Mennonites have a high CD prevalence with a strong genetic component and altered glutathione metabolism that calls for urgent action to alleviate the burden of comorbidities due to late diagnosis.

Keywords: celiac disease; Mennonites; HLA-DQ2.5; HLA-DQ8; founder effect; glutathione; subdiagnosis

1. Introduction

Celiac Disease (CD) is a chronic, immune-mediated enteropathy of the small intestine caused by exposure to dietary gluten (insoluble gliadin polypeptides found in wheat, rye, barley, and other closely related grains) in genetically predisposed individuals [1]. CD has a strong genetic association with the human leukocyte antigens (HLA) HLA-DQ2.5 (DQA1*05-DQB1*02 haplotype) and HLA-DQ8 (DQA1*03-DQB1*03:02 haplotype), which are estimated to account for up to 40% of the heritability [2]. However, only 3% of HLA-DQ2.5-positive and/or HLA-DQ8-positive Europeans consuming gluten develop the

disorder, indicating that other genetic and/or environmental factors are involved in CD pathogenesis [3].

The clinical presentation varies from typical gastrointestinal symptoms such as diarrhea, steatorrhea, weight loss, bloating, flatulence, and abdominal pain to extraintestinal manifestations such as abnormal liver function, iron deficiency anemia, bone disease, and skin disorders. Affected individuals may also remain asymptomatic for a long time, despite the growing loss of their intestinal villi [4–6]. They are often detected through serologic testing of CD-specific autoantibodies and definitively diagnosed with a duodenal mucosal biopsy [7]. Nevertheless, clinical heterogeneity complicates the diagnostic work-up, delaying the diagnosis or allowing the disease to remain unrecognized, causing CD to be highly underdiagnosed. A gluten-free diet (GFD) is the main form of treatment. Affected individuals who are non-compliant with a GFD and/or have been lately diagnosed may develop polyautoimmunity, osteoporosis, sterility, sexual dysfunction, and dermatologic, neurological and psychiatric disorders, as well as small bowel adenocarcinoma, lymphoma, and carcinoma of the esophagus [8–10]. CD prevalence is higher in females, individuals with certain disorders (type 1 diabetes mellitus, autoimmune thyroiditis, Down syndrome, for example), and first-degree relatives of CD patients [11]. The global CD seroprevalence is 1.4% (95% CI = 1.1–1.7%), with the highest seroprevalence reported to date being 5.6% in the isolated Saharawi people of Western Sahara [12]. On the other hand, the global prevalence of biopsy-confirmed CD is 0.7% (95% CI = 0.5–0.9%), with the highest prevalence in Europe (0.8%) and Oceania (0.8%) and the lowest prevalence in South America (0.4%); the prevalence is 0.24% (1:417) in Curitiba, the capital city of Paraná state in Brazil [13,14]. This city also harbors three Mennonite settlements.

Mennonite is the name given to people belonging to a pacifist religious group that emerged in the 16th century during the Anabaptist Movement in Europe. They have passed through at least three bottlenecks, living in isolated communities for more than 20 generations. In Brazil, approximately 1,200 Mennonites (200 families) arrived in the state of Santa Catarina in 1930. From there, several families moved to Curitiba (CTB/PR). Another 86 families moved to Rio Grande do Sul state in 1949 and founded Nova Colony (CN/Aceguá-RS). In 1951, 74 families, totaling 455 people, settled in the Witmarsum Colony (CW/Palmeira-PR) [15]. Although marriages were mostly random within the Mennonite colonies, approximately five centuries of isolation favored consanguinity [15]. Inbreeding contributes to the increase in homozygosity above the level predicted under the Hardy–Weinberg equilibrium and to the expression of specific recessive phenotypes due to allele sharing within families [16–18]. Thus, the Mennonites offer an excellent model for studies of complex diseases, thanks also to the accuracy of their genealogical records [19].

We performed a pilot study in January 2013 including 93 individuals from the Witmarsum Mennonite community that were previously enrolled in a genetic population study for lactose intolerance [20]. We found serologically positive anti-endomysial results in three individuals who unsuspected the disease (3.2%). This prompted us to launch an epidemiological, transversal field study lasting from October 2016 to December 2018. The daily consumption of gluten reported in the previous pilot study further justified a tracking study of celiac disease in this population. In this work, we identified one of the highest CD prevalence rates worldwide, which was associated with the distribution of predisposing HLA-DQ variants in Mennonites. Given that the prevalence of CD in first-degree relatives (FDR) of celiac patients increases by 2–21%, depending on the population, gender, and HLA-DQ genotype [21], populational screening of Mennonites is of high public health value regarding preventive medicine, allowing the identification of individuals who will benefit from early dietary intervention, i.e., a GFD.

2. Materials and Methods

2.1. Patient and Public Involvement

Representatives of the Mennonite population, concerned with the apparent high frequency of gastrointestinal symptoms and cancer in their communities, personally directed

a request for the identification of the underlying causes and prevention of chronic diseases to the current coordinator of the project. This prompted us to start a survey of lactose intolerance, which was followed by the current epidemiological survey of celiac disease. We previously discussed the strategy of contact, personal interviews, and timing and location of recruitment with the leaders of all communities. We invited the population to participate through an article published in German in the local newspaper, letters, and emails distributed by the residents' associations and through short oral communications given during the service in the local churches. Mennonite health workers (physicians, nutritionists, nurses, pharmacists, psychologists), educators, and preachers were engaged in the project from the very beginning, both to motivate participation in the study and to support the deliverance of general results (regarding findings about prevalence and prevention of celiac disease) in talks given during special meetings. All community leaders are in close contact with the project coordinator.

2.2. Epidemiological Study

We aimed at 200 individuals from each of the three largest settlements to reach a sample that might be representative of the Mennonite Brazilian population and with enough statistical power to identify an HLA genetic effect (higher than 80%). Inclusion criteria: Mennonite origin for at least one of the parents (sharing a common migratory route from the Netherlands to Poland, then to Ukraine, and from there again to Germany and later to Brazil or Paraguay), more than 12 years of age, capacity to understand and answer the questions of the interviews. Exclusion criteria: ceasing participation in the study.

Thirty-eight individuals who participated in the pilot study were also included in this study; they were interviewed and screened a second time. In total, we interviewed 604 Mennonites: 200 from Nova Colony (CON), a Mennonite settlement near the Uruguayan border (Aceguá-RS); 210 from Witmarsum Colony (CWI), cc. 70 Km from Curitiba (Palmeira-PR); and 194 from Curitiba (CTB), the capital city from Paraná state. To this end, we added some questions to the basic questionnaire of the National Health Survey (PNS) of 2013. Each interview lasted approximately one hour and included questions about parental ancestry, place of birth of grandparents and migratory route, eating and life habits, language, family atmosphere, exposure to mutagens, medical diagnosis of chronic diseases (confirmed by medical reports), and familial disease aggregation. Genealogical records and information given by participants were used to confirm their Mennonite ancestry. Weight, height, waist circumference, and blood pressure were measured according to the guidelines available at www.pns.icict.fiocruz.br and in the *Manual of Anthropometry* used in the 2013 PNS.

2.3. Serological Screening

Serum samples of 576 individuals were collected in tubes containing thixotropic gel, then centrifuged, aliquoted, and immediately stored at -20 °C. This represents nearly 95% of those interviewed in each community: 200 individuals from CON (100%); 207 from CWI (98.6%); and 169 from CTB (87.1%). Twenty-eight individuals reported having a previous result, obtained by an anti-tissue transglutaminase (tTG) or anti-deamidated gliadin-related peptide (DGP) serological test, 11 being positive. Among them, three individuals on a strict GFD were also included in the serological screening and found to be negative, as expected (Supplementary Table S1). Eight of the 11 positive cases also underwent biopsy exams that confirmed the diagnosis.

We further screened 93 individuals from CON, 80 from CWI, and 17 from CTB with a test that has a specificity of about 99% (97–100%) [22], namely indirect immunofluorescence with anti-human endomysial IgA antibody screening (IgA-EmA, Southern Biotech) on human umbilical cord cryostat sections [23]. This same test was also performed in 98 individuals from CWI and 25 from CTB that were later screened and found to be negative for tTG or DGP (see below). This double testing confirmed the diagnostic sensitivity and specificity [22]. We further performed enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) serological screening with tTG IgA (Euroimmun, Germany) in 27 individuals from CON, 67

from CWI, and 64 from CTB; and with DGP IgA (ORGENTEC Diagnostika Mainz, DE) in 80 individuals from CON, 58 from CWI, and 88 from CTB. None were screened for both. Both assays were performed according to the manufacturer's instructions, using calibration curves. The results were given using positive, negative, and cut-off controls (20 units for tTG). There were no false positives. The only two tTG positive results were also IgA-EMA positive (Supplementary Table S1). Importantly, DGP-IgA is not an autoantibody but a marker of an ongoing celiac autoimmune response.

Positive results were given to the participants, or to their legal guardians, during personal visits accompanied by a Mennonite nutritionist, with instructions to adhere to a GFD. In collaboration with the physicians serving the communities, all positive cases after screening for autoantibodies (anti-DGP and/or IgA-EMA) were advised to confirm the diagnosis through duodenal biopsy, based on the histological findings of the duodenal mucosa in accordance with the Marsh classification [24]. This approach followed the European guidelines, since biopsy-sparing diagnoses are still challenging in adults, despite almost 100% sensitivity and specificity [22].

2.4. HLA-DQ2.5/DQ8 Genetic Screening

Blood from 391 individuals (64.7% of those interviewed) was collected in tubes containing ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) anticoagulant. Of those, 115 individuals were from CON (57.5%), 155 from CWI (73.8%), and 121 from CTB (62.4%). Genomic DNA was extracted from whole blood according to the Wizard® Genomic DNA Purification kit protocol (Promega, Madison, WI, USA). We identified CD-predisposing *HLA* genotypes—*DQA1*05-DQB1*02* (DQ2.5) and *DQA1*03-DQB1*03:02* (DQ8)—without discriminating homozygotes from heterozygotes, by analyzing the melting curve of sequence-specific real-time PCR products using a Viia7 Real-Time PCR system (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Sequence-specific primers for *DQA1*05*, *DQB1*02*, *DQA1*03*, and *DQB1*03:02* were described by others [25,26]. A fragment of the galactosylceramidase gene (*GALC*) was used as an internal amplification control. The amplification protocols and conditions differed for each CD-predisposing *HLA* allele (Supplementary Tables S2 and S3).

2.5. Metabolomic Analysis by LC-HRMS

In this study, an untargeted liquid chromatography–high-resolution mass spectrometry (LC-HRMS) metabolomics approach was used to compare the metabolic state of healthy controls (Mennonites without CD—control group, CT) and Mennonites with CD (serologically positive, newly diagnosed in this study but not under a gluten free diet) to identify differences between their metabolite profiles. This approach was based on the concentration profile of all measurable free low molecular weight metabolites (without targeting a particular analyte/groups of analytes).

We compared five newly diagnosed Mennonites with CD (two 1:5 IgA-EMA positive, two 1:80 IgA-EMA positive, and one positive for anti-tTG IgA) with five CT (serologically negative). Sample preparation and analysis followed a modified version of an already described method [27] (Appendix A). LC-HRMS-based untargeted metabolomics analysis was carried out on an Ultra-Performance Liquid Chromatograph (UPLC) (Acquity UPLC System, Waters Corporation, Milford, MA, USA) coupled to a quadrupole time-of-flight mass spectrometer (QTOF MS) (Xevo G2-S TOF MS, Waters Corporation, Milford, MA, USA) with electrospray ionization (ESI) in positive ion mode. Chromatographic separation was performed on a Waters Acquity column HSS T3 C18 (100 × 2.1 mm, I.D. 1.8 µm). Mobile phase A was HPLC grade water containing 0.1% formic acid and mobile phase B was acetonitrile containing 0.1% formic acid. The column and the autosampler were maintained at temperatures of 25°C and 4°C, respectively. An 18 min linear gradient elution was performed as follows: 100% mobile phase A for the first 5 min, changing to 100% B over 14 min, holding at 100% B for 1 min, and finally back to 100% A at 15 min, holding for 3 min. HRMS source parameters were set with a capillary voltage of 3.2 kV in positive mode, with a cone voltage of 30 V. The cone and desolvation temperatures and gas

flows (nitrogen) were of 120°C and 350°C and 20 L/h and 900 L/h, respectively. MS spectra were acquired in full scan analysis over an m/z range of 100–1000 Da. The data station operating software was MassLynx 4.1. A LockSpray solution (leucine enkephalin— m/z 556.2771) was used to maintain mass accuracy during the run time.

LC-HRMS analyses from the CD and CT groups resulted in one dataset (ESI⁺ mode). All LC-HRMS data (.raw files) were converted to the .mzML format using Proteowizard's MSConvert software. After conversion, the spectra were uploaded to R 4.0.5 (Cran, <https://cran.r-project.org/>, accessed on 29 November 2022) and pre-processed with the MetaboAnalystR 3.0 package [28]. The feature matrix was exported to the web platform MetaboAnalyst 5.0 to perform the statistical analysis.

2.6. Statistical and Bioinformatic Analyses

Comparisons of quantitative variables were made with ANOVA or Kruskal–Wallis tests, depending on the normality of the distribution (tested with the Shapiro–Wilk test), using PRISM v.5.0 software (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). We directly counted HLA-DQ2.5/DQ8 carrier frequencies in the Mennonite population and compared them with carrier frequencies calculated from the data available in the Allele Frequency Net Database (www.allelefrequencies.net, accessed on 20 August 2021) [29]. Belgians and Euro-Brazilians were the two most comparable populations with sufficient HLA haplotype and allele data to enable these comparisons (Supplementary Table S4).

In the association analysis, independence tests were performed between the variables using Fisher's two-tailed or chi-square tests. All associations were corrected for possible confounding factors using logistic regression. When appropriate, the odds ratio was calculated with a 95% confidence interval. Two-tailed p values lower than 0.05 and significant after the Benjamini–Hochberg correction for multiple comparisons were considered significant. The associations found with univariate and multivariate binary logistic regression were obtained using VassarStats (VassarStats: Website for Statistical Computation; available at <http://vassarstats.net>, accessed on 1 March 2020) and STATA v.9.2 (StataCorp LP, College Station, TX, USA).

For the metabolomic analyses, principal component analysis (PCA), hierarchical cluster analysis (HCA), heat maps, and the metabolic pathway were evaluated using the MetaboAnalyst[®] platform (<https://www.metaboanalyst.ca/>, accessed on 29 November 2022). Data filtering was performed by interquartile range (IQR), log transformed and normalized by auto scaling for the multivariate analysis. For t -test analysis, a p value < 0.05 was used. The p values and the t -score were used to obtain the enriched pathways through the functional analysis of the MetaboAnalyst tool [28]. The *mummichog* and gene set enrichment analysis (GSEA) algorithms were further used for pathway analyses, with a p value cutoff of 0.2 (only the top 10% of peaks were used).

3. Results

More than a half (60.1%) of the participants were female. The median age was 49 (14–89.2) years and differed between the communities for female participants, who were older in CON ($p = 0.003$). BMI values were also much higher in this last settlement, for both females and males ($p < 1 \times 10^{-4}$ and $p < 4 \times 10^{-4}$, respectively) (Table 1).

Approximately 19% of individuals reported having at least one clinically diagnosed autoimmune disease (AD), reporting type 1 diabetes, rheumatoid arthritis, autoimmune thyroiditis, and/or celiac disease. Among CD-related symptoms and diseases, joint pain was more frequent in CON ($p = 1 \times 10^{-6}$) and clinically diagnosed lactose intolerance was more frequent in CTB ($p = 0.003$). Among 453 individuals who were confident to answer about CD familial history, 26 (5.74%) presented affected FDRs and 15 (3.34%), affected second-degree relatives (SDRs). There were more reports of FDRs affected with celiac disease in CWI ($p = 0.015$) (Table 1).

Table 1. Distribution of demographic characteristics, symptoms, diagnoses, and HLA subtypes in the Mennonite population samples.

	CON	CWI	CTB	p Value	Total	CD Patients	Non-CD Patients	p Value
N	N = 200	N = 210	N = 194		N = 604	N = 21	N = 583	
Gender (F/M)	120/80	136/74	107/87	0.143	363/241	16/05	347/236	0.173
	Median (min-max)	Median (min-max)	Median (min-max)		Median (min-max)	Median (min-max)	Median (min-max)	
Age-female (years)	57.0 (14.0–83.0)	46.0 (14.4–89.0)	44.2 (14.0–89.2)	0.003	49.0 (14.0–89.2)	32.0 (17.1–69.0)	50.0 (14.0–89.2)	0.015
Age-male (years)	54.0 (17.0–82.0)	53.7 (12.0–92.1)	49.5 (15.9–88.0)	q = 0.026	51.0 (12.0–92.1)	64.6 (54.9–75.0)	51.0 (12.0–92.1)	q = 0.039
BMI-female	27.6 (15.8–45.8)	24.6 (16.2–35.2)	23.6 (15.1–40.6)	0.241	25.2 (15.1–45.8)	22.4 (19.6–45.8)	25.5 (15.1–44.5)	0.095
				1×10^{-4}				0.235
BMI-male	28.4 (19.2–42.9)	26.2 (16.1–47.6)	26.3 (16.6–38.7)	q = 0.013	27.1 (16.1–47.6)	27.4 (26.0–28.9)	26.9 (16.1–47.6)	0.724
	% (n/total N)	% (n/total N)	% (n/total N)	4×10^{-4}	% (n/total N)	% (n/total N)	% (n/total N)	
Symptoms/diagnoses				q = 0.015				
Chronic diarrhea	2.11 (4/190)	7.14 (13/182)	5.70 (9/158)	0.068	4.90 (26/530)	19.05 (4/21)	4.32 (22/509)	0.015
Weight loss	3.68 (7/190)	7.94 (10/126)	5.06 (8/158)	0.251	5.27 (25/474)	15.00 (3/20)	4.85 (22/454)	q = 0.010
Iron-deficiency anemia	7.37 (14/190)	10.94 (14/128)	8.23 (13/158)	0.527	8.61 (41/476)	38.09 (8/21)	7.25 (33/455)	0.081
Bloating	31.58 (60/190)	28.96 (53/183)	27.21 (43/158)	0.663	29.37 (156/531)	38.09 (8/21)	29.02 (148/510)	1×10^{-4}
Constipation	12.63 (24/190)	19.04 (24/126)	20.88 (33/158)	0.099	17.09 (81/474)	10.00 (2/20)	17.40 (79/454)	q = 0.018
Chronic abdominal pain	16.32 (31/190)	16.48 (30/182)	15.28 (24/157)	0.951	16.07 (85/529)	42.85 (9/21)	14.96 (76/508)	0.549
Joint pain	26.84 (51/190)	9.52 (12/126)	8.33 (13/156)	1×10^{-6}	16.10 (76/472)	5.00 (1/20)	16.59 (75/452)	0.002
Diabetes mellitus type 1	1.06 (2/188)	0.79 (1/126)	2.46 (3/122)	q = 0.002	1.38 (6/436)	0 (0/19)	1.44 (6/417)	q = 0.021
Irritable bowel syndrome	5.82 (11/189)	5.00 (6/120)	4.04 (4/99)	n.c.	4.90 (20/408)	6.25 (1/16)	5.10 (20/392)	0.223
Lactose intolerance	1.62 (3/185)	3.35 (6/179)	9.59 (14/146)	0.887	4.51 (23/510)	4.76 (1/21)	4.50 (22/489)	nc
Autoimmune thyroiditis	10.47 (20/191)	11.29 (14/124)	14.74 (23/156)	0.003	12.10 (57/471)	15.00 (3/20)	12.36 (56/453)	1
Rheumatoid arthritis	11.30 (20/177)	4.00 (5/125)	5.52 (9/163)	q = 0.028	7.31 (34/465)	0 (0/19)	7.62 (34/446)	1
Celiac disease	3.00 (6/200)	2.86 (6/210)	4.64 (9/194)	0.454	3.48 (21/604)	-	-	0.727
Any autoimmune disease *	20.90 (37/177)	15.08 (19/126)	20.24 (33/163)	0.031	19.10 (89/466)	15.79 (3/19) *	19.24 (86/447) *	nc
Familial aggregation				q = 0.047				1
				0.560				
				0.400				

Table 1. Cont.

	CON	CWI	CTB	<i>p</i> Value	Total	CD Patients	Non-CD Patients	<i>p</i> Value
FDR with CD	3.21 (6/187)	11.21 (12/107)	5.03 (8/159)	0.015 <i>q</i> = 0.044	5.74 (26/453)	31.58 (6/19)	4.61 (20/434)	3×10^{-4} <i>q</i> = 0.015
SDR with CD	1.60 (3/187)	4.81 (5/104)	4.43 (7/158)	0.221	3.34 (15/449)	21.05 (4/19)	2.56 (11/430)	0.002 <i>q</i> = 0.023
Any relative with CD	5.88 (11/187)	14.95 (16/107)	6.29 (10/159)	0.013 <i>q</i> = 0.036	8.17 (37/453)	36.84 (7/19)	4.61 (20/434)	3×10^{-5} <i>q</i> = 0.010
HLA	N = 115	N = 155	N = 121		N = 391	N = 13	N = 378	
DQ2.5 (+)	33.91 (39)	29.03 (45)	26.45 (32)	0.559	29.67 (116)	92.31 (12)	27.51 (104)	3×10^{-6} <i>q</i> = 0.007
Only DQ2.5 (+)	33.04 (38)	23.23 (36)	23.97 (29)	0.159	26.09 (102)	92.31 (12)	24.07 (90)	1×10^{-6} <i>q</i> = 0.005
DQ8 (+)	16.52 (19)	32.90 (51)	22.31 (27)	0.007 <i>q</i> = 0.034	24.81 (97)	0	25.66 (97)	0.044 <i>q</i> = 0.05
Only DQ8 (+)	15.65 (18)	27.10 (42)	19.83 (24)	0.072	21.48 (84)	0	22.22 (84)	0.080
DQ2.5 (+) and/or DQ8 (+)	49.57 (57)	56.13 (87)	46.28 (56)	0.248	51.15 (200)	92.31 (12)	49.74 (188)	0.003 <i>q</i> = 0.031

p values were calculated through the chi-square test for most variables, except for BMI and age distributions (non-parametric Mann–Whitney or Kruskal–Wallis tests), gender, type 1 diabetes mellitus, and first- and second-degree relatives (Fisher exact t-test). *q* = correction with the Benjamini–Hochberg method for multiple comparisons. * autoimmune disease (AD); type 1 diabetes, arthritis, and/or autoimmune thyroiditis, excluding CD for the analysis in this group. Age is in years. BMI = body mass index, CD = celiac disease, CON = Nova Colony, CWI = Witmarsum Colony, CTB = Curitiba, F = female, FDR = first-degree relative, M = male, *p* = *p* value, SDR = second-degree relative, *n* = number of individuals with the evaluated characteristic, *N* = total number of individuals.

The prevalence of CD did not differ among the investigated settlements. Eleven individuals were aware of their CD diagnosis, eight through both positive serology and biopsy exams. Ten individuals were IgA-EmA positive and newly diagnosed in our study (among those tested and found positive with other methods; there were no false positives; all were confirmed by positive IgA-EMA results). Two of them were identified as celiac in the pilot study. They were still not compliant with treatment and remained positive after a time span of almost five years. After a renewed contact during the second phase of our study, one of them adhered to a GFD and turned negative for anti-tTG (personal communication). It was not possible to evaluate the extent of intestinal epithelial injury through biopsies in these newly diagnosed Mennonite patients since most resisted to go through this invasive process. Nevertheless, given the high sensitivity and specificity of the employed serological exams, all ten individuals were considered CD patients in downstream statistical analyses. This represents 10/21 or 47.6% of undiagnosed CD cases (taking into account the whole sample, it would be 1.66%). The estimated CD seroprevalence was of 21/604 or 3.48% (95% CI = 2.16–5.27%), approximately 1:29. The prevalence of biopsy-confirmed CD was of 8/604 or 1.32% (95% CI = 0.57–2.59%), cc. 1:75.

Likely due to the high rate of undiagnosed CD patients, there was no difference between gluten consumption in the CD and non-CD groups. The median age of Mennonite CD patients was of 32 (17–69) and 64 (54–75) years for women ($n = 16$) and men ($n = 5$), respectively. Compared with non-CD female participants, female CD patients were younger ($p = 0.015$). The frequency of reported relatives diagnosed with CD differed between individuals with and without CD ($p = 3 \times 10^{-5}$). As expected, CD development was strongly associated with the presence of affected relatives (OR = 9.55 [95% CI = 3.28–27.75], $p < 10^{-3}$). This was also evident in our study, since all six affected FDRs belonged to the group of patients who were already aware of their condition (biopsy proven). Even after the exclusion of four affected FDRs (two from one family and two from another, without excluding first-degree relatives from the non-affected group), prevalence remained high: 17/604 (2.81% or 1:36 [95% CI = 1.65–4.47%]). The distribution of non-CD ADs did not differ between the groups with and without CD (Table 1). As expected, chronic diarrhea, iron-deficiency anemia, and chronic abdominal pain were more common among CD patients, increasing between 4–7 times the odds for a CD diagnosis (Table 2).

Table 2. Common symptoms associated with CD. CD = celiac disease, Non-CD = non-celiac disease, n = number of individuals with the evaluated characteristic, N = total number of individuals, CI = 95% confidence interval, OR = odds ratio, p value = probability of significance. All associations were corrected for possible confounding factors (gender and age) using logistic regression.

Symptoms	CD% (n/N)	Non-CD% (n/N)	OR	95% CI	p Value
Chronic diarrhea	19.05 (4/21)	4.32 (22/509)	5.20	1.61–16.78	0.006
Iron-deficiency anemia	38.09 (8/21)	7.25 (33/455)	7.86	3.04–20.33	$<10^{-3}$
Chronic abdominal pain	42.85 (9/21)	14.96 (76/508)	4.26	1.73–10.46	0.002

Up to 391 individuals were screened for the main CD-predisposing HLA variants (Table 1). The frequency of HLA-DQ2.5- and/or HLA-DQ8-positive individuals was 49.7%, being 26% only HLA-DQ2.5-positive and 21.5% only HLA-DQ8-positive. Their distribution did not differ between the three investigated communities (Figure 1).

Based on data of the Allele Frequency Net Database (<http://www.allelefrequencies.net/>, accessed on 20 August 2021), we compared the frequencies of HLA-DQ2.5 and HLA-DQ8 carriers in the Mennonite population with those in the Belgian (715 individuals) and Euro-Brazilian (641 individuals) populations, considering both cis and trans allelic combinations (*DQA1*05* and *DQB1*02* for HLA-DQ2.5 and *DQA1*03* and *DQB1*03:02* for HLA-DQ8). The frequency of HLA-DQ2.5 carriers among the investigated Mennonites (29.67%) is almost identical to the one reported for Belgians (28.72%) but different from the one reported in Euro-Brazilians (17.49%, Fisher $p = 7 \times 10^{-6}$). Among 13 investigated

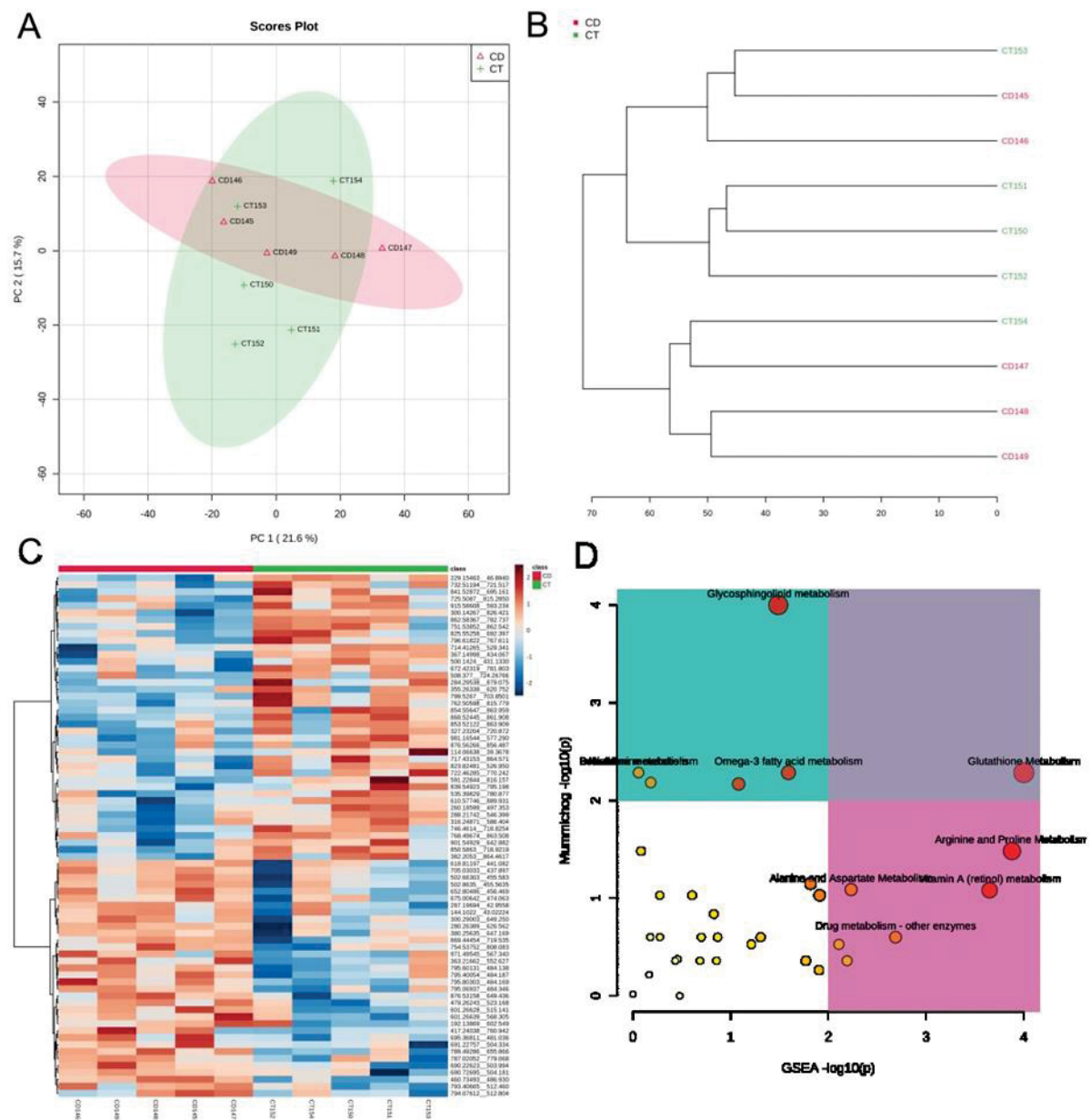


Figure 2. Exploratory metabolomics in the sera of CD Mennonites without a GFD. (A) Principal component analysis of serum metabolites identified in celiac patients (CD) and controls (CT). DC146 and DC145 had a 1:5 EMA positivity and clustered together with CT153, who is unaffected but has close relatives with rheumatoid arthritis. CT154 did not group with the others using this approach. Despite being serologically negative, this individual has close relatives with CD. (B) Hierarchical clustering of metabolic CD and CT profiles. Here, DC146, DC145, and CT153 also grouped together, and CT154 grouped with CD patients presenting high IgA-EMA positivity (1:80). (C) Heat map analysis of hierarchical clustering of CD and CT individuals. In blue: decreased metabolite levels; in red: increased metabolite levels. (D) Scatter plots of pathway enrichment analysis provided by *mummichog* and its integration with GSEA. The color and size of each circle correspond to its *p* value and enrichment factor, respectively. Darker tones indicate more statistically relevant predicted pathways. The size of each dot represents the ratio between significant pathway hits and the expected number of compound hits within the pathways. The glutathione pathway (upper square, right) was the only pathway found to be significant using both algorithms.

4. Discussion

Due to a peculiar demographic history, the genomic architecture of the Mennonite population has suffered the effects of genetic drift, which has altered the frequency of rare Mendelian, as well as chronic diseases [15,19]. Indeed, cc. 18% of the participating individuals in our study reported diagnosis of at least one AD, such as type 1 diabetes, rheumatoid arthritis, autoimmune thyroiditis, and/or celiac disease. This prevalence (17.9%) is in clear contrast with the worldwide AD prevalence of less than 5% [30]. Furthermore, the share of predisposing genetic variants within families is probably much higher than in the general population, increasing the prevalence of these diseases. More importantly, the numbers of reported FDRs and SDRs affected by CD allowed us to get an impression about previous knowledge of the disease in these rather closed communities (of 604 participants, 453 had previous knowledge about the disease in their families, e.g., 75%).

The CD seroprevalence among Southern Brazilian Mennonites was impressively high: 3.47% (approximately 1:29). Among all the populations analyzed, only the isolated Saharawi people of Western Sahara have a higher CD prevalence (5.6%) [12]. It is much higher than the 1.22% seroprevalence reported in the Dutch population [31], which is thought to be one of the main contributors to the current genetic pool of the Mennonites, together with Germans (1.57% seroprevalence) and Belgians (0.86%) [32,33]. Even if taking into account only biopsy-confirmed CD, the 1.32% frequency in Mennonites contrasts with the global prevalence of the disease, which ranges from 0.5% (1:200) to 1.0% (1:100) [34]. More specifically, CD seroprevalence was of 1.4%, and biopsy-based CD diagnosis was of 0.7% in a recent meta-analysis, ranging from 0.4% in South America to 0.8% in Europe and Oceania [13] and reaching 0.24% (1:417) in Curitiba [14] and 0.35% (1:286) in São Paulo [35], two Brazilian cities, and 0.37% in Germany [36]. The Mennonite CD prevalence is actually close to that in Finland (2.13%), which is also genetically isolated [37]. It should be noted that biopsy-proven CD prevalence among Mennonites was calculated based on those eight individuals that were willing to take the biopsy. Thus, it may actually be higher.

Ten individuals were identified as celiac by our serological screening, representing 47.6% of undiagnosed cases (almost 1:2). Worldwide, the proportion of diagnosed and undiagnosed cases varies from one country to another, spanning from 1:2 in Finland [38] to 1:20 in Argentina [39]. The failure to detect the disease, coupled with failure to treat it, may lead to severe comorbidities such as osteoporosis, sterility, neurological and psychiatric disorders, small bowel adenocarcinoma, lymphoma, and carcinoma of the esophagus, as well as increased morbidity [4,7–10]. Two individuals previously identified as celiac in the pilot study remained positive in the second serological screening, indicating non-compliance with the gluten-free diet. The reason for non-compliance may be related to sociocultural aspects of the Mennonite community, whose eating habits rely heavily on wheat consumption.

Through our questionnaire, we identified predisposed individuals who may benefit from early intervention, such as those with iron-deficiency anemia, weight loss, and chronic abdominal pain [40]. Approximately 9% of individuals reported a family history of CD, 5.79% for FDRs and 3.25% for SDRs. This agrees with the literature: prevalence of CD in FDRs of celiac patients increases between 2–21% depending on gender and *HLA-DQ* genotype and the association with other ADs is frequent in both patients and relatives [41–44]. Through a meta-analysis, others estimated a CD prevalence of 7.6% among FDRs and 2.3% among SDRs [45].

Worldwide, *HLA* typing has a high negative predictive value for the diagnosis of CD, since at least one of the susceptibility variants, either *HLA-DQ2.5* or *HLA-DQ8*, occurs in 86–93% of patients with CD [2,46]. Interestingly, the frequency of *HLA-DQ8* in Mennonites differed from the one reported for the Belgian population—which significantly contributed to the current Mennonite gene variant pool. This is most probably the result of a founder effect. Moreover, more than half of *HLA-DQ2.5/DQ8* Mennonite carriers do not have CD (50.3%, compared with 40% among Europeans without CD) [3,43]. These individuals may also bear protective genetic/epigenetic/microbiota variants that are yet to be discovered.

Furthermore, HLA-DQ2.5 and HLA-DQ8 frequencies were significantly higher in Mennonites than in Euro-Brazilians. This is a result of prime epidemiological relevance for the design of public health policies, indicating a higher general susceptibility to the disease than most Brazilians with European ancestry.

The HLA-DQ2.5 carrier frequency among Mennonite patients (92.31%) was higher than that reported in 102 Turkish pediatric patients (76%) [47]. As in our study, none of the Turkish patients were HLA-DQ8 positive. One of our CD patients was neither HLA-DQ2.5 nor HLA-DQ8 positive, indicating the influence of yet unknown predisposing genetic variants in HLA-DQ2.5/DQ8-negative CD Mennonite patients. The absence of HLA-DQ2 or HLA-DQ8 was also formerly observed by others in Brazilian patients [48]. In fact, several non-*HLA* genes, whose products influence the integrity of the intestinal barrier and the quality of the immune response, modulate the susceptibility to the disease [34]. About 15% of the genetic susceptibility to CD is explained by 57 single nucleotide polymorphisms located in 39 non-*HLA* loci, identified through genome-wide association studies [49,50]. Furthermore, HLA-DQ2.5/DQ8 contribution to CD in monozygotic twins only ranges from 25 to 40%. Thus, it is important to not exclude strongly suspicious cases from diagnostic workup based solely on HLA-DQ2.5/DQ8 negativity.

Interestingly, low IgA-EMA-positive individuals presented a metabolic profile similar to controls with close relatives with either CD or rheumatoid arthritis, diseases that share pathological pathways [51]. In all patients, the glutathione pathway was consistently altered using both algorithms (*mummichog* and GSEA) in the pilot metabolomic investigation. This pathway acts in the antioxidant defense and turns endogenous and exogenous compounds more soluble and non-toxic [52,53]. Indeed, glutathione was reduced in CD patients compared with controls. The levels of cysteine, the main amino acid in the synthesis of glutathione, were also reduced in children with CD before a GFD [54–56]. Furthermore, a high concentration of reactive oxygen species is associated with bowel damage (Marsh score). This corroborates the relationship between celiac disease and the glutathione pathway, one of the main processes to inhibit the damage caused by ROS [57].

Our study has limitations. First, we could not confirm the positive serological IgA-EMA results with positive biopsies. However, given the high specificity of IgA-EMA testing, false positives are rather unexpected. Second, IgA-deficient individuals may appear negative in our serological screening. Despite being uncommon, they may occur more often among CD patients. Missed CD individuals, in this case, would have increased the prevalence values that were already very high. Third, we did not genotype individuals for HLA-DQ2.2, which also contributes to CD susceptibility. In a next phase of our genetic–epidemiological investigation, we will screen for other HLA alleles and also for IgA deficiency in the Mennonite population as recommended [22].

Finally, our results indicate that roughly one in thirty Mennonites are expected to present with CD. Of those affected, half are unaware of the disease. Most are HLA-DQ2.5-positive, but a role for HLA-DQ8, whose frequency is cc. 1.8 times higher than in original contributing populations, cannot be excluded because the CD patient sample is small. Both the HLA-DQ2.5 and HLA-DQ8 carrier frequencies are cc. 1.6 times higher in Mennonites than in Euro-Brazilians, highlighting the epidemiological relevance of this work for public health policies. The glutathione pathway seems more affected in Mennonites with CD before compliance to a GFD. Further identification of other associated genetic, epigenetic, and environmental factors shall help define the CD risk of this population and lay the foundations of future strategies of preventive medicine.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at <https://www.mdpi.com/article/10.3390/genes14051026/s1>, Table S1: Serological screening in the Mennonite population. Table S2: PCR reagents for the identification of CD-associated HLA-DQ allele carriers; Table S3: PCR conditions for the identification of CD-associated HLA-DQ allele carriers; Table S4: HLA-DQ2 and HLA-DQ8 carrier frequencies estimated for Brazilians and Belgians compared with the Mennonite population.

Author Contributions: Conceptualization, A.B.W.B. and L.C.O.; Formal analysis, L.C.O., E.R.D.B. and A.B.W.B.; Funding acquisition, F.R.C., M.L.P.-E. and A.B.W.B.; Investigation, L.C.O., E.R.D.B. and S.E.B.; Methodology, L.C.O., A.C.D., R.M.N., E.R.D.B., P.I.d.S., G.A.C. and S.E.B.; Project administration, A.B.W.B.; Resources, I.J.d.M.-R. and M.L.P.-E.; Supervision, G.A.C. and A.B.W.B.; Visualization, L.C.O. and A.C.D.; Writing—original draft, L.C.O.; Writing—review and editing, L.C.O., R.M.N., G.A.C., F.R.C., M.L.P.-E. and A.B.W.B. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was supported by grants of the following funding agencies: Fundação Araucária (PRONEX/FA—Convênio 116/2018, Protocolo 50530); Programa Pesquisa para o Sistema Único de Saúde: Gestão Compartilhada em Saúde—PPSUS Edição 2015; and Projeto 48.025—Chamada de Projetos 01/2016 (Fundação Araucária-PR/SESA-PR/CNPq/MS-Decit). L.C.O. received a scholarship from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES); G.A.C. received a postdoctoral scholarship (CAPES protocol 88882.306040/2018-01); M.L.P.-E. and A.B.W.B. received CNPq research scholarships (protocols 303538/2015-5 and 308783/2019-0 for M.L.P.-E.; 314288/2018-0 and 313741/2021 for A.B.W.B.).

Institutional Review Board Statement: The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki and approved by The Ethics Committee of the Health Sciences Sector of the Federal University of Paraná (CEP SCS-UFPR) with the following Certificate of Presentation of Ethical Appreciation: 55297916.6.0000.0102, protocol numbers: 1.545.447 on 16 May 2016, updated in 2.204.113 on 7 August 2017 and again in 5.215.924 on 28 January 2022.

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

Data Availability Statement: The data presented in this study are available on request from the corresponding author. The data are not publicly available due to privacy restrictions given by the General Law of Data Protection (LGPD) in Brazil.

Acknowledgments: We thank the participants for volunteering for this study, the staff of the ACEL-PAR (Associação dos Celíacos do Brasil—Paraná), and the Residents' Association of Witmarsum for their support. Deep thanks also to Heidi Martens Wall and Ana Sawatsky Epp and to the staff of the Laboratório de Genética Molecular Humana/UFPR, especially to Hellen Caroline Issler, Leonardo Maldaner Amorim, Wilian Aparecido Vieira Junior, Verónica Calonga Solís, Gabriela Canalli Kretzschmar, and Igor Kalil Meireles for technical assistance and helpful discussions. We extend our thanks to Maique Weber Biavatti, Layzon Antonio da Silva, and Luiz Pollo from Universidade Federal de Santa Catarina for technical support in UPLC-HRMS.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

Appendix A

In brief, the blood from individuals with CD but without a GFD and individuals without CD (controls—CT) were collected in tubes without anticoagulant and kept at room temperature for 60 min for serum separation. The tubes were centrifuged at 1500 rpm for 10 min and the supernatants (serum) were aliquoted in 250 µL and stored in 2 mL microtubes, being kept at -80°C until the preparation of samples. Aliquots of serum (250 µL) were thawed on ice, and methanol (750 µL) was added at -20°C for protein depletion. The samples were mixed in a vortex agitator and kept at -20°C for 20 min for residual protein depletion. After this, the samples were mixed again in a vortex agitator and centrifuged at 14,000 rpm for 10 min at 4°C . The supernatant (900 µL) was taken and dried in the vacuum concentrator at 40°C . After this, the dried samples were stored at -20°C until metabolomic analysis. The dried samples were reconstituted with 250 µL of acetonitrile/water (1:1, *v/v*) and centrifuged for 5 min at 14,000 rpm at 4°C . Then, 100 µL of supernatant was transferred into a glass autosampler vial to ultra-high performance liquid chromatography–high-resolution mass spectrometry (UPLC-HRMS) analysis.

References

- Ludvigsson, J.F.; Leffler, D.A.; Bai, J.C.; Biagi, F.; Fasano, A.; Green, P.H.R.; Hadjivassiliou, M.; Kaukinen, K.; Kelly, C.P.; Leonard, J.N.; et al. The Oslo definitions for coeliac disease and related terms. *Gut* **2013**, *62*, 43–52. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Bourgey, M.; Calcagno, G.; Tinto, N.; Gennarelli, D.; Margaritte-Jeannin, P.; Greco, L.; Limongelli, M.G.; Esposito, O.; Marano, C.; Troncone, R.; et al. HLA related genetic risk for coeliac disease. *Gut* **2007**, *56*, 1054–1059. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Liu, E.; Rewers, M.; Eisenbarth, G.S. Genetic testing: Who should do the testing and what is the role of genetic testing in the setting of celiac disease? *Gastroenterology* **2005**, *128*, S33–S37. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Kotze, L.M.S. Celiac disease in Brazilian patients: Associations, complications and causes of death. Forty years of clinical experience. *Arq. Gastroenterol.* **2009**, *46*, 261–269. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Fasano, A.; Catassi, C. Current approaches to diagnosis and treatment of celiac disease: An evolving spectrum. *Gastroenterology* **2001**, *120*, 636–651. [\[CrossRef\]](#)
- Utiyama, S.R.R.; Nass, F.R.; Kotze, L.M.S.; Nisihara, R.M.; Ambrosio, A.R.; de Messias-Reason, I.T. Triagem sorológica de familiares de pacientes com doença celíaca: Anticorpos anti-endomísio, antitransglutaminase ou ambos? *Arq. Gastroenterol.* **2007**, *44*, 156–161. [\[CrossRef\]](#)
- Green, P.H.R.; Lebowitz, B.; Greywoode, R. Celiac disease. *J. Allergy Clin. Immunol.* **2015**, *135*, 1099–1106. [\[CrossRef\]](#)
- Romano, L.; Pellegrino, R.; Sciorio, C.; Barone, B.; Gravina, A.G.; Santonastaso, A.; Mucherino, C.; Astretto, S.; Napolitano, L.; Aveta, A.; et al. Erectile and sexual dysfunction in male and female patients with celiac disease: A cross-sectional observational study. *Andrology* **2022**, *10*, 910–918. [\[CrossRef\]](#)
- Aaron, L.; Torsten, M.; Patricia, W. Autoimmunity in celiac disease: Extra-intestinal manifestations. *Autoimmun. Rev.* **2019**, *18*, 241–246. [\[CrossRef\]](#)
- Rodrigo, L.; Beteta-Gorriti, V.; Alvarez, N.; Gómez de Castro, C.; De Dios, A.; Palacios, L.; Santos-Juanes, J. Cutaneous and Mucosal Manifestations Associated with Celiac Disease. *Nutrients* **2018**, *10*, 800. [\[CrossRef\]](#)
- Lindfors, K.; Ciacci, C.; Kurppa, K.; Lundin, K.E.; Makharia, G.K.; Mearin, M.L.; Murray, J.A.; Verdu, E.F.; Kaukinen, K. Coeliac disease. *Nat. Rev. Dis. Prim.* **2019**, *5*, 3. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Catassi, C.; Ratsch, I.M.; Gandolfi, L.; Pratesi, R.; Fabiani, E.; El Asmar, R.; Frijia, M.; Bearzi, I.; Vizzoni, L. Why is coeliac disease endemic in the people of the Sahara? *Lancet* **1999**, *354*, 647–648. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Singh, P.; Arora, A.; Strand, T.A.; Leffler, D.A.; Catassi, C.; Green, P.H.; Kelly, C.P.; Ahuja, V.; Makharia, G.K. Global Prevalence of Celiac Disease: Systematic Review and Meta-analysis. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* **2018**, *16*, 823–836. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Pereira, M.A.G. Prevalence of celiac disease in an urban area of Brazil with predominantly European ancestry. *WJG* **2006**, *12*, 6546. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Lopes, F.L.; Hou, L.; Boldt, A.B.W.; Kassem, L.; Alves, V.M.; Nardi, A.E.; McMahon, F.J. Finding Rare, Disease-Associated Variants in Isolated Groups: Potential Advantages of Mennonite Populations. *Hum. Biol.* **2016**, *88*, 109–120. [\[CrossRef\]](#)
- Hou, L.; Kember, R.L.; Roach, J.C.; O'Connell, J.R.; Craig, D.W.; Bucan, M.; Scott, W.K.; Pericak-Vance, M.; Haines, J.L.; Crawford, M.H.; et al. A population-specific reference panel empowers genetic studies of Anabaptist populations. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 6079. [\[CrossRef\]](#)
- Pardo-Seco, J.; Llull, C.; Berardi, G.; Gómez, A.; Andreatta, F.; Martínón-Torres, F.; Toscanini, U.; Salas, A. Genomic continuity of Argentinean Mennonites. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 36392. [\[CrossRef\]](#)
- Toscanini, U.; Brisighelli, F.; Llull, C.; Berardi, G.; Gómez, A.; Andreatta, F.; Pardo-Seco, J.; Gómez-Carballa, A.; Martínón-Torres, F.; Álvarez-Iglesias, V.; et al. Charting the Y-chromosome ancestry of present-day Argentinean Mennonites. *J. Hum. Genet.* **2016**, *61*, 507–513. [\[CrossRef\]](#)
- Jaworski, M.A.; Slater, J.D.; Severini, A.; Hennig, K.R.; Mansour, G.; Mehta, J.G.; Jeske, R.; Schlaut, J.; Pak, C.Y.; Yoon, J.W. Unusual clustering of diseases in a Canadian Old Colony (Chortitza) Mennonite kindred and community. *CMAJ* **1988**, *138*, 1017–1025.
- Boschmann, S.E.; Boldt, A.B.; de Souza, I.R.; Petzl-Erler, M.L.; Messias-Reason, I.J. The Frequency of the LCT*-13910C>T Polymorphism Associated with Lactase Persistence Diverges among Euro-Descendant Groups from Brazil. *Med. Princ. Pract.* **2016**, *25*, 18–20. [\[CrossRef\]](#)
- Tursi, A.; Elisei, W.; Giorgetti, G.M.; Gaspardone, A.; Lecca, P.G.; Di Cesare, L.; Brandimarte, G. Prevalence of celiac disease and symptoms in relatives of patients with celiac disease. *Eur. Rev. Med. Pharm. Sci.* **2010**, *14*, 567–572.
- Al-Toma, A.; Volta, U.; Auricchio, R.; Castillejo, G.; Sanders, D.S.; Cellier, C.; Mulder, C.J.; Lundin, K.E.A. European Society for the Study of Coeliac Disease (ESsCD) guideline for coeliac disease and other gluten-related disorders. *United Eur. Gastroenterol. J.* **2019**, *7*, 583–613. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Volta, U.; Molinaro, N.; De Franceschi, L.; Fratangelo, D.; Bianchi, F.B. IgA anti-endomysial antibodies on human umbilical cord tissue for celiac disease screening. *Dig. Dis. Sci.* **1995**, *40*, 1902–1905. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Marsh, M.N. Gluten, major histocompatibility complex, and the small intestine. *Gastroenterology* **1992**, *102*, 330–354. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Olerup, O.; Aldener, A.; Fogdell, A. HLA-DQB1 and -DQA1 typing by PCR amplification with sequence-specific primers (PCR-SSP) in 2 hours. *Tissue Antigens* **1993**, *41*, 119–134. [\[CrossRef\]](#)
- Profaizer, T.; Eckels, D.; Delgado, J.C. Celiac disease and HLA typing using real-time PCR with melting curve analysis. *Tissue Antigens* **2011**, *78*, 31–37. [\[CrossRef\]](#)

27. Vorkas, P.A.; Isaac, G.; Anwar, M.A.; Davies, A.H.; Want, E.J.; Nicholson, J.K.; Holmes, E. Untargeted UPLC-MS Profiling Pipeline to Expand Tissue Metabolome Coverage: Application to Cardiovascular Disease. *Anal. Chem.* **2015**, *87*, 4184–4193. [\[CrossRef\]](#)
28. Pang, Z.; Zhou, G.; Ewald, J.; Chang, L.; Hacariz, O.; Basu, N.; Xia, J. Using MetaboAnalyst 5.0 for LC–HRMS spectra processing, multi-omics integration and covariate adjustment of global metabolomics data. *Nat. Protoc.* **2022**, *17*, 1735–1761. [\[CrossRef\]](#)
29. González-Galarza, F.F.; Takeshita, L.Y.; Santos, E.J.; Kempson, F.; Maia, M.H.T.; Da Silva, A.L.S.; Silva, A.L.T.E.; Ghattaoraya, G.; Alfievic, A.; Jones, A.; et al. Allele frequency net 2015 update: New features for HLA epitopes, KIR and disease and HLA adverse drug reaction associations. *Nucleic Acids Res.* **2015**, *43*, D784–D788. [\[CrossRef\]](#)
30. Fairweather, D.; Frisancho-Kiss, S.; Rose, N.R. Sex Differences in Autoimmune Disease from a Pathological Perspective. *Am. J. Pathol.* **2008**, *173*, 600–609. [\[CrossRef\]](#)
31. Csizmadia, C.G.; Mearin, M.L.; von Blomberg, B.M.; Brand, R.; Verloove-Vanhorick, S.P. An iceberg of childhood coeliac disease in the Netherlands. *Lancet* **1999**, *353*, 813–814. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
32. Vijgen, S.; Alliet, P.; Gillis, P.; Declercq, P.; Mewis, A. Seroprevalence of celiac disease in Belgian children and adolescents. *Acta Gastroenterol. Belg.* **2012**, *75*, 325–330. [\[PubMed\]](#)
33. Händel, N.; Mothes, T.; Petroff, D.; Baber, R.; Jurkutat, A.; Flemming, G.; Kiess, W.; Hiemisch, A.; Körner, A.; Schlumberger, W.; et al. Will the Real Coeliac Disease Please Stand Up? Coeliac Disease Prevalence in the German LIFE Child Study. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* **2018**, *67*, 494–500. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
34. Gujral, N. Celiac disease: Prevalence, diagnosis, pathogenesis and treatment. *World J. Gastroenterol. WJG* **2012**, *18*, 6036. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
35. Alencar, M.L.; Ortiz-Agostinho, C.L.; Damião, A.O.; Abrantes-Lemos, C.P.; Leite, A.Z.; Brito, T.D.; Chamone, D.D.; Silva, M.E.; Giannella-Neto, D.; Sipahi, A.M. Prevalence of celiac disease among blood donors in SÃO PAULO—The most populated city in Brazil. *Clinics* **2012**, *67*, 1013–1018. [\[CrossRef\]](#)
36. Kratzer, W. Prevalence of celiac disease in Germany: A prospective follow-up study. *World J. Gastroenterol. WJG* **2013**, *19*, 2612. [\[CrossRef\]](#)
37. Vilppula, A.; Collin, P.; Mäki, M.; Valve, R.; Luostarinen, M.; Krekelä, I.; Patrikainen, H.; Kaukinen, K. Undetected coeliac disease in the elderly. *Dig. Liver Dis.* **2008**, *40*, 809–813. [\[CrossRef\]](#)
38. Mäki, M.; Mustalahti, K.; Kokkonen, J.; Kulmala, P.; Haapalahti, M.; Karttunen, T.; Ilonen, J.; Laurila, K.; Dahlbom, I.; Hansson, T.; et al. Prevalence of Celiac Disease among Children in Finland. *N. Engl. J. Med.* **2003**, *348*, 2517–2524. [\[CrossRef\]](#)
39. Gomez, J.C.; Selvaggio, G.S.; Viola, M.; Pizarro, B.; Motta, G.; Barrio, S.; Castelletto, R.; Echeverria, R.; Sugai, E.; Vazquez, H.; et al. Prevalence of celiac disease in argentina: Screening of an adult population in the La Plata area. *Am. J. Gastroenterol.* **2001**, *96*, 2700–2704. [\[CrossRef\]](#)
40. Cárdenas-Roldán, J.; Rojas-Villarraga, A.; Anaya, J.M. How do autoimmune diseases cluster in families? A systematic review and meta-analysis. *BMC Med.* **2013**, *11*, 73. [\[CrossRef\]](#)
41. Parra-Medina, R.; Molano-Gonzalez, N.; Rojas-Villarraga, A.; Agmon-Levin, N.; Arango, M.-T.; Shoenfeld, Y.; Anaya, J.-M. Prevalence of Celiac Disease in Latin America: A Systematic Review and Meta-Regression. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0124040. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
42. Mearin, M.L. The prevention of coeliac disease. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* **2015**, *29*, 493–501. [\[CrossRef\]](#)
43. Högborg, L.; Fälth-Magnusson, K.; Grodzinsky, E.; Stenhammar, L. Familial Prevalence of Coeliac Disease: A Twenty-Year Follow-up Study. *Scand. J. Gastroenterol.* **2003**, *38*, 61–65. [\[CrossRef\]](#)
44. Ciclitira, P.J.; Johnson, M.W.; Dewar, D.H.; Ellis, H.J. The pathogenesis of coeliac disease. *Mol. Asp. Med.* **2005**, *26*, 421–458. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
45. Singh, P.; Arora, S.; Lal, S.; Strand, T.A.; Makharia, G.K. Risk of Celiac Disease in the First- and Second-Degree Relatives of Patients with Celiac Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Am. J. Gastroenterol.* **2015**, *110*, 1539–1548. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
46. Karel, K.; Louka, A.S.; Moodie, S.J.; Ascher, H.; Clot, F.; Greco, L.; Ciclitira, P.J.; Sollid, L.M.; Partanen, J. HLA types in celiac disease patients not carrying the DQA1*05-DQB1*02 (DQ2) heterodimer: Results from the European genetics cluster on celiac disease. *Hum. Immunol.* **2003**, *64*, 469–477. [\[CrossRef\]](#)
47. Basturk, A.; Artan, R.; Yilmaz, A. The incidence of HLA-DQ2/DQ8 in Turkish children with celiac disease and a comparison of the geographical distribution of HLA-DQ. *Gastroenterol. Rev.* **2017**, *4*, 256–261. [\[CrossRef\]](#)
48. Kotze, L.M.S.; Nisihara, R.; Utiyama, S.R.R.; Kotze, L.R. Absence of HLA-DQ2 and HLA-DQ8 does not exclude celiac disease in Brazilian patients. *Rev. Esp. Enferm. Dig.* **2014**, *106*, 561–562.
49. Ricaño-Ponce, I.; Wijmenga, C.; Gutierrez-Achury, J. Genetics of celiac disease. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* **2015**, *29*, 399–412. [\[CrossRef\]](#)
50. Trynka, G.; Hunt, K.A.; Bockett, N.A.; Romanos, J.; Mistry, V.; Szperl, A.; Bakker, S.F.; Bardella, M.T.; Bhaw-Rosun, L.; Castillejo, G.; et al. Dense genotyping identifies and localizes multiple common and rare variant association signals in celiac disease. *Nat. Genet.* **2011**, *43*, 1193–1201. [\[CrossRef\]](#)
51. Hua, L.; Xiang, S.; Xu, R.; Xu, X.; Liu, T.; Shi, Y.; Wu, L.; Wang, R.; Sun, Q. Causal association between rheumatoid arthritis and celiac disease: A bidirectional two-sample mendelian randomization study. *Front. Genet.* **2022**, *13*, 976579. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
52. Wang, C.; Cui, C.; Li, N.; Sun, X.; Wen, L.; Gao, E.; Wang, F. Antioxidant activity and protective effect of wheat germ peptides in an in vitro celiac disease model via Keap1/Nrf2 signaling pathway. *Food Res. Int.* **2022**, *161*, 111864. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

53. Wu, G.; Fang, Y.Z.; Yang, S.; Lupton, J.R.; Turner, N.D. Glutathione Metabolism and Its Implications for Health. *J. Nutr.* **2004**, *134*, 489–492. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Wahab, P.J.; Peters, W.H.M.; Roelofs, H.M.J.; Jansen, J.B.M.J. Glutathione S-Transferases in Small Intestinal Mucosa of Patients with Coeliac Disease. *Jpn. J. Cancer Res.* **2001**, *92*, 279–284. [[CrossRef](#)]
55. Coles, B.F.; Chen, G.; Kadlubar Fred, F.; Radominska-Pandya, A. Interindividual variation and organ-specific patterns of glutathione S-transferase alpha, mu, and pi expression in gastrointestinal tract mucosa of normal individuals. *Arch. Biochem. Biophys.* **2002**, *403*, 270–276. [[CrossRef](#)]
56. Sevinc, E.; Sevinc, N.; Akar, H.H.; Ozelcoskun, B.D.; Sezgin, G.C.; Arslan, D.; Kendirci, M. Plasma glutamine and cystine are decreased and negatively correlated with endomysial antibody in children with celiac disease. *Asia Pac. J. Clin. Nutr.* **2016**, *25*, 452–456.
57. Moretti, S.; Mrakic-Sposta, S.; Roncoroni, L.; Vezzoli, A.; Dellanoce, C.; Monguzzi, E.; Branchi, F.; Ferretti, F.; Lombardo, V.; Doneda, L.; et al. Oxidative stress as a biomarker for monitoring treated celiac disease. *Clin. Transl. Gastroenterol.* **2018**, *9*, e157. [[CrossRef](#)]

Disclaimer/Publisher’s Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.