

Zilma Pereira dos Anjos

POLIMORFISMOS GENÉTICOS NOS GENES DAS FICOLINAS -
1 E 2 EM CRIANÇAS E ADOLESCENTES COM DIABETES
MELLITUS TIPO 1

Recife

2014

Zilma Pereira dos Anjos

Polimorfismos genéticos nos genes das Ficolinas - 1 e 2 em crianças e
adolescentes com Diabetes *Mellitus* Tipo 1

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Patologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, para obtenção do título de Mestre em Patologia.

Orientador: Prof. Dr. Lucas André Cavalcanti Brandão

Co-orientadora: Dra. Nathália de Alencar Cunha Tavares

Recife

2014

Catálogo na Fonte
Bibliotecária: Gláucia Cândida, CRB4-1662

A599p Anjos, Zilma Pereira dos.
Polimorfismo genéticos nos genes das ficolinas-1 e 2 em crianças e adolescentes com Diabetes Mellitus tipo 1 / Zilma Pereira dos Anjos. – Recife: O autor, 2014.
71 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Lucas André Cavalcanti Brandão.
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS. Programa de Pós-Graduação em Patologia, 2014.
Inclui referências e apêndices.

1. Patologia. 2. Diabetes Mellitus Tipo1. 3. Autoimunidade. I. Brandão, Lucas André Cavalcanti. (Orientador). II. Título.

616.07

CDD (23.ed.)

UFPE (CCS2015-175)



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA

Centro de Ciências da Saúde - UFPE

Av. Prof. Moraes Rego 1235 - Cidade Universitária - CEP: 50670-901 - Recife - PE

Prédio da Pós-graduação do Centro de Ciências da Saúde (CCS) - térreo

Fone/Fax: (81) 2126.8529

<http://www.ppgpatologiaufpe.com>

DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM PATOLOGIA.

AUTORA: **ZILMA PEREIRA DOS ANJOS**

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: **PATOLOGIA**

NOME DA DISSERTAÇÃO: **“Polimorfismos Genéticos nos Genes das ficolinas-1 e 2 em Crianças e Adolescentes com *diabetes mellitus* tipo 1”.**

ORIENTADOR: **PROF. DR. LUCAS ANDRÉ CAVALCANTI BRANDÃO**

DATA DA DEFESA: **04 DE DEZEMBRO DE 2014.**

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Nicodemos Teles de Pontes Filho

Prof^ª. Dr^ª. Manuela Figueiroa Lira de Freitas

Prof^ª. Dr^ª. Paula Sandrin Garcia

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

R E I T O R

Prof. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

VICE- REITOR

Prof. Silvio Romero de Barros Marques

PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Francisco de Sousa Ramos

DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Prof. Nicodemos Teles de Pontes Filho

CHEFE DO DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA

Prof.^a Catarina de Oliveira Neves

COORDENADOR DO MESTRADO EM PATOLOGIA

Prof. Mário Ribeiro de Melo Júnior

VICE-COORDENADOR DO MESTRADO EM PATOLOGIA

Prof.^a Manuela Figueroa Lyra de Freitas

R E C I F E

2014

A meu pai, Arlindo Alves Pereira (*in memoriam*).

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ser o grande pai que caminha ao lado do filho nos desafios do dia a dia, mostrando que paciência e sabedoria são atributos que se conquistam com reflexão e discernimento de cada intercorrência da vida.

À minha amada mãe, por se fazer presente em cada etapa da minha vida, orientando e confiando nas minhas escolhas, amparando nos momentos difíceis e sempre me fazendo acreditar que sou capaz de fazer muito mais.

À minha família: Florisio Tabosa, Rita de Cássia, Anna Caroline e Rafaella Christine pela paciência e compreensão nos numerosos momentos de ausência.

A meu sobrinho (filho querido do coração) Bruno Pereira por todo carinho, paciência, amor e cuidado durante meus momentos de maior dificuldade.

Ao professor Lucas André Cavalcanti Brandão, quem me acolheu como sua orientanda e possibilitou que a minha experiência como aluna de mestrado fosse a mais proveitosa possível. Agradeço-lhe pelo inestimável apoio e pela dedicação do seu tempo determinante para o sucesso deste trabalho.

À minha coorientadora Nathália de Alencar Cunha Tavares, pela ajuda e esforço para que esta pesquisa pudesse ter um curso proveitoso e produtivo.

À Prof.^a Dr.^a Manuela Figueroa Lyra de Freitas pelas palavras de incentivo sempre nas horas mais difíceis.

À secretária do Programa de Pós-graduação em Patologia, Margarete Valdevino pela atenção e dedicação para com os assuntos relacionados à defesa da dissertação.

Aos colegas do Programa de Pós-graduação em Patologia: Priscila, Liane, Mirela, Neyla, Almerinda, Ana, Anderson, Glauber e Emanuela pelos momentos de aprendizado e descontração.

À Klewdma Araújo pelos momentos de estudo e por seu exemplo de dedicação, esforço e persistência que muitas vezes serviu de inspiração para irmos em frente.

Ao colega Eptácio Villar pelas palavras de incentivo.

Aos colegas do LIKA, Manu, Anselmo, Antônio, Catarina, Ronald, Natassia, Eduardo Glaucia, Ronaldo, Suelen, Camila, Wlisses, pela amizade e muitos momentos de descontração.

À Paula Sandrin, Jaqueline de Azevedo e Rafael Lima Guimarães pelo apoio, amizade e muitos momentos de aprendizado.

Aos amigos do Laboratório de Hematologia - HC: Norma, Marli, Simone, Daniela, Madi, Danne e Alex pela inestimável ajuda e solidariedade nos muitos momentos de ausência.

Aos membros da banca examinadora pela prontidão, contribuições, críticas e sugestões.

A todos que de alguma forma passaram pela minha vida e contribuíram para a construção deste trabalho.

Muito obrigada.
Zilma Pereira dos Anjos.

“... Se chorei ou se sorri o importante
é que emoções eu vivi.”

Roberto Carlos

RESUMO

Ficolinas são moléculas de reconhecimento do sistema complemento capazes de promover opsonização, fagocitose e destruição de patógenos mediado pela ativação da via das lectinas. Polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) nos genes *FCN1* e *FCN2*, que codificam as ficolinas 1 e 2, têm sido relacionadas com a susceptibilidade a doenças infecciosas e autoimunes. Nosso estudo teve como objetivo investigar a associação funcional dos polimorfismos de base única (SNPs) ou tagSNPs entre *FCN1* e *FCN2* e o desenvolvimento de diabetes *mellitus* tipo 1 (DM1). Dois SNPs no gene *FCN1*, rs2989727 e rs1071583 e três no *FCN2*, rs17514136, rs3124954 e rs7851696 foram estudados em 204 crianças e adolescentes com diagnóstico de DM1 e 193 indivíduos saudáveis do Nordeste do Brasil. Não encontramos associações diretas com o desenvolvimento do DM1 ou com a insurgência de doenças relacionadas com DM1, como doença celíaca (DC) e tireoidite autoimune (AITD). No entanto, o genótipo T / T (rs1071583) da *FCN1* foi associado com uma idade precoce quando do diagnóstico DM1 em comparação com C / C ou genótipos C / T ($p = 0,02$), em torno de dois anos de diferença. Assim, se a hipótese de que o genótipo T / T (rs1071583) não está diretamente envolvido nas etapas iniciais de DM1 início, mas, após o gatilho induzir DM1, os indivíduos com este genótipo podem aumentar / acelerar a resposta autoimune contra células β do pâncreas. Apesar dos nossos resultados indicarem importância de *FCN1* no contexto do DM1, estudos adicionais de réplicas devem ser realizados para esclarecer o papel da ficolina no DM1.

Palavras-chave: Diabetes *Mellitus* tipo 1. Ficolinas. Autoimunidade. SNP. Sistema Complemento.

ABSTRACT

Ficolins are innate immune proteins able to activate the complement system by the lectin pathway. Single nucleotide polymorphisms (SNPs) of *FCN1* and *FCN2* genes, encoding for ficolin 1 and 2, have been related with susceptibility to infectious and autoimmune diseases. Our study aims at investigating the association between *FCN1* and *FCN2* functional of single nucleotide polymorphisms (SNPs) or tagSNPs and the development of type 1 diabetes mellitus (T1D). Two SNPs at *FCN1*, rs2989727 and rs1071583 and three at *FCN2*, rs17514136, rs3124954 and rs7851696 were studied in 204 children diagnosed with T1D and 193 healthy individuals all from the Brazilian Northeast. No direct associations were found with the T1D onset or with the insurgence of T1D related celiac disease (CD) and autoimmune thyroiditis (AIDT). However, the genotype T/T (rs1071583) of *FCN1* was associated with an early age at T1D diagnosis compared with C/C or C/T genotypes ($p = 0.02$), around two years of difference. Thus, we hypothesize that the T/T genotype (rs1071583) is not directly involved in the initial steps of T1D onset, but, after the trigger inducing T1D, individuals carrying this genotype could increase/accelerate the pancreatic autoimmune response. Despite our results indicate some importance of *FCN1* in the context of T1D, additional replica studies should be performed to clarify the role of ficolins in T1D.

Keywords: Type 1 Diabetes. Ficolins. Autoimmunity. SNP. Complement System.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. A incidência de diabetes tipo 1 em crianças de 0-14 anos, por região geográfica e ao longo do tempo.	26
Figura 2. Interações entre diferentes tipos de células do sistema imune inato e adaptativo durante o desenvolvimento do DM1. 2011.	31
Figura 3. Representação esquemática das três vias de ativação do complemento.	37
Figura 4. Ativação do sistema complemento mediada por Ficolina/MBL.	38
Figura 5. Organização estrutural da MBL e das ficolinas.	41
Figura 6. Gene <i>FCN1</i> e os SNPs analisados nesse estudo;	42
Figura 7. Gene <i>FCN2</i> e os SNPs analisados nesse estudo.	43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Número estimado de crianças (0-14 anos) com DM1 nas regiões IDF em 2013.
.....28

Tabela 2. Critérios para diagnóstico do Diabetes de acordo com os níveis glicêmicos.
.....34

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Sigla	Descrição em Português	Descrição em Inglês
ADA	Associação Americana de Diabetes	American Association of Diabetes
Ag	Antígeno	Antigen
AITD	Tireoidite autoimune	Autoimmune thyroiditis
C'	Sistema complemento	Complement System
APC	Célula apresentadora de antígeno	Antigen presented cell
APS	Síndrome poliendócrina autoimune	Autoimmune polyendocrine syndrome
CD4+	Células T CD4 positivas	<i>Cluster of differentiation</i> 4+
CD8+	Células T CD8 positivas	<i>Cluster of differentiation</i> 8+
CNBr	Brometo de cianogênio	Cyanogen bromide
DC	Doença celíaca	Celiac Disease
DM	Diabetes mellitus	Diabetes Mellitus
DM1	Diabetes mellitus tipo 1	Type 1 Diabetes Mellitus
DM2	Diabetes mellitus tipo 2	Type 2 Diabetes Mellitus
EASD	Associação Européia para Estudo da Diabetes	European Association for Diabetes Study
EDTA	Ácido Etilenodiamino tetra-acético	Ethylenediamine tetra acetic acid
FPG	Glicemia em jejum	Fasting glucose
FBG	Fibrinogênio	Fibrinogen
GAD	Anticorpo antidescarboxilase do ácido glutâmico	Glutamic acid decarboxylase antibody
GlcNAc	N-acetilglicosamina	N-acetylglucosamine
GalNAc	N-acetilgalactosamina	N-acetylgalactosamine
HbA1C	Hemoglobina glicada	Glycated hemoglobin
HIV	Vírus da imunodeficiência humana	Human immunodeficiency virus
HLA	Antígeno Leucocitário Humano	Human Leukocyte Antigen
IAA	Anticorpos anti-insulina	Insulin autoantibodies
IA2	Antitirosina fosfatase	Protein tyrosine phosphatase

ICA	Anticorpos antiilhotas pancreáticas	Islet cell autoantibodies
IDF	Federação Internacional de Diabetes	<i>International Diabetes Federation</i>
IFN	Interferon	. Interferon
Ig	Imunoglobulina	Immunoglobulin
IL	Interleucina	Interleukin
ILR	Receptor de interleucina	Interleukin receptor
Kb	Kilobase	Kilobase
LADA	Diabetes Autoimune Latente do Adulto	Latent autoimmune diabetes in adults
LES	Lúpus eritematoso sistêmico	Systemic Lupus erythematosus
LTC	Linfócito T citotóxico	Cytotoxic T lymphocytes
MAC	Complexo de Ataque à Membrana	Membrane Attack Complex
MASP	Serinas Protease Associada a Manose	Mannose Associated Serin Protease
MBL	Lectina de Ligação a Manose	Mannan-Binding Lectin.
mg	Miligrama	Milligram
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade	Major histocompatibility complex
Mmol	Milimolar	Millimolar
mRNA	RNA mensageiro	messenger RNA
NK	Células matadoras naturais	Natural killer cells
TOTG	Teste oral de tolerância à glicose	Oral glucose tolerance test
OMS	Organização Mundial da Saúde	World Health Organization
PAMP	Padrão molecular associado à patógeno	Pathogen-associated molecular pattern
SBD	Sociedade Brasileira de Diabetes	Brazilian Society of diabetes
SNP	Polimorfismo de Base Única	Single Nucleotide Polymorphism
T1D	Diabetes tipo 1	Type 1 diabetes
Th1	Linfócitos T auxiliares tipo 1	Type 1 Helpers T lymphocytes
Th2	Linfócitos T auxiliares tipo 2	Type 2 Helpers T lymphocytes
TNF	Fator de Necrose Tumoral	Tumoral Necrosis Factor
TOTG	Teste oral de tolerância a glicose	Test oral glucose tolerance

Treg	Linfócitos T regulatórios	Lymphocytes T regulatory
UTR	Região não traduzida	Untranslated region
VA	Via alternativa	Alternative pathway
VC	Via clássica	Classical pathway
VL	Via lectina	Lectin pathway
ZnT8A	Anticorpos antitransportador de zinco	Zinc transporter 8 autoantibody

SUMÁRIO

1 APRESENTAÇÃO	18
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	22
2.1 O diabetes <i>mellitus</i> tipo 1	22
2.1.1 Síndrome poliglandular autoimune.....	24
2.1.2 Epidemiologia: Incidência / Prevalência da DM1.....	25
2.2 Sistema Imune	28
2.2.1 Sistema Imune no DM1	29
2.3 Patogênese do DM1.....	32
2.4 Diagnóstico e Tratamento.....	33
2.5 Sistema complemento	35
2.5.1 Vias de ativação do complemento	36
2.6 Ficolinas.....	40
2.6.1 Estrutura proteica e organização gênica das ficolinas	40
2.6.2 Expressão no tecido.....	43
2.6.3 Variações genéticas das Ficolinas.....	44
2.6.4 Variações do gene <i>FCN1</i>	45
2.6.5 Variações do gene <i>FCN2</i>	46
3 MATERIAL E MÉTODOS	47
3.1 Grupo de estudo	47
3.2 Extração de DNA genômico	47
3.3 Diagnóstico de Tireoidite autoimune e Doença celíaca	48
3.4 Estratificação dos pacientes	48
3.5 Genotipagem dos indivíduos e construção de haplótipos.....	49
3.5.1 Seleção dos polimorfismos	49
3.5.2 Gene <i>FCN</i>	49
3.6 Métodos Estatísticos	49

4 RESULTADOS	51
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	52
REFERÊNCIAS	53
APÊNDICE A – Polymorphism In Ficolin-1 (<i>Fcn1</i>) Gene Is Associated With An Earlier Onset Of Type 1 Diabetes Mellitus In Children And Adolescents From Northeastern Brazil.....	60

1 APRESENTAÇÃO

O termo diabetes *mellitus* (DM) descreve uma desordem metabólica de etiologia múltipla, caracterizada por hiperglicemia crônica com distúrbios do metabolismo dos hidratos de carbono, gordura e proteína resultantes de defeitos na secreção, ou na ação da insulina, ou em ambos. Os efeitos do DM incluem danos a longo prazo, disfunção de vários órgãos, especialmente olhos, rins, nervos, coração e vasos sanguíneos. Vários processos patogênicos estão envolvidos no desenvolvimento do diabetes, estes vão desde a destruição autoimune das células- β do pâncreas, com consequente deficiência de insulina até anormalidades que resultam na intolerância a insulina (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2014).

A classificação proposta pela Organização Mundial da Saúde (OMS) e pela Associação Americana de Diabetes (ADA), inclui quatro classes clínicas: DM tipo 1, DM tipo 2, outros tipos específicos de DM e diabetes *mellitus* gestacional sendo os principais os tipos 1 e 2. O diabetes *mellitus* tipo 2 (DM2) ou não insulino dependente é caracterizado pela resistência a ação da insulina e está frequentemente associado a síndrome metabólica. Por outro lado, o diabetes *mellitus* tipo 1 (DM1) é uma desordem que apresenta um componente imunogenético intrínseco envolvido na sua patogênese, sendo classificado como uma doença multifatorial autoimune órgão-específica (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2014).

O DM1 representa 5% a 10% dos casos de diabetes, e apesar de acometer indivíduos em qualquer faixa etária é mais frequente na infância e adolescência sendo uma das doenças crônicas mais comuns em crianças e adolescentes. Dados recentes indicam que a incidência do DM1 cresce em torno de 2% a 5% em todo o mundo e, anualmente, nos Estados Unidos, aumenta cerca de 5.3%. Se as tendências atuais continuarem, a duplicação de novos casos de DM1 em crianças européias, menores de 5 anos, está previsto para até 2020, e a prevalência de casos em indivíduos menores de 15 anos irá aumentar em torno de 70% (ROGLIC et al., 2004).

No Brasil, existem poucos relatos a respeito da epidemiologia do DM1, e um dos estudos mais recentes realizado por Negrato et al. (2010) em São Paulo, estudando a cidade de Bauru, entre os anos de 1986 e 2006, encontraram uma incidência geral de 10,4 casos de DM1 por 100.000 habitantes, variando de 2,82 em 1987 a 18,49 em 2002, representando, assim, um aumento de 6,56 vezes na incidência do DM1 nesta população.

O DM1 é uma doença autoimune, órgão-específica, que se caracteriza pela destruição das células β do pâncreas com conseqüente deficiência de insulina. No DM1 ocorre a perda da autotolerância periférica com a presença de linfócitos T autorreativos que parecem desencadear todo o processo de autoimunidade, no entanto, como essa perda da autotolerância acontece ainda não está completamente esclarecido (BALDA e PACHECO 1999; STECKAND e REWERS 2011).

É importante enfatizar que o ponto crítico do DM1 consiste no processo cumulativo da autoimunidade, uma vez que o tratamento utilizado com insulina não impede ou minimiza esse processo. Portanto, o ataque às células- β do pâncreas continua acontecendo. Esse quadro cumulativo pode promover a insurgência de outras doenças autoimunes. De fato, um em cada três pacientes portadores do DM1 não limita o ataque autoimune às células- β , portanto, é comum que esses pacientes apresentem a chamada síndrome poliglandular. Dos portadores de DM1 cerca de 15-30% apresentam a doença autoimune da tireóide (Hashimoto ou Doença de Graves) e cerca de 4 a 9% irão desenvolver a doença celíaca, além de poderem apresentar a anemia perniciosa (5-10%), doença *de Addison* (0,5%) e, em torno de 2-10% manifestar o vitiligo. Tais indícios sugerem que essas doenças possam compartilhar vias patogênicas similares (DRIESSCHE et al., 2009)

Um importante componente do sistema imune que participa de vários eventos da resposta imunológica humoral e também da imunidade inata é o sistema complemento (SC). Dele, fazem parte mais de 35 proteínas plasmáticas e de superfície celular capazes de reconhecer patógenos; diferenciar tecidos saudáveis, restos celulares e células apoptóticas; e atuar na manutenção da homeostase. Este reconhecimento é realizado por proteínas potencialmente inativas, que se tornam ativadas, de forma estável, após sua ligação a padrões moleculares associados aos patógenos (PAMPs), ou a constituintes celulares alterados (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008).

O processo de ativação do SC compreende três vias: via clássica, via alternativa e a via das lectinas. Todas as vias convergem para a ativação do componente central ou C3. A via clássica tem relação com a resposta imune específica do hospedeiro e sua ativação depende da produção de anticorpos e da formação de complexos antígeno-anticorpo. A via alternativa é ativada e aumenta na presença de superfícies ativadoras adequadas como as paredes celulares das bactérias, fungos e vírus. A via das lectinas é ativada pela proteólise das serinas proteases (MASPs) associadas à lectina ligante de manose (MBL) ou às ficolinas (Ficolina-1, Ficolina-2

e Ficolina-3). Quando ocorre a ligação das ficolinas ao alvo, o complexo ficolina-MASP-2 é capaz de clivar C4 e C2 em C4b2b, formando a enzima C3 convertase e, desta forma, dando sequência à cascata do SC. Por outro lado, MASP-1 pode clivar C3 diretamente e levar à ativação da via alternativa (FUJITA, 2002; GARRED et al., 2009). A cascata proteolítica desencadeada pelo processo de ativação permitirá uma grande amplificação e rapidez da resposta inflamatória, pois cada ativação de um elemento pré-formado pode gerar, rapidamente, múltiplas enzimas e complexos enzimáticos ativados (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008).

Ficolinas são proteínas plasmáticas estruturalmente semelhantes às colectinas, possuindo um domínio semelhante ao colágeno, mas em vez de um domínio de lectina tipo C, elas têm um domínio de reconhecimento de carboidrato do tipo do fibrinogênio. Foi demonstrado que as ficolinas ligam-se a diversas espécies de bactérias, opsonizando-as e ativando o complemento de uma maneira semelhante à MBL. Os ligantes moleculares das ficolinas incluem a N-acetilglicosamina e o componente ácido lipoteicoico das paredes celulares das bactérias gram-positivas (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008). Nos seres humanos, foram identificados três genes que codificam para ficolina: *FCN1*, *FCN2* e *FCN3*, que codificam Ficolina-1 (Sinônimo de M-ficolina), Ficolina-2 (sinônimo de L-ficolina) e Ficolina-3 (sinônimo de H-ficolina), respectivamente. *FCN1* e *FCN2* estão ambos localizados no cromossomo 9 (9q34), enquanto que *FCN3* é atribuído ao cromossomo 1 (1p36.11).

Uma série de estudos mostrou que alterações nos níveis séricos das Ficolinas, que ativam o SC, podem causar pré-disposições a inúmeras doenças infecciosas e autoimunes (ZHANG et al., 2008). Como o SC está envolvido no reconhecimento de tecidos saudáveis e na eliminação de corpos apoptóticos, acredita-se que a falta dessa ativação correta pode desencadear uma série de eventos envolvidos na perda da autotolerância periférica e na ativação de linfócitos T diabetogênicos. Um dos mecanismos que controlam a quantidade plasmática das ficolinas é a presença de polimorfismos na região promotora desses genes, desta forma acredita-se que esses polimorfismos genéticos podem estar relacionados com a susceptibilidade ao DM1 e suas co-morbidades.

O DM1 apresenta um padrão complexo de associações genéticas, e os prováveis genes de suscetibilidade à doença foram mapeados em pelo menos 40 loci. O primeiro relato de uma associação genética para o DM1 foi com a região do Antígeno Leucocitário Humano (HLA), descrita em 1973 por Singal e Blajchman. Nas últimas quatro décadas, os pesquisadores

buscam, não apenas, associar quais alelos que codificam genes HLA, mas também outros loci susceptíveis ao DM1 (GAN et al., 2012; NOBLE; ERLICH, 2012; ATKINSON et al., 2014).

Uma vez que as ficolinas ativam o complemento e evidências clínicas e experimentais enfatizam o papel proeminente do complemento em quadros de imunodeficiência e na patogênese de numerosas doenças inflamatórias, incluindo aquelas causadas por autoimunidade, acredita-se que alterações na produção de ficolina ou meia-vida decorrente desses SNPs são responsáveis por alternâncias no nível de ficolina na circulação dificultando a eliminação de potenciais autoantígenos sendo assim um fator de risco para o desenvolvimento de diabetes em crianças e adolescentes. Desta forma, fica evidente que tal doença merece especial cuidado no sentido de entender sua patogênese para tentar identificar grupos de riscos e permitir intervenção precoce nos indivíduos susceptíveis para que haja possibilidade de medidas profiláticas nos mesmos.

Diante do exposto o presente trabalho teve como objetivo investigar as possíveis associações de polimorfismos de base única dos genes *FCN1* e *FCN2* em pacientes com Diabetes *Mellitus* tipo 1, a fim de identificar possíveis marcadores genéticos associados ao DM1.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 O diabetes *mellitus* tipo 1

O diabetes *mellitus* tipo 1 (DM1) é uma das mais de 80 doenças consideradas como de etiologia autoimune. A doença ocorre como consequência da destruição imunitária órgão específica das células- β produtoras de insulina nas ilhotas de Langerhans do pâncreas, em indivíduos geneticamente predispostos à doença. (ATKINSON, 2001; NARENDRAN et al., 2005)

As células- β funcionam como sensores, liberando insulina numa proporção adequada para manutenção dos níveis fisiológicos de glicose (BLUESTONE et al., 2010). Uma vez que essas células são destruídas, os pacientes com DM1 perdem o controle da glicose no sangue, e passam a ter uma vida dependente da reposição exógena diária de insulina para controlar e manter os níveis de glicose circulante no sangue dentro dos valores normais, o que impede os picos de hiperglicemia (QUEIROZ, 2008).

A ADA propôs uma classificação etiológica do diabetes, com diabetes tipo 1A representando o diabetes imuno-mediado e tipo 1B uma forma idiopática quando não há evidências do processo autoimune. No diabetes tipo 1A a taxa de destruição das células β é variável, sendo, em geral, mais rápida entre as crianças. A forma lentamente progressiva ocorre em adultos, sendo referida como diabetes autoimune latente do adulto (LADA, do inglês, *latent autoimmune diabetes in adults*) (CERNEA et al., 2009; DIRETRIZES SBD, 2013-2014).

Os melhores marcadores para distinguir o diabetes tipo 1A de outras formas de diabetes são a presença de autoanticorpos anti-ilhota. Os primeiros anticorpos descritos em associação com DM1 foram os anticorpos anti-ilhota pancreática (ICA). Subsequentemente, anticorpos anti-insulina (IAA), antidescarboxilase do ácido glutâmico (GAD), antitirosina fosfatase (IA2) e, posteriormente, o antitransportador de zinco (ZnT8A) (HOFFMAN, 2004; EISENBARTH, 2007; DIRETRIZES SBD, 2013-2014).

A história natural do DM1 inclui quatro estágios distintos:

1) pré-clínico: autoimunidade dirigida contra as células- β , com diminuição aguda e progressiva da resposta insulínica à glicose intravenosa ou oral;

2) início do diabetes clínico;

3) remissão transitória;

4) diabetes associado a complicações agudas, crônicas e morte prematura (REWERS et al., 1997).

A fase pré-clínica da doença é caracterizada pela presença de autoanticorpos contra constituintes da célula- β pancreática, que participam da sua autodestruição. Na maioria dos casos é silenciosa e pode persistir durante semanas, meses, ou mesmo anos, até que a produção de insulina seja insuficiente para manter o metabolismo normal da glicose, levando ao desenvolvimento de hiperglicemia e possíveis complicações associadas a diversos órgãos devido à falta de insulina (BLUESTONE et al., 2010; LEHUEN et al., 2010; GAN et al., 2012). A transição da fase pré-clínica para o aparecimento clínico do DM1 é caracterizada por um aumento agudo da concentração da glicose, acompanhado por sintomas como polidipsia (excessiva sensação de sede), polifagia (fome excessiva) e poliúria (aumento no volume normal de urina) (ADA–DIABETES CARE, 2014).

Pacientes com DM1 são conhecidos por terem um risco maior de desenvolverem doenças autoimunes. Em um terço dos pacientes o ataque autoimune não é só direcionado para células β , mas expande-se para outros distúrbios endócrinos, bem como do tecido não endócrino (DRIESSCHE et al., 2009; FOURATI et al., 2012). A síndrome poliglandular autoimune (APS) é composta por várias destas doenças, que afetam principalmente as glândulas endócrinas. Ela é comumente associada à tireoidite autoimune, insuficiência adrenocortical, e DM1. As poliendocrinopatias têm largo espectro de apresentação, e o DM1 pode ser a manifestação inicial, uma vez que outras doenças autoimunes podem estar em fase latente (ANAYA, 2010; BETTERLE et al., 2014).

Doenças autoimunes representam um problema de saúde importante em todo o mundo desenvolvido e atinge 5-10% da população (ANDERSON, 2008), muitos dos processos autoimunes nestes distúrbios parece estar associado com uma resposta progressiva dirigida por células T que resulta em danos nos órgãos e na produção de autoanticorpos órgãos específicos, semelhantes ao que é observado no DM1 isolado (EYSTEIN S. HUSEBYE e MARK S. ANDERSON). Embora as doenças autoimunes apresentem características contrastantes como: epidemiologia, patologia e manifestações clínicas, três linhas de evidência mostram que essas doenças possam compartilhar mecanismos imunogenéticos

semelhantes. Primeiro, evidências clínicas destacam a co-ocorrência de doenças autoimunes distintas em um mesmo indivíduo e dentro do núcleo familiar. Segundo, a evidência fisiopatológica indica que os mecanismos patológicos podem ser semelhantes entre as doenças autoimunes. Por fim, a evidência genética mostra que fenótipos autoimunes podem representar resultados pleiotrópicos da interação de genes de doenças não específicas (ANAYA, 2010).

2.1.1 Síndrome poliglandular autoimune

Mecanismos fisiopatológicos semelhantes entre doenças autoimunes têm estimulado pesquisas para raízes genéticas comuns. No caso do DM1, a síndrome poliendócrina autoimune (do inglês *autoimmune polyendocrine syndrome* ou APS) são um exemplo e proporcionam uma riqueza de novas informações sobre a patogênese da doença. As APS são caracterizadas por insuficiência funcional de vários órgãos endócrinos secundárias a um processo destrutivo imunologicamente mediado (ANDERSON, 2008). Elas (as APS) são divididas em tipo I, II e III de acordo com a idade de ocorrência da endocrinopatia, modelo de hereditariedade e relacionamento com o complexo principal de histocompatibilidade (MHC) (KIM et al.,2013)

A APS tipo I é caracterizada pela tríade clássica de candidíase mucocutânea (90-100%), hipoparatiroidismo (80-85%) e doença de Addison (70-75%) que aparecem em uma ordem cronológica. Para o diagnóstico, pelo menos, dois dos três principais componentes devem estar presentes. Já a APS tipo II é caracterizada pela presença da doença de Addison (100%), em associação com as doenças autoimunes da tireóide e/ou DM1. É o tipo mais comum encontrado clinicamente (WEINSTOCK et al.,2011)

APS tipo III mostra uma associação direta de doença autoimune da tireóide (tireoidite de Hashimoto, doença de Grave) e DM1 e ausência da doença de Addison. É uma condição muito rara. A prevalência mundial exata da APS tipo III é desconhecida (ARYA et al., 2012).

A presença de outras doenças autoimunes em pacientes com DM1 tem sido associada com o aumento da morbidade e mortalidade. Dessa forma, a detecção precoce de anticorpos e disfunção específica do órgão latente é defendida para alertar os médicos para tomar as medidas adequadas a fim de prevenir o avanço da doença.

2.1.2 Epidemiologia: Incidência / Prevalência da DM1

O DM1 é uma das condições endócrinas e metabólicas mais comuns na infância e adolescência, a qual responde por 5-10% das pessoas com diabetes, o que representa, aproximadamente, 10 a 20 milhões de pessoas em todo o mundo (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2014).

Dados referentes à incidência do DM1 na infância são muito limitados, porém grandes projetos como Diabetes Mondiale (DIAMOND) e Europa Diabetes (EURODIAB), que são fundamentais em acompanhar as tendências de incidência (número de pessoas que desenvolvem uma doença em um ano) do DM1 no mundo, indicam que, numa base anual, o aumento global na incidência de DM1 é de cerca de 3% e cerca de 79.100 crianças com menos de 15 anos desenvolvem o DM1 em todo o mundo (EURODIAB, 2000; DIAMOND, 2006).

A variação geográfica no mundo em incidência de DM1 é impressionante. A incidência do DM1 varia de 0,1 por 100.000 habitantes, em Países como China e Venezuela, a aproximadamente 41 por 100.000 habitantes por ano, na Finlândia, em crianças com idade inferior a 15 anos (EURODIAB, 2000; DIAMOND, 2006). Esta variação de quase 400 vezes na incidência dificilmente pode ser explicada pela ação isolada de fatores genéticos. Os fatores ambientais têm sido implicados na patogênese do DM1 tanto como iniciadores quanto como potenciadores da destruição de células- β do pâncreas (MIKAEL KNIP e OLLI SIMELL, 2012).

Mundialmente, a incidência do DM1 é caracterizada por variações devido a mudanças sazonais. Um número maior de casos é diagnosticado no outono e no inverno e entre os nascidos na primavera, apontando os fatores ambientais como agentes iniciadores da patologia (MOLTCHANOVA et al., 2009; KAHN et al., 2009).

Com poucas exceções, a base populacional do DM1 mostra registros com aumento da incidência de DM1 sobre o tempo. O Projeto DIAMOND, iniciado pela Organização Mundial da Saúde, em 1990, descreve a incidência e tendências de DM1 em crianças com idades entre 0-14 anos, num período de 1990-1999 em 57 países (Figura 1).

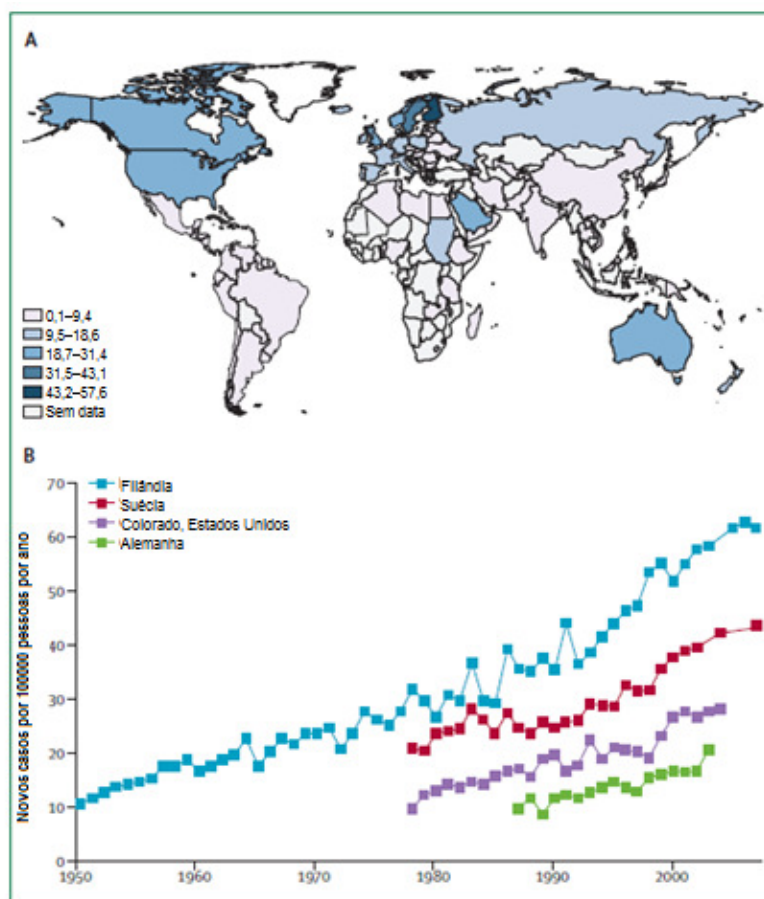


Figura 1. A incidência de diabetes tipo 1 em crianças de 0-14 anos, por região geográfica e ao longo do tempo. (A) Incidência estimada global de diabetes tipo 1, por região, em 2011 (B) Incidência de diabetes tipo 1 em crianças com idades entre 0-14 anos em áreas com altas ou intermediárias taxas da doença. FONTE: adaptado de ATKISON et al., 2013

As tendências estimadas para as regiões apresentaram aumentos estatisticamente significativos em todo o mundo sendo 4,0% na Ásia, 3,2% na Europa e 5,3% na América do Norte, exceto na América Central e Antilhas, onde a tendência mostrou um decréscimo de 3,6% (DIAMOND, 2006). Segundo dados da Federação Internacional de Diabetes (IDF-2013), 497.100 crianças vivem com DM1 no mundo.

Na região da África, crianças com DM1 muitas vezes não são diagnosticadas e quando diagnosticadas, poucas têm acesso a insulina, seringas e equipamentos de monitoramento, e como resultado, elas morrem. Estas mortes prematuras evitáveis dificultam uma estatística precisa e são um fator-chave para a baixa prevalência do DM1 na região (IDF, 2013).

A Europa tem o maior número de crianças com DM1 em comparação com as outras regiões avaliadas pela IDF, cerca de 129.300. A região também tem uma das mais altas taxas

de incidência da doença em crianças, com 20 mil novos casos por ano. Os países que mais contribuem com os números globais de DM1 em pessoas jovens são o Reino Unido, Rússia e Alemanha (IDF, 2013).

Há uma estimativa de 108.600 crianças com DM1 na América do Norte e Caribe. Os Estados Unidos da América (EUA) são responsáveis por cerca de 80% do número total de novos casos da doença em crianças, seguido pelo Canadá. Estima-se que 7.300 crianças desenvolveram DM1, em 2013, em regiões da América do Sul e Central, como um todo, 45.600 crianças com idade inferior a 15 anos têm a doença. A maioria, cerca de 31.100 crianças, vive no Brasil (IDF, 2013).

A Região do Sudeste da Ásia tem uma das mais altas estimativas de prevalência de DM1 em crianças, com 77.900 afetados. Em 2013, 12.600 crianças com menos de 15 anos de idade na região desenvolveram a doença sendo a Índia responsável pela maioria dos casos (IDF, 2013).

Estima-se que 32.500 crianças com idade inferior a 15 anos na Região do Pacífico Ocidental têm DM1, a maior contribuição vem das Filipinas (7.900), seguido de perto pela China (7.700). A Austrália tem a maior taxa de incidência estimada com 22,3 casos por 100.000 crianças. Em 2013, 5.300 crianças foram recém-diagnosticados com diabetes tipo 1 na Região do Pacífico Ocidental (IDF, 2013). A tabela 1 mostra o número de crianças de 0-14 anos com DM1 e o número de novos casos diagnosticados por ano nas regiões IDF.

Tabela 1: Número estimado de crianças (0-14 anos) com DM1 nas regiões IDF em 2013.

Regiões IDF	Número de crianças com DM1(milhões)	Número de novos casos de DM1 diagnosticados por ano (milhões)
África	39.1	6.4
Europa	129.4	20.0
América do Norte e Caribe	108.6	16.7
América do Sul e Central	45.6	7.3
Sudeste da Ásia	77.9	12.5
Pacífico Ocidental	32.5	5.3

Fonte: Adaptado de IDF Diabetes Atlas, 6 ed., 2013

2.2 Sistema Imune

O DM1 é uma doença de caráter autoimune, na qual o sistema imunológico está intrinsecamente envolvido. No nosso organismo, a defesa contra microrganismos é mediada pelas reações iniciais da imunidade natural e as respostas tardias da imunidade adquirida. A imunidade natural (também chamada de imunidade inata) é a primeira linha de defesa contra os patógenos (ABBAS et al., 2008), consistindo de barreiras físicas, tais como camadas de células epiteliais que expressam contato célula-célula (como as interações celulares mediadas pela caderina), a camada de muco secretado que cobre o epitélio respiratório, trato gastrointestinal e geniturinário, e os cílios epiteliais que varrem a camada de muco e que lhe permite estar constantemente atualizada após ter sido contaminado com partículas inaladas ou ingeridas.

A resposta inata também inclui proteínas solúveis e moléculas pequenas bioativas que estão constitutivamente presente em fluidos biológicos, tais como, proteínas do complemento, defensinas e ficolinas ou que são liberados a partir de células que são ativadas (incluindo citocinas que regulam a função de outras células, quimiocinas que atraem leucócitos, mediadores inflamatórios lipídicos de inflamação, as espécies reativas de radicais livres, aminas bioativas e enzimas que também contribuem para a inflamação dos tecidos). Por último, o sistema imune inato possui receptores ligados a membranas e as proteínas

citoplasmáticas que se ligam a padrões moleculares expressos nas superfícies de micróbios invasores. Alguns aspectos das defesas do hospedeiro inatos são constitutivamente ativos, outros são ativados após interações de células hospedeiras ou de proteínas hospedeiras com estruturas químicas que são característicos de micróbios invasores, mas que estão ausentes nas células hospedeiras (CHAPLIN, 2010).

Em contraposição à resposta inata, a resposta imune adaptativa depende da ativação de células especializadas, os linfócitos, e das moléculas solúveis por eles produzidas. As principais características da resposta adquirida são: especificidade e diversidade de reconhecimento, memória, especialização de resposta, autolimitação e tolerância a componentes do próprio organismo (CRUVINEL, et al., 2010).

As respostas adaptativas são baseadas, principalmente, nos receptores específicos de antígenos expressos na superfície de linfócitos T e B, esse conjunto de receptores de antígenos, codificado por genes da linhagem germinativa, permite a formação de milhões de diferentes receptores de antígenos, cada um com especificidade potencialmente única para um antígeno diferente (CHAPLIN 2010 GONZALES et al., 2011).

2.2.1 Sistema Imune no DM1

Em determinadas condições, o sistema imune pode sofrer falhas comprometendo o sistema de proteção, que pode ser alterado pelo aumento na proliferação ou deficiência de alguns componentes. Essa desregulação pode direcionar o sistema imune a responder contra o próprio organismo, ou seja, afetar o mecanismo de tolerância, contribuindo para o surgimento da autoimunidade. Esse mecanismo é uma propriedade fundamental do sistema imunológico normal, pois atua na destruição ou inativação de linfócitos que reconhecem antígenos próprios (JEKER et al., 2012).

A tolerância é um fenômeno imunologicamente específico, pelo qual a exposição de antígenos estranhos aos linfócitos em desenvolvimento induz tolerância a estes antígenos. A autotolerância pode ser induzida em linfócitos autorreativos imaturos, nos órgãos linfóides primários (tolerância central) ou em linfócitos maduros em locais periféricos (tolerância periférica). Quando ocorre a tolerância periférica, as células T maduras reconhecem antígenos próprios dos tecidos periféricos e tornam-se incapazes de responder, subsequentemente, a

esses antígenos. A tolerância periférica é devida a anergia, deleção ou supressão através dos linfócitos T regulatórios (Treg), ocorrendo quando as células T CD4⁺ (linfócitos T auxiliares – helper) são expostas a um antígeno na ausência de co-estimulação ou imunidade natural tornando-as incapazes de responder a este antígeno (JEKER et al., 2012).

No DM1, a falha na tolerância é mediada por células linfocitárias, macrófagos e células natural killer (NK), que irão infiltrar-se nas ilhotas pancreáticas, destruindo as células- β produtoras de insulina, provocando um processo inflamatório denominado de insulite. Na inflamação, a célula linfocitária predominante é o linfócito T CD8⁺ (citotóxicos), mas outras também estão presentes, como linfócitos T CD4⁺ (helper) (Kim; Lee, 2009). Além da infiltração desses linfócitos autorreativos, a ativação dos linfócitos T CD4 produz diversas citocinas que irão promover a proliferação e diferenciação de linfócitos T, linfócitos B e macrófagos. As citocinas Th1 secretadas tem como principais constituintes a interleucina2, o fator de necrose tumoral α (TNF- α) e o interferon- γ (INF- γ) que irão interagir com as células apresentadoras de antígenos (APCs), que nesse contexto serão as células β , culminando na apoptose das células β (SILVA et al., 2008).

Na Figura 2 é possível observar algumas interações entre os tipos de células do sistema imune inato e adaptativo durante o desenvolvimento do DM1.

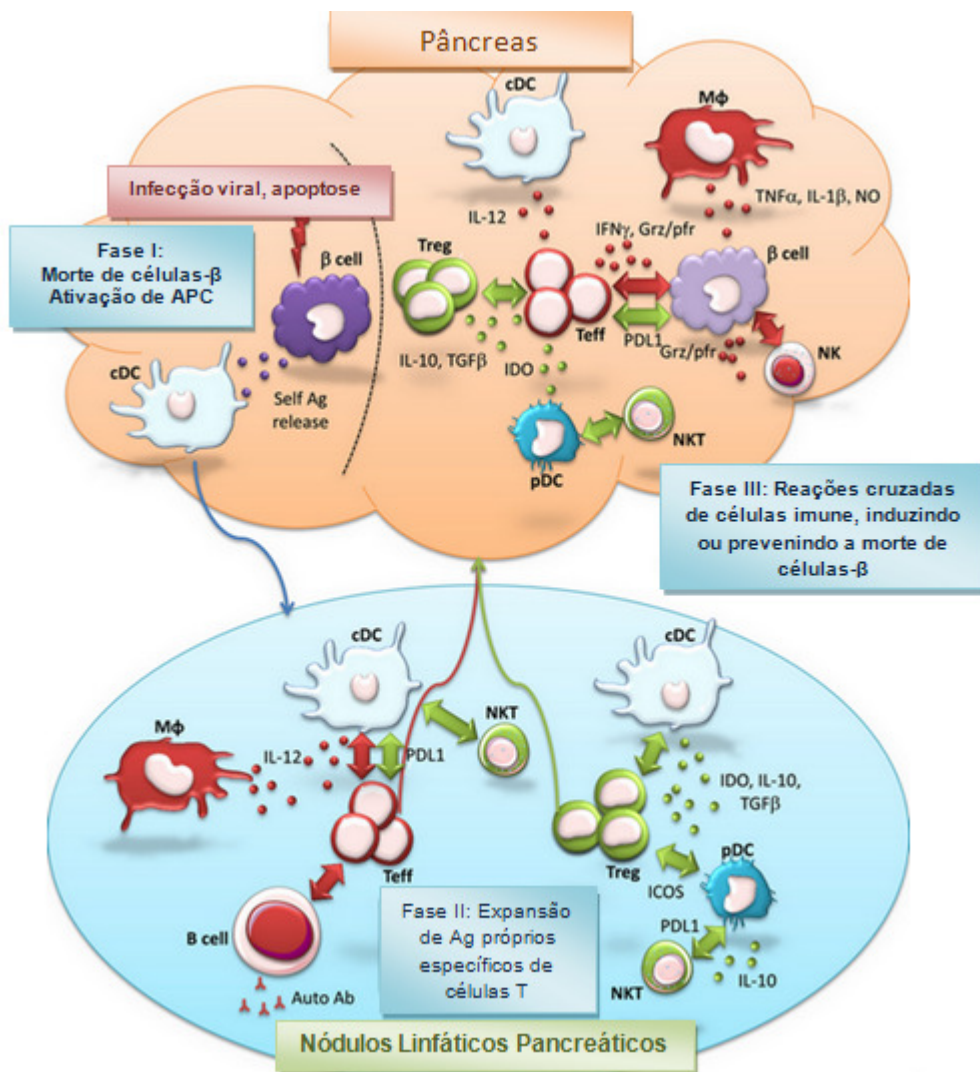


Figura 2: Interações entre diferentes tipos de células do sistema imune inato e adaptativo durante o desenvolvimento do DM1.

Fonte: Adaptado de Diana et al., 2011.

2.3 Patogênese do DM1

Embora a etiologia do DM1 seja desconhecida, um crescente número de evidências sugere que ele se desenvolve em indivíduos com fatores de risco genéticos herdados após a exposição a causas ambientais. Com o tempo, a autoimunidade leva à perda ostensiva de células- β e ao quadro de diabetes (PUGLIESE, 2013).

Apesar do início do DM1 ser abrupto, ele resulta de um ataque autoimune crônico às células- β que geralmente tem início vários anos antes de a doença se tornar evidente numa fase pré-clínica. As manifestações clássicas da doença (hiperglicemia e cetose) ocorrem depois que mais de 90% das células- β já foram destruídas (CNOP et al., 2005).

O mecanismo subjacente ao início e progressão do DM1 não está bem compreendido, no entanto, estudos epidemiológicos fornecem evidências sugestivas de que o processo de destruição das células β pancreáticas inclui ativação de células T autorreativas secundária a um encontro com um patógeno por epítomos compartilhados, ou de reação cruzada com antígenos próprios, ou seja, o mimetismo molecular, talvez porque alguns antígenos virais sejam antigenicamente semelhantes aos antígenos das células- β (ROBERT et al., 2006; CHRISTEN et al., 2010; CUSICK et al., 2012).

No DM1 as células- β pancreáticas são alvo de um ataque autoimune, com a invasão das ilhotas por células mononucleares em uma reação inflamatória denominada insulite, levando à perda da maioria destas células. Análises imunohistoquímicas de tecido pancreático revelam que os primeiros tipos celulares a infiltrarem as ilhotas de Langerhans são as células dendríticas e os macrófagos promovendo o quadro de insulite (KODAMA et al., 2003; SALMINEN et al., 2004).

No processo de autoimunidade, linfócitos T CD4 + são ativados por antígenos de células β e células apresentadoras de antígeno. Estas células ativadas secretam várias citocinas, cuja principal ação é promover a ativação e a proliferação de linfócitos T CD8+ citotóxicos (LTC) e de outras células, incluindo linfócitos B e macrófagos que infiltram nas ilhotas de Langerhans e começam o ataque às células- β (BALDA e PACHECO-SILVA, 1999; SESTERHEIM et al., 2007). A liberação de citocinas pró-inflamatórias, como o fator de necrose tumoral α (TNF- α), interferon-gama (IFN- γ) e interleucina 1 beta (IL-1 β) por células apresentadoras de antígeno e células T, conduz a um ciclo vicioso de

inflamação/destruição de células- β que mantém e, eventualmente, amplifica o ataque autoimune (KAMINITZ et al., 2007; EIZIRIK et al., 2009). Uma vez que este ciclo vicioso de autoimunidade está completamente desenvolvido, o destino das células- β das ilhotas é selado, e o diabetes clínico resulta inevitavelmente.

2.4 Diagnóstico e Tratamento

Durante décadas, o diagnóstico de diabetes foi baseado em critérios de glicose no plasma, tanto da glicose plasmática em jejum (FPG) quanto do teste de tolerância oral à glicose (TOTG).

Em 2010 foi criado o Comitê Internacional de Especialistas, que reuniu representantes da Associação Americana de Diabetes (ADA), da Federação Internacional de Diabetes (IDF), e da Associação Européia para o Estudo da Diabetes (EASD), este comitê chegou a um consenso que o diabetes seria melhor diagnosticado através da medição da hemoglobina glicada (HbA1C), que reflete as concentrações de glicose no sangue a longo prazo.

Em crianças e adolescentes, o teste da HbA1C, é indicado quando há suspeita de diabetes, na ausência dos sintomas clássicos ou um nível plasmático de glicose > 200 mg / dl ($> 11,1$ mmol / l). Esse teste tem várias vantagens sobre a FPG e TOTG, incluindo uma maior conveniência (pois não é necessário o jejum), a ADA e a OMS têm endossado o uso da HbA1C para o diagnóstico do diabetes.

Na tabela 2 estão dispostos os critérios estabelecidos pela ADA com relação aos níveis glicêmicos de um indivíduo diagnosticado com diabetes.

Tabela 2. Critérios para diagnóstico do Diabetes de acordo com os níveis glicêmicos. Qualquer uma das seguintes opções é utilizada como diagnóstico.

<p style="text-align: center;">HbA1C Hemoglobina Glicosilada</p>	<p style="text-align: center;">$\geq 6.5\%$ (48 mmol / mol) O teste deve ser realizado em um laboratório usando um método certificado pelo Programa Nacional Hemoglobina Glicosilada (NGSP)</p>
<p style="text-align: center;">FPG (Glicemia em jejum)</p>	<p style="text-align: center;">≥ 126 mg/dl (7,0 mmol/l) Jejum é definido como por pelo menos 8h de nenhuma ingestão calórica</p>
<p style="text-align: center;">TOTG (Teste oral de tolerância à glicose)</p>	<p style="text-align: center;">≥ 200 mg/dl (11,1 mmol/l) (75g ou 1,75 g/Kg de peso em crianças)</p>

Fonte: Adaptado de ADA, 2014.

Devido à susceptibilidade genética comum, DM1 frequentemente coexiste com distúrbios autoimunes, tais como doença celíaca, doença de Hashimoto, doença de Graves, doença de Addison, vitiligo, hepatite autoimune, *miastenia gravis*, e anemia perniciosa. A presença de qualquer uma dessas condições ou evidência sorológica de autoimunidade subclínica, por exemplo, autoanticorpos contra a transglutaminase tecidual, peroxidase da tireóide, células parietais ou 21-hidroxilase, pode ajudar na correta classificação em casos duvidosos (MARIAN REWERS, 2012).

Os autoanticorpos para caracterização bioquímica de auto-antígenos das células- β : o anticorpo anti-insulina (AAI), anticorpo antitirosinafosfatase (IA2), anticorpo antidescarboxilase do ácido glutâmico (GADA) e anticorpotransportador de zinco 8 (ZnT8A) ajudam a definir DM1 (WENZLAU et al., 2007).

Testes para, pelo menos, dois desses autoanticorpos no diagnóstico agora é considerado padrão de atendimento em DM1. Acredita-se que 90% das crianças com DM1 apresentam positividade para ao menos um desses anticorpos durante o diagnóstico (ATKINSON; EISENBARTH, 2001).

No momento em que os primeiros sintomas clínicos (principalmente aqueles associados com hiperglicemia) tornam-se aparentes, quase 80% das células- β do paciente foram destruídas, tornando o indivíduo dependente de injeções de insulina para sobreviver. A administração de insulina, no entanto, não é uma cura mesmo quando usada para manter um controle glicêmico apertado, não interrompe a resposta autoimune persistente. Também não impede, em todos os pacientes, as complicações devastadoras a longo prazo, tais como insuficiência renal, cegueira, danos nos nervos e cardiovascular (BINGLEY et al., 1999; ACHENBACH et al., 2005).

Atualmente, o tratamento padrão para o DM1 consiste na administração de insulina exógena ao longo da vida. Apesar dos avanços nos métodos de administração de insulina na monitorização da glicose, a terapia diária de insulina não representa uma cura e é frequentemente associada com o risco de hipoglicemia potencialmente fatal, bem como complicações devastadoras de retinopatia, nefropatia e neuropatia. O transplante de pâncreas é o método preferido para atingir a homeostase da glicose, embora o procedimento requeira uma grande cirurgia e imunossupressão ao longo da vida, ele continua sendo o padrão-ouro para uma população específica de pacientes que sofrem de diabetes tipo 1 e que não respondem à terapia convencional (VARDANYAN et al., 2010).

Uma grande variedade de intervenções para curar eficazmente o DM1 vem sendo desenvolvida, como a combinação de terapias com moduladores autoimunes, como o anti-CD3 F(ab')₂FcR-não ligante, e vacinas antigênicas nas ilhotas e terapias com citocinas, como o fator de necrose tumoral (TNF- α) e as interleucinas 2, 15 e 18 (BRESSON et al., 2006; 2010; SUTHERLAND et al., 2009).

2.5 Sistema complemento

O sistema complemento (SC) compõe um dos principais mecanismos da resposta imune inata contra agentes infecciosos e, além disso, desempenha um papel importante na imunidade adaptativa, envolvendo células T e B, que ajudam na eliminação de agentes patogênicos (DUNKELBERGER J.R e SONG W.C. 2010) e na manutenção da memória imunológica impedindo a re-invasão patogênica. Além da imunidade inata e adaptativa, também está envolvido na regeneração de tecidos, crescimento de tumores (QU H. et al., 2009) em estados patológicos humanos como na síndrome hemolítico-urêmica e na degeneração macular

relacionada à idade, uma doença inflamatória, que causa deficiência visual e cegueira em pessoas idosas (WAGNER et al., 2010; BRADLEY et al., 2011).

O SC consiste em mais de 35 proteínas séricas e de superfície celular. As primeiras influenciam a resposta inflamatória, a modulação imunológica e de defesa do hospedeiro. As de superfície celular são receptores para o complemento, que medeiam os efeitos celulares da ativação do complemento e proteínas reguladoras, que protegem as células hospedeiras de lesão mediada pelo complemento (JE FIGUEROA e P DENSEN, 1991).

2.5.1 Vias de ativação do complemento

O SC pode ser ativado por três maneiras diferentes: a via clássica, a via das lectinas e a via alternativa. Todas elas resultam na etapa central de clivagem proteolítica do componente C3, etapa que permite o recrutamento de várias outras proteínas para a destruição do patógeno (Figura 3).

Os passos iniciais que desencadeiam esses processos de ativação diferem consideravelmente. A via clássica é ativada pelo reconhecimento de complexos antígeno-anticorpo sobre superfícies de células estranhas pelo componente do complemento C1q (Lambris et al., 2008; MURPHY et al., 2010a). A via das lectinas é iniciada pela atividade proteolítica desencadeada pelas serinas proteases (MASPs) associadas à lectina ligante de manose (MBL) ou às ficolinas (Ficolina-1, Ficolina-2 e Ficolina-3), as quais reconhecem padrões de açúcares presentes nos patógenos (EVANS-OSES et al., 2013). Por outro lado, a via alternativa é ativada pela hidrólise espontânea de C3 ou pelo reconhecimento de padrões pela properdina (GARRED et al., 2009).

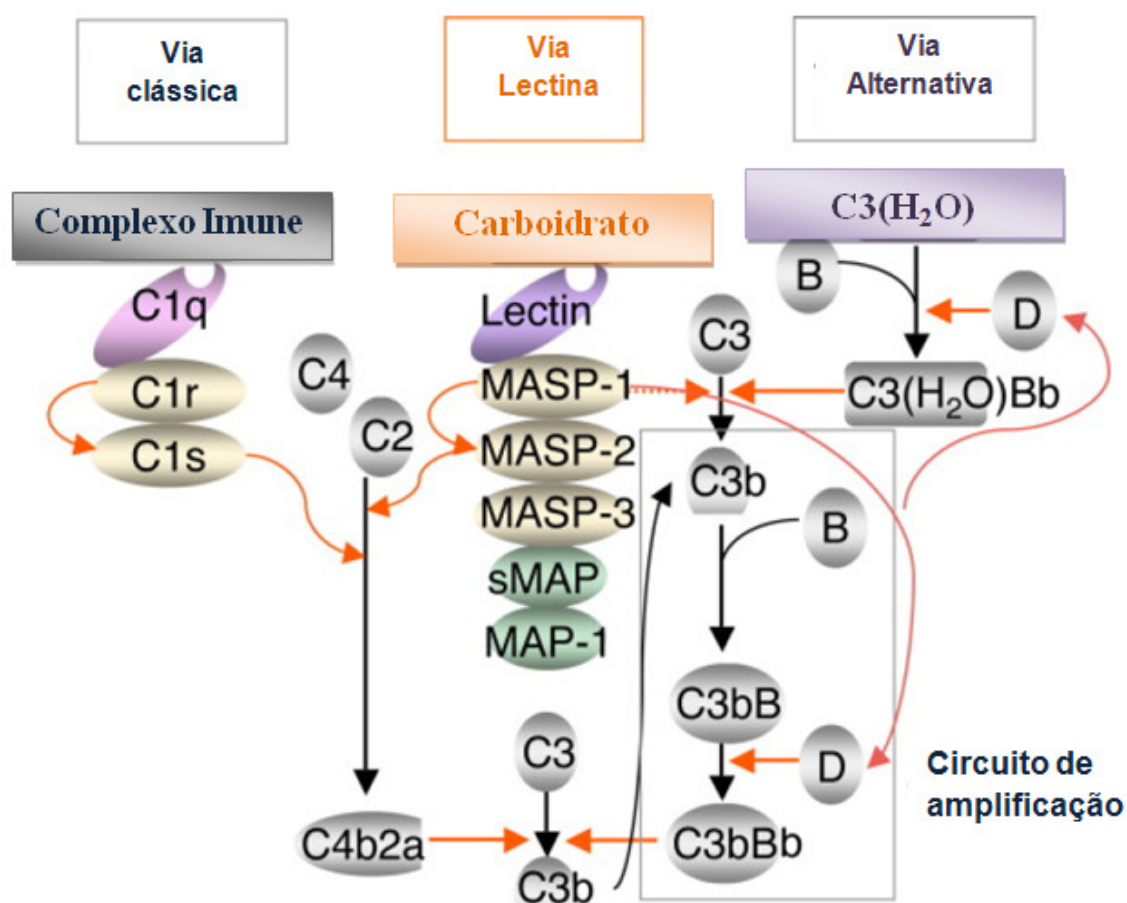


Figura 3: Representação esquemática das três vias de ativação do complemento.

Na via clássica, C1q reconhece os complexos imunes, enquanto na via da lectina, lectinas, tais como MBL e ficolinas reconhecem invasores. Esse reconhecimento ativa as serinas proteases associadas da família MASP/C1r/C1s, e por sua vez a ativação do complemento. A via alternativa é ativada na superfície de alvos sem a participação das moléculas amplificadoras das vias clássica e lectina, amplificando clivagem do C3 (ciclo de amplificação).

Fonte: Adaptado de ENDO et al., 2011.

A ativação dessas vias contribui para a integração dos mecanismos efetores da imunidade inata e adaptativa. Na resposta imune inata, patógenos que invadem o organismo deparam com substâncias solúveis da resposta imune inata, como as proteínas do SC, proteína C reativa e outras. Na imunidade adaptativa, o SC é ativado pela ligação de anticorpos pré-formados ao patógeno ou antígeno (imunocomplexo) (BARRINGTON et al., 2001).

A via das lectinas (VL) é iniciada pela atividade proteolítica desencadeada pelas serinas proteases (MASPs). O sistema MASP contém três enzimas diferentes; MASP-1, MASP-2 e MASP-3 e uma proteína sem atividade proteolítica chamada SMAP ou MAP19 (DAHL et al., 2010; DEGN et al., 2011), MASP-2 é similar a C1r e C1s, e a MASP-1 tem menor homologia. Todas as quatro enzimas parecem ter evoluído por duplicação gênica de um

precursor comum (MURPHY et al., 2010a), ambas MBL e ficolina circulam no soro na forma de complexos com as MASPs. Quando o complexo MBL/MASP ou ficolina/MASP liga-se a carboidratos ou compostos acetilados na superfície do patógeno, (Figura 4) induz alterações conformacionais que resultam na autoativação de MASP2. A ativação dessas proteases resulta na quebra dos componentes C2 e C4 do SC em fragmentos menores (C2b e C4a) e fragmentos maiores (C2a e C4b). O complexo C4bC2a constitui a C3 convertase da via clássica, que cliva C3 em C3a solúvel e C3b, que, por sua vez, se liga a C4bC2a na superfície do microrganismo. O complexo C4bC2aC3b, denominado C5 convertase, cliva o componente C5, dando sequência a essa via, que culmina com a formação do complexo de ataque a membrana (MAC) (GARRED et al., 2009; DEGN et al., 2011; EVANS-OSSES et al., 2013).

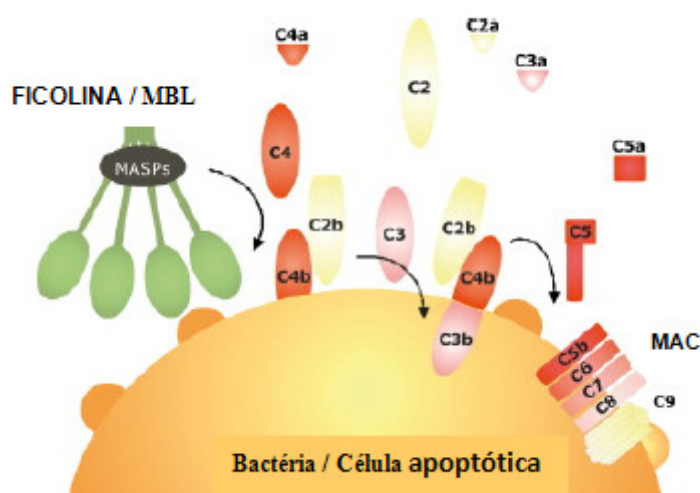


Figura 4: Ativação do sistema complemento mediada por Ficolina/MBL.

A figura esquematiza a ativação da via das lectinas do complemento após ligação das ficolinas (1,2,3) ou MBL a hidratos de carbono ou compostos acetilados na superfície do patógeno ou de células hospedeiras que morrem. Fonte: Adaptado de GARRED et al., 2009.

A via clássica (VC) se assemelha à via das lectinas e se inicia pela ligação do componente C1q a duas moléculas de IgG ou a uma de IgM, complexadas ao antígeno-alvo (imunocomplexos). Essa ligação ativa as proteases R (C1r) e S (C1s) associadas a C1q, que clivam os componentes C2 e C4, dando sequência à via como descrito. A via clássica está associada à resposta imune específica humoral, pois depende da produção prévia de anticorpos específicos aderidos à superfície dos patógenos (BARRINGTON et al., 2001)

A terceira via de ativação do complemento é chamada de via alternativa (VA) porque foi descoberta como uma segunda via, ou “alternativa”, para a ativação do complemento e, ao contrário das vias clássica e da lectina que necessitam de moléculas de reconhecimento específicas para iniciação (C1q ou MBL / ficolinas, respectivamente), a VA não depende de uma proteína que se ligue ao patógeno para seu início. O sistema é iniciado com a quebra espontânea do componente C3 nos fragmentos C3a e C3b (Figura 3). A clivagem expõe uma ligação tioéster no fragmento C3b, que permite sua ligação covalente à superfície dos microorganismos invasores. Não havendo ligação do componente C3b, a ligação tioéster é rapidamente hidrolisada e o fragmento, inativado. A ligação de C3b permite a ligação ao Fator B, que, em seguida, é clivado nos fragmentos Ba e Bb pelo Fator D. O complexo C3bBb (C3 convertase da via alternativa) cliva mais moléculas C3 e permanece ligado na superfície. Esse complexo é estabilizado pela properdina (fator P), amplificando a quebra de C3. C3bBb cliva o componente C3, gerando C3bBbC3b, uma protease capaz de clivar C5, última etapa da via alternativa (FERREIRA et al., 2010; MURPHY et al., 2010a)

As vias das lectinas, clássica e alternativa, têm em comum a formação de C5 convertase, que promove a clivagem do componente C5 e gera os fragmentos C5a e C5b. A ligação do C5b à superfície do patógeno dá início à formação do complexo de ataque à membrana pela ligação sucessiva dos componentes C6 e C7 na bicamada lipídica da membrana celular. O complexo C5b, 6, 7 permite a ligação do componente C8 e, finalmente, há polimerização do C9 atravessando a bicamada lipídica e promovendo lise osmótica do agente infeccioso.

A via da lectina para a saúde humana é destacada por imunodeficiências associadas a mutações de MBL (Turner, 1996) e MASP-2 (STENGAARD-PEDERSEN et al., de 2003). Indivíduos homo ou heterozigóticos para qualquer uma das três mutações pontuais no gene da MBL ou com mutações na região promotora são susceptíveis a uma grande variedade de infecções virais, bacterianas e parasitárias, em particular no início da infância, antes de a imunidade adaptativa ser estabelecida (SUMIYA et al., 1991) ou quando a resposta imune adaptativa é comprometida, por exemplo, durante a infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) ou após quimioterapia (GARRED et al., 1997; NETH et al., 2001). A via da lectina também desempenha um papel importante na patogênese de desordens inflamatórias e autoimunes, tais como fibrose cística, artrite reumatóide e DM1 (KILPATRICK 2002; ARAÚJO et al., 2009).

2.6 Ficolinas

As Ficolinas, um grupo de proteínas solúveis com papéis na imunidade inata, foram identificadas numa variedade de diferentes espécies, tais como humanos, ratos, galinhas, ouriços, rãs e ascídias. Nos seres humanos, três ficolinas diferentes foram descritas: ficolina-1 (M-ficolina), ficolina-2 (L-ficolina) e ficolina 3 (H-ficolina). Em roedores e porcos apenas duas ficolinas, ficolina-A (ou alfa) e ficolina- B (ou beta) têm sido descritos (GARRED et al., 2010).

A Ficolina-2 (também denominada L-ficolina) foi identificada em várias configurações recebendo vários nomes (HARUMIYA et al., 1996). Muitas destas descobertas foram devido à capacidade de Ficolina-2 de se ligar diretamente ao brometo de cianogênio (CNBr) ativado por sepharose, não importando qual a proteína está acoplada. A forma humana de Ficolina-2 foi depois isolada a partir do plasma e a sua sequência determinada (MATSUSHITA et al., 1996).

Ficolina-1 foi originalmente identificada por clonagem de oligonucleotídeos que codificam uma molécula semelhante à Ficolina-2 (LU et al., 1996; ENDO et al., 1996). A Ficolina-1 também tem sido referida como a proteína P35-relacionada à M-ficolina.

Ficolina-3, também identificada como H-ficolina, foi descoberta como um antígeno presente em doentes com lúpus eritematoso sistêmico (LES), identificados pela presença de autoanticorpos. Devido ao antigo nome da cidade onde o antígeno foi descoberto (Hakata), a proteína foi originalmente chamada de antígeno-Hakata (INABA et al., 1990).

Ao contrário de porcos ou ratos, os seres humanos têm três ficolinas, todas as quais estão presentes na corrente sanguínea (KILPATRICK e CHALMERS 2012).

2.6.1 Estrutura proteica e organização gênica das ficolinas

As ficolinas existem como proteínas multiméricas consistindo de 34 - 35 subunidades kDa e as cadeias polipeptídicas das ficolinas - 1, 2 e 3 contêm 326, 313 e 299 aminoácidos, respectivamente. São compostas por quatro ou mais trímeros ligados, unidos por ligações dissulfeto e são muito semelhante à outra importante proteína chamada de lectina de ligação a

manose (MBL) (Figura 7) (GARRED et al., 2010). O domínio semelhante ao colágeno interage com as serina-proteases associadas à MBL, MASP-1, MASP-2, e MASP-3 (Mannose Associated Serine Protease) permitindo assim a ativação do sistema do complemento (MATSUSHITA; FUJITA, 2001; ENDO et al., 2011). Algumas evidências *in vitro* têm sugerido que MASP-2 por si só é suficiente para desencadear a ativação do complemento. As outras serina-proteases (MASP-1 e MASP-3) também estão associadas às ficolinas, no entanto, suas funções ainda são controversas (TAKAHASHI et al., 2008). O arranjo polar dos domínios do fibrinogênio (FBG) permite que as proteínas e os hidratos de carbono se liguem carregado negativamente, tais como N-acetilglicosamina (GlcNAc) e outros compostos acetilados. As ficolinas humanas 1 e 2 são 80% homólogas ao nível dos aminoácidos, enquanto que a ficolina-3 é apenas 48% homóloga com as ficolinas 1 e 2 (GARRED et al., 2009; GARRED, et al., 2010).

A organização estrutural da MBL e das ficolinas pode ser verificada na figura 7. MBL e ficolinas contêm uma região N-terminal curta rica em cisteína seguida por uma região C-terminal de carboidratos semelhante ao colágeno, o domínio de reconhecimento de carboidratos é chamado domínio de ligação (CRD) para MBL e domínio semelhante ao fibrinogênio (FBG) para as ficolinas.

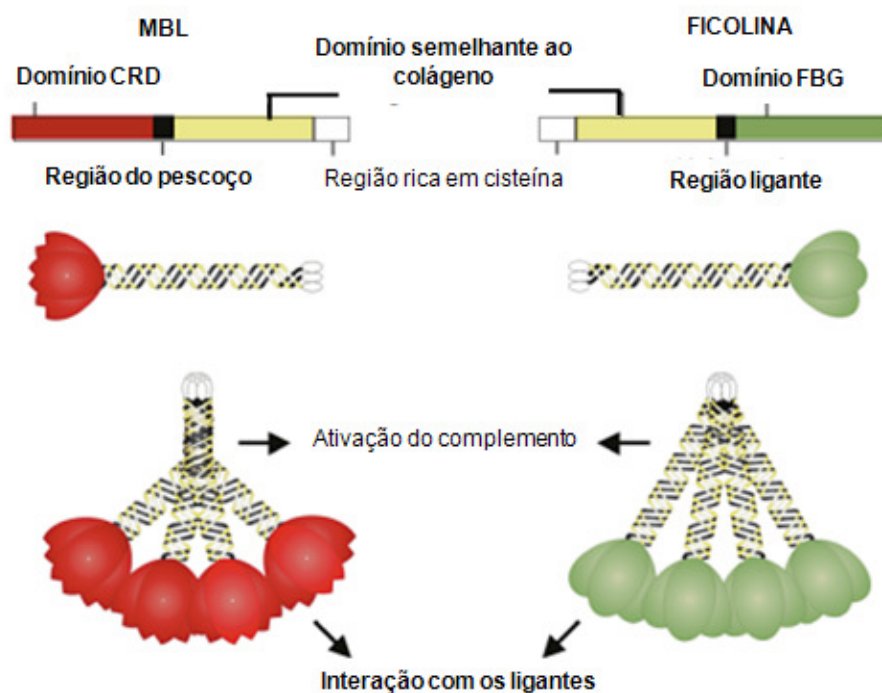


Figura 7: Organização estrutural da MBL e das ficolinas.

Fonte: GARRED et al., 2010

Nos seres humanos, foram identificados três genes que codificam para ficolina: *FCN1*, *FCN2* e *FCN3*, que codificam Ficolina-1, Ficolina-2 e Ficolina-3, respectivamente. *FCN1* e *FCN2* estão ambos localizados no cromossomo 9(9q34), enquanto que *FCN3* é atribuído ao cromossomo 1 (1p36.11). As duas proteínas (ficolina-1 e 2) apresentam uma sequência de aminoácidos idêntica em 80%, e a análise filogenética indica que o gene *FCN2* se origina a partir da duplicação do gene *FCN1* (ENDO et al., 1996; LU et al., 1996). Ficolina-3 tem apenas cerca de 50% de identidade com as outras duas (DAVID et al., 2012).

A organização dos exons de *FCN1* e *FCN2* é semelhante (Figura 5 e 6), embora *FCN1* contenha 9 exons em vez de oito, como encontrado em *FCN2* e *FCN3* (MATSUSHITA et al., 1996; KILPATRICK et al., 1999). O exon 1 de *FCN2* codifica a região 5'UTR, levando o peptídeo a um pequeno segmento ácido N-amino-terminal.

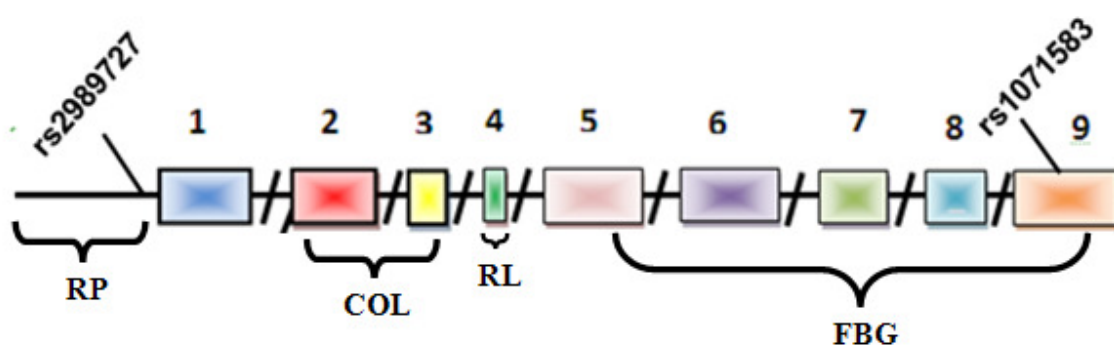


Figura 5: Gene da Ficolina-1 e os polimorfismos de nucleotídeo único analisados nesse estudo.

LEGENDA: RP, região promotora do gene *FCN1*, está identificada pela linha preta horizontal; os exons estão numerados de 1 a 8; os introns estão ilustrados entre os exons; COL., região semelhante ao colágeno; RL, região de ligação; FBG, região semelhante ao fibrinogênio.

FONTE: O autor (2014).

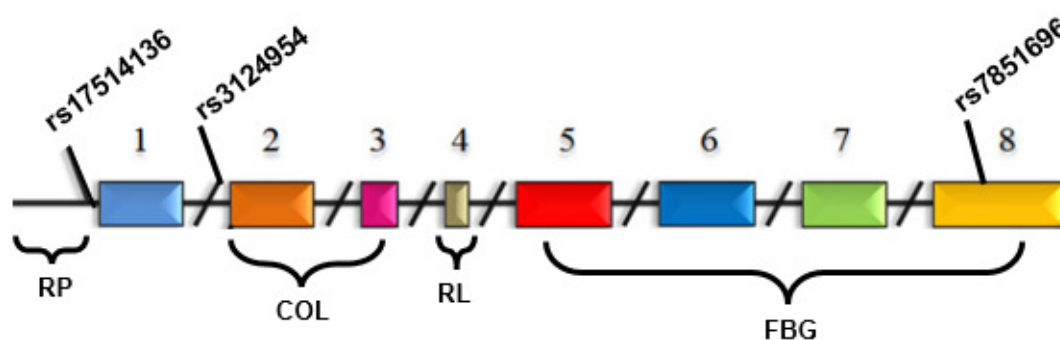


Figura 6: Gene da Ficolina-2 e os polimorfismos de nucleotídeo único, analisados nesse estudo.

LEGENDA: RP, região promotora do gene *FCN2*, está identificada pela linha preta horizontal; os exons estão numerados de 1 a 8; os introns estão ilustrados entre os exons; COL., região semelhante ao colágeno; RL, região de ligação; FBG, região semelhante ao fibrinogênio.

FONTE: O autor (2014).

Os exons 2 e 3 codificam o domínio semelhante ao colágeno. O quarto exon codifica a região de ligação e os exons 5-8 codificam o domínio fibrinogênio (FBG). O último exon também codifica a 3' UTR. O locus do gene *FCN3* é composto por oito exons e compartilha a mesma estrutura gênica como visto para *FCN1* e *FCN2* (ENDO et al., 1996).

2.6.2 Expressão no tecido

A ficolina-1 não é sintetizada pelo fígado como ficolina-2 e 3, mas é capaz de ter uma ativação do complemento semelhante, liga-se a GlcNAc, GalNAc, e ácido siálico e, tal como a ficolina-2, reconhece os grupos acetilados. Embora trabalhos anteriores (MATSUSHITA et al., 1996; LE et al., 1998; MATSUSHITA et al., 2000; MATSUSHITA et al., 2002) tenham demonstrado ficolina-2 e 3 no plasma humano na forma de proteínas solúveis, a presença de ficolina-1 no soro só foi demonstrada recentemente (WITTENBORN et al., 2010). O RNA mensageiro (mRNA) de ficolina-1 é expresso primariamente em leucócitos periféricos (células derivadas de medula óssea), embora uma menor expressão também seja observado no baço e no pulmão (ENDO et al., 1996; LU et al., 1996; HUMMELSHØJ et al., 2008), e é detectado na circulação a uma concentração média de 60,5 ng/ml (HONORE et al., 2008), uma concentração bem menor do que a relatada para ficolina-2 e ficolina-3.

A proteína ficolina-1 pode potencialmente localizar-se nas superfícies de monócitos periféricos e células U937 promonocíticas (TEH et al., 2000). No entanto, já foi relatado que a ficolina-1 foi encontrada em grânulos secretores no citoplasma de neutrófilos e monócitos, e também em células epiteliais alveolares tipo II do pulmão, sugerindo que a ficolina-1 é uma proteína secretora (LIU et al., 2005). Assim, a localização onde a ficolina-1 é expressa permanece controversa. Foi verificado que um anticorpo contra o domínio FBG recombinante de ficolina-1 inibe a fagocitose de *E coli* por células U937, sugerindo que a ficolina-1 atua como um receptor fagocítico de monócitos ou adaptador para reconhecer patógenos (TANIO et al., 2007).

Ficolina-2 é uma proteína oligomérica que consiste em subunidades de 35 kDa (OHASHI et al., 1998; HUMMELSHØJ et al., 2007). Semelhante a C1q e MBL, a estrutura geral de ficolina-2 se assemelha a um "bouquet". Ficolina-2 humana é expressa predominantemente no fígado e está presente na circulação como uma lectina do soro, na concentração média de 4,15 ug/ml (LE et al., 1998) ou 3,3 ug/ml de soro (KILPATRICK et al., 2003).

O mRNA de ficolina-3 é encontrado principalmente no fígado e pulmões. No fígado, a ficolina-3 é produzida pelas células epiteliais do ducto biliar e hepatócitos, e também é secretada para o canal biliar (AIKAWA et al., 1999). No pulmão, ficolina-3 é produzida por células epiteliais ciliadas brônquicas e células epiteliais alveolares tipo II, e é secretada para os brônquios e alvéolos. Ficolina-3 é detectada no soro em concentrações médias de 5,0; 24 ou 26 ug/ml e a um intervalo de 7-23 ng/ml (YAE et al., 1991; KILPATRICK et al., de 2003; MUNTHER-NEBLINA et al., 2008 e SCHLAPBACH et al., 2010).

2.6.3 Variações genéticas das Ficolinas

As variações nas sequências de DNA em um determinado *locus* são chamadas de alelos. A coexistência de múltiplos alelos em um *locus* é conhecida como polimorfismo genético. Um *locus* é definido como polimórfico quando o alelo mais comum não ultrapassar a frequência de 95% na população (HARTL e CLARK, 2010).

Estudos de associação genética são utilizados com o objetivo de identificar loci gênicos que contenham alelos de susceptibilidade a doenças ou que estejam envolvidos com outras

características fenotípicas de interesse. Os cientistas procuram pequenas variações ou polimorfismos no genoma que ocorrem mais frequentemente em pessoas com uma determinada doença do que em pessoas sem a doença. Cada estudo pode analisar centenas ou milhares destes polimorfismos ao mesmo tempo. Habitualmente, neste tipo de análise são utilizados polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) que são a forma de variação mais frequente no Genoma (LILY WANG et al.,2011).

O conhecimento sobre a associação genética entre doenças e Ficolinas é escasso e vem principalmente dos estudos de associação de SNPs (Garred et al.,2010).

2.6.4 Variações do gene *FCNI*

FCNI é um gene polimórfico, e variações genéticas podem ter consequências funcionais, tanto em relação à função quanto na concentração proteica (MUNTHE-FOG et al., 2012). Foi observado um grande número de variantes genéticas relacionadas com diferentes raças no gene *FCNI* (HUMMELSHØJ et al., 2008). Garred et al., 2010 relatou quatro variações nos exons do gene *FCNI* resultando em substituição de aminoácidos: +1435 G>A (dbSNP rs10441778) no exon 2, códon Gly43Asp; +3458 G>A (dbSNP rs56345770) no exon 4, códon Arg93Gln; +7929 G>A (rs56094122) exon 9, códon Trp279Stop; e +8000 G>A (rs56151153) exon 9, códon Gly303Ser. Poucos estudos de associação de polimorfismos no gene *FCNI* foram publicados. VANDER et al., 2007 demonstrou que dois SNPs, uma variante A>G na posição -1981(rs2989727), na região promotora e uma variante A>G na posição +7919 (rs1071583) no exon 9, estão em desequilíbrio de ligação e que são encontrados com maior frequência em pacientes com artrite reumatóide em comparação com os controles.

Outro estudo foi publicado mostrando que crianças prematuras com resultado adverso de enterocolite necrosante tinham níveis significativamente menores de ficolina-1 do que os sobreviventes (SCHLAPBACH et al., 2009). Além disso, os recém-nascidos que tinham níveis séricos baixo da proteína necessitavam de ventilação assistida mais frequente do que aquelas com níveis elevados (GARRED et al., 2010).

2.6.5 Variações do gene *FCN2*

SNPs no gene *FCN2* têm sido estudados em diferentes populações e demonstrou-se que os SNPs situados na região promotora deste gene nas posições -986G>A (dbSNPrs3124952), -602G>A (dbSNPrs3124953), -4A>G (dbSNPrs17514136), foram significativamente associados com a variação da concentração sérica da ficolina-2 contribuindo para a suscetibilidade de muitas doenças infecciosas (CHEN et al., 2006; HERPES et al., 2006; CEDZYNSKI et al., 2007; MUNTHE-FOG et al., 2007; MESSIAS-REASON et al., 2009; RUSKAMP et al., 2009). Adicionalmente, estudos revelam que a presença de polimorfismos localizados no exon 8 conduzindo a substituições de aminoácidos dentro do domínio do tipo fibrinogênio (+6359 e +6424), estão associados com o aumento ou a diminuição da capacidade de ligação de hidratos de carbono (HUMMELSHØJ et al., 2005; MUNTHE-FOG et al., 2007; CEDZYŃSKI et al., 2007), como este domínio é responsável pela ligação da ficolina-2, estes polimorfismos de codificação poderiam alterar a afinidade da proteína para os seus substratos e, possivelmente, alterar a capacidade da ficolina-2 de reconhecer microrganismos invasores (HERPES et al., 2006).

Níveis séricos baixos de ficolina-2 e polimorfismos do gene *FCN2* já foram associados à doenças como infecções respiratórias em crianças e doença pneumocócica invasiva em adultos (ATKINSON et al., 2004; RUSKAMP et al., 2009).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Grupo de estudo

De acordo com o projeto intitulado “Polimorfismos genéticos nos genes das ficolinas-1 e 2 em crianças e adolescentes com diabetes *mellitus* tipo 1”, previamente aprovado pelo Comitê de Ética local (Instituto de Medicina Integral Professor Fernando Figueira, número 1717/2010), as coletas de sangue foram realizadas em 204 pacientes com idade média 13,5 anos, atendidas no Ambulatório de três serviços de referência em endocrinologia pediátrica de Pernambuco, Brasil (Instituto de Medicina Integral Professor Fernando Figueira - IMIP, Hospital da Restauração - HR e Hospital das Clínicas – HC-UFPE), no período de março de 2010 à dezembro de 2013, diagnosticadas com diabetes *mellitus* tipo 1 (DM1) de acordo com os critérios clínicos da Associação Americana de diabetes (American Diabetes Association, 2012).

O grupo controle foi constituído por 193 indivíduos saudáveis com idade média 30 anos, sem histórico familiar de DM1 ou de outras doenças autoimunes, baseada no fato de que a maioria dos indivíduos portadores de DM1 desenvolve a doença ainda na primeira infância. Todos foram provenientes da mesma região geográfica dos pacientes. Um consentimento livre esclarecido foi obtido de todos os indivíduos incluídos neste estudo

3.2 Extração de DNA genômico

Após a coleta de aproximadamente 5 ml de sangue venoso em frascos contendo etilenodiamino tetra-acético (EDTA) por indivíduo, as amostras foram encaminhadas ao Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami da Universidade Federal de Pernambuco (LIKA/UFPE). O DNA genômico foi isolado a partir das células do sangue periférico, de cada paciente e indivíduo controle seguindo as instruções do fabricante do Kit de extração de DNA *Wizard Genomic Purification Kit* (PROMEGA).

3.3 Diagnóstico de Tireoidite autoimune e Doença celíaca

O diagnóstico dos anticorpos para tireoperoxidase (Anti- TPO) foram realizados por quimioluminescência (Immulite anti-TPO Ab, Produtos de diagnóstico Co, Los Angeles, EUA). Pacientes com anti- TPO positivo (título superior a 35 UI / ml, de acordo com a sugestão do fabricante) foram considerados como pacientes portadores de tireoidite, considerados em nosso estudo como AITD+.

Os anticorpos anti -transglutaminase (anti - tTG) foram determinados usando o kit de ELISA Eu- tTG (Eurospital, Trieste, Itália), de acordo com as instruções do fabricante. Os pacientes que apresentaram 10 UA (unidades de absorvância) de anticorpos anti - tTG foram considerados positivos para doença celíaca e, subsequentemente, foram rastreados para a presença dos haplótipos HLA DQ2 e / ou DQ8 utilizando o kit de Eu- DQ (Eurospital, Trieste, Itália). Após uma dieta livre de glúten, auto anticorpos tTG de todos os pacientes com DC diminuíram e permaneceram sob o valor de corte (7 UA).

3.4 Estratificação dos pacientes

Como pacientes com DM1 são conhecidos por terem um risco maior de desenvolverem outras doenças autoimunes, esses indivíduos também foram analisados pela presença dessas outras patologias. Sendo assim, pacientes com DM1 diagnosticados apenas com Tireoidite autoimune (AITD+) e sem a presença de Doença celíaca (DC-) foram classificados com a sigla DM1+AITD+DC-. Aqueles diagnosticados apenas com Doença celíaca e sem Tireoidite autoimune foram classificados como DM1+AITD-DC+. Os que apresentaram as três doenças foram os DM1+AITD+DC+, enquanto que os diagnosticados apenas com diabetes tipo 1, foram classificados como DM1+AITD-DC-. Dessa maneira, os grupos estratificados foram dispostos nas tabelas dos resultados com suas respectivas siglas.

3.5 Genotipagem dos indivíduos e construção de haplótipos

3.5.1 Seleção dos polimorfismos

Foi feita uma busca através da literatura e nos bancos de dados do *National Center Biotechnology Information* (NCBI), para a seleção dos polimorfismos candidatos, com frequência do alelo minoritário (MAF) de pelo menos 5% nas populações caucasianas (CEU) e afrodescendente (YRI).

3.5.2 Gene *FCN*

Após busca na literatura foram selecionados cinco SNPs, o -1981 (rs2989727) e 7919 (rs1071583), localizado na região promotora e no exon 9 do gene *FCN1*, respectivamente, e os SNPs -4 (rs17514136), 5839 (rs3124954) e 6424 (rs7851696) localizado na 5'UTR, íntron 1 e exon 8 do gene *FCN2*. A genotipagem dos SNPs foi realizada utilizando sondas alelo específica fluorescente (TaqMan®, Life). Os rs2989727 e rs1071583, por C_26745032_10 e C_1819018_1_, respectivamente, e 17514136, rs3124954 e rs7851696, por C_25765134_10, C_27462209_20 e C_29220549_20), com base no protocolo do fabricante, e as amostras foram corridas utilizando a plataforma em tempo real ABI-7500 (Life Technologies). O desequilíbrio de ligação e os haplótipos foram computados usando o Haploview 4.2 e o SNPstats ([http://bioinfo.iconcologia.net/SNP stats](http://bioinfo.iconcologia.net/SNP_stats)).

3.6 Métodos Estatísticos

Para avaliar o equilíbrio de Hardy-Weinberg, realizar o teste exato de Fisher, bem como calcular as frequências alélicas e genotípicas dos grupos em estudo, foi utilizado o programa R (2005; version 2.1.1; <http://www.r-project.org/>). Com esses testes avaliamos também a susceptibilidade do DM1 com a presença de outras doenças autoimunes. Odds Ratio (OR) foi calculado, considerando 95% de intervalo de confiança (IC). Em todas as análises, $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes.

Discriminação alélica foi realizada tal como sugerida pelo fabricante (TaqMan Software genotipagem), e analisadas com o software Genotipagem Transposer. Usando o pacote estatístico R (www.r-project.org), obteve-se o teste qui-quadrado para correlacionar a distribuição do polimorfismo com a susceptibilidade para desenvolver DM1 e suas características clínicas, bem como avaliar o equilíbrio de Hardy-Weinberg. O desequilíbrio de ligação dentro dos SNPs *FCN1* e *FCN2* e a construção dos haplótipos, foram avaliados utilizando os softwares Haploview 4.2 e o SNPstats ([http://bioinfo.iconcologia.net/SNP stats](http://bioinfo.iconcologia.net/SNP_stats)).

A associação com a idade de início de diagnóstico do DM1 foi realizada utilizando o pacote SNPAssoc, implementado em software estatístico R (versão 3.0.0, <http://www.r-project.org>).

4 RESULTADOS

Todos os resultados obtidos no presente trabalho estão detalhados no apêndice A.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

As ficolinas representam os membros mais jovens da família complemento e, como tal, ainda há muitas incertezas, particularmente no que diz respeito às suas funções nas doenças. Fortes evidências indicam que estão envolvidas na fisiopatologia de muitas doenças infecciosas, inflamatórias e autoimunes, embora a literatura neste campo ainda seja rudimentar, várias linhas de evidência sugerem que polimorfismos ou haplótipos nos genes *FCN1* e *FCN2* podem estar associados com diferentes doenças. Apesar disso, não foi evidenciada associação entre as frequências alélicas e genotípicas, entre os grupos dos pacientes e controles, para os SNPs estudados nesse trabalho, bem como com a insurgência de desordem autoimune (DC e AITD) nestes pacientes. Contudo, o SNP rs1071583 foi correlacionado com o uma idade mais precoce do diagnóstico. Além disso, os SNPs combinados rs2989727 e rs1071583 estavam envolvidos com a proteção ao DM1. O número reduzido de indivíduos analisados, bem como a estratificação populacional podem ter sido fatores que contribuíram para que o presente estudo tenha produzido resultados divergentes dos já observados na literatura. Estudos tanto de réplica genética como funcionais e imunológicos devem ser feito para aumentar o nosso conhecimento sobre os genes FCNs no desenvolvimento de DM1.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, A.; LICHTMAN, A.; PILLAI, S. *Imunologia Celular e Molecular*. 6ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008.
- ABIRU, N; KAWASAKI, E; EGUCHI, K. Current knowledge of Japanese type 1 diabetic syndrome. **Diabetes metab.** v 18, p 357–66, 2002.
- ACHENBACH P; BONIFACIO E; ZIEGLER A. G. Predicting type 1 diabetes. **Curr Diabetes.** v5, p 98–103, 2005.
- AKAIWA, M. *et al.* Hakata antigen, a new member of the ficolin/opsonin p35 family, is a novel human lectin secreted into bronchus/alveolus and bile. **J Histochem Cytochem**, v. 47, n. 6, p. 777-86, jun 1999.
- AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. **Diabetes care**, v 35, p 64–71, 2012.
- AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. **Diabetes Care**, 37Suppl 1:S81-S90, Jan 2014.
- ANAYA J. M; ROJAS-VILLARRAGA A; GARCÍA-CARRASCO M. The autoimmune tautology: from polyautoimmunity and familial autoimmunity to the autoimmune genes. **Autoimmune Dis.** p:297-193, 2012.
- ANAYA, J. M. The autoimmune tautology. **Arthritis Res. Ther.** v 12, n 6, p 147, 2010
- ANDERSON, M. S. Update in Endocrine Autoimmunity. **J Clin Endocrinol Metab.** v 93, n 10, p 3663–3670. Oct 2008.
- ARAÚJO, J.*et al.*, Mannose binding lectin gene polymorphisms and associated auto-immune diseases in type 1 diabetes Brazilian patients. **Clin Immunol.** v 131, n 2, p 254-9, May. 2009.
- ATKINSON, M. A; EISENBARTH G. S. Type 1 diabetes: new perspectives on disease pathogenesis and treatment **Lancet.** v 21; n 358, p 9277-:221-9. Jul. 2001.
- ATKINSON, M. A, EISENBARTH, G. S., E MICHELS, A. W. Type 1 diabetes. **Lancet** v 383, n 9911, p 69-82, jan 2014.
- BALDA C. A; PACHECO-SILVA A. Rev. Aspectos imunológicos do diabetes melito tipo 1. *Assoc. Med. Bras.* v.45 n.2 São Paulo Apr./June 1999.
- BETTERLE C; LAZZAROTTO F; PRESOTTO F. Autoimmune polyglandular syndrome Type 2: the tip of an iceberg? **Clin Exp Immunol.** v 137, n 2, p :225-33, Aug . 2004
- BINGLEY P. J; WILLIAMS A. J; GALE E. A. Optimized autoantibody-based risk assessment in family members. Implications for future intervention trials. **Diabetes Care.**;v 22, p 1796–801, 1999.
- BLUESTONE J. A; HEROLD K; EISENBARTH G. Genetics, pathogenesis and clinical interventions in type 1 diabetes. **Nature.** v 29; n 464, p 1293- 7293 300, Apr. 2010

BRADLEY, D T.; ZIPFEL P.F.; HUGHES A. E. Complement in age-related macular degeneration: a focus on function. **Eye (Lond)**. v 25, n 6, p 683–693, Jun 2011.

BRESSON, D. *et al.* Anti-CD3 and nasal proinsulin combination therapy enhances remission from recent-onset autoimmune diabetes by inducing Tregs. **J Clin Invest**, v. 116, p. 1371–1381, 2006.

BRESSON, D. *et al.* Genetic-induced Variations in the GAD65 T-cell Repertoire Governs Efficacy of Anti-CD3/GAD65 Combination Therapy in New-onset Type 1 Diabetes. **Mol Therap**, v. 18, n. 2, p. 307–316, 2010.

BUBECK, D. *et al.* Structure of Human Complement C8, a Precursor to Membrane Attack **J Mol Biol**. v 405, n 2-2, p 325–330, Jan 14, 2011.

CARROLL, M. C.; HOLERS, V. M. Innate autoimmunity. **Adv Immunol**. v 86, p 137–57, 2005.

CEDZYNSKI, M, *et al.* Extremes of L-ficolin concentration in children with recurrent infections are associated with single nucleotide polymorphisms in the FCN2 gene. **Clin Exp Immunol**, v. 150, p. 99–104, 2007.

CERNEA, S.; BUZZETTI, R.; POZZILLI, P. β -Cell Protection and Therapy for Latent Autoimmune Diabetes in Adults. **Diabetes Care**. v 32, Suppl 2, S246–S252, Nov 2009.

CHAPLIN, D. D. Overview of the Immune Response **J Allergy Clin Immunol**. v 125, n 2 Suppl 2, S3–23, Feb 2010.

CRUVINEL, W M. *et al.* Immune system - part I. Fundamentals of innate immunity with emphasis on molecular and cellular mechanisms of inflammatory response. **Rev Bras Reumatol**. v 50, n 4, p 434–61, Jul-Aug. 2010.

DAHL, M. R. *et al.* MASP-3 and its association with distinct complexes of the mannan-binding lectin complement activation pathway. **Immunity**. v 15, n 1, p 127–35, Jul 2001.

DEGN, S. E.; JENSENIUS, J. C. THIEL, S. Disease-Causing Mutations in Genes of the Complement System. **Am J Hum Genet**, v 88, n 6, p 689–705, jun 2010.

DIAMOND PROJECT GROUP. Incidence and trends of childhood Type 1 diabetes world wide 1990–1999. **Diabet Med** v 23, n 8, p 857–866, Aug 2006.

DIANA, J, *et al.* Innate immunity in type 1 diabetes. **Discov Med**. v 11, n 61, p 513–20, Jun 2011.

DIRETRIZES SBD 2013–2014 Copyright © by SBD – **Sociedade Brasileira de Diabetes**. 2014.

DUNKELBERGER, J. R.; SONG, W. C. Complement and its role in innate and adaptive immune responses. **Cell Res**. v 20, n 1, p 34–50, Jan 2010.

ENDO, Y. *et al.* Cloning and characterization of the human lectin P35 gene and its related gene. **Genomics**. v 36 n 3 p 515–21, 15 Sep 1996.

ENDO, Y.; MATSUSHITA, M; FUJITA, T. The role of ficolins in the lectin pathway of innate immunity. **Int J Biochem Cell Biol**. v 43, n 5, p 705–12, May 2011.

EURODIAB ACE STUDY GROUP. Variation and trends in incidence of childhood diabetes in Europe. **Lancet** v 355, n 9207, p 873-876, Mar 2000.

FIGUEROA, J. E; DENSEN, P. Infectious diseases associated with complement deficiencies. **Clin Microbiol Rev.**v4, n 3, p 359–395, Jul 1991.

FOURATI, H, *et al.* Non-HLA autoimmunity genetic factors contributing to Autoimmune Polyglandular Syndrome type II in Tunisian patients. **Hum Immunol.** v 73, n 7, p 740-6, 2012.

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

GARRED, P. *et al.* MBL2, FCN1, FCN2 and FCN3—The genes behind the initiation of the lectin pathway of complement. **Molecular Immunology**, v. 46, p. 2737-2744, 2009.

GARRED, P. *et al.* Susceptibility to HIV infection and progression of AIDS in relation to variant alleles of mannose-binding lectin. **Lancet**, v 349, n 9047, p 236-40, 25 Jan 1997.

GARRED, P. *et al.* The genetics of ficolins. **J Innate Immun**, v. 2, n 1 p. 3-16, 2010.

GONZALES, S. *et al.* Aspects of self and non self discrimination. **Auto non self**, v 2 n 1, p 19-25, Jan 2011.

HART, M. L. *et al.* Gastrointestinal ischemia-reperfusion injury is lectin complement pathway dependent without involving C1q. **J Immunol.** v 174, n 10, p 6373-80, 15 May 2005.

HARTL, D. L.; CLARK A. G. Princípios de genética de populações. 4. ed. Porto Alegre: **Artmed**, p 660, 2010.

HOFFMAN, R. P. Practical management of type 1 diabetes mellitus in adolescent patients: challenges and goals. **Treatments in endocrinology**, v. 3, n. 1, p. 27-39, jan. 2004.

HONORÉ, C. *et al.* The innate pattern recognition molecule Ficolin-1 is secreted by monocytes/macrophages and is circulating in human plasma. **Mol Immunol.** v 45, n 10, p 2782-9, May 2008.

HUMMELSHOJ, T. *et al.* Comparative study of the human ficolins reveals unique features of Ficolin-3 (Hakata antigen). **Mol Immunol**, v 45 P 1623–1632, 2008.

HUMMELSHOJ, T. *et al.* Molecular organization of human Ficolin-2. **MolImmunol**, v 44, p 401–411, 2007.

HUMMELSHOJ, T. *et al.* Polymorphisms in the FCN2 gene determine serum variation and function of Ficolin-2. **Hum Mol Genet**, v. 14, n. 12, p. 14–15, 2014.

INABA S. *et al.* Serological studies of an SLE-associated antigen-antibody system discovered as a precipitation reaction in agarose gel: the HAKATA antigen-antibody system. **Fukuoka Igaku Zasshi**, v 81, p 284–291, 1990.

INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION. *IDF Diabetes Atlas, 6ed* Bruxelas, Bélgica: Federação Internacional de Diabetes, 2013.

INTERNATIONAL EXPERT COMMITTEE Report on the Role of the A1C Assay in the Diagnosis of Diabetes. **Diabetes Care**, v 32, n 7, p 1327–1334, Jul 2009.

JEKER, L. T.; BOUR-JORDAN, H; BLUESTONE, J. A. Breakdown in Peripheral Tolerance in Type 1 Diabetes in Mice and Humans. **Cold Spring Harb Perspect Med**. v 2, n 3, p 007807, Mar. 2012

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

KILPATRICK, D. C. Mannan-binding lectin: clinical significance and applications. **Biochim Biophys Acta**.v 1572, n 2-3, p 401-13, 19 Sep 2002.

KILPATRICK, D. C. *et al.* No strong relation ship between mannan binding lectin or plasma ficolins and chemotherapy-related infections. **Clin Exp Immunol**. v 134, n 2, p 279-84, Nov 2003.

KILPATRICK, D. C.; CHALMERS, J. D. Human L-Ficolin (Ficolin-2) and Its Clinical Significance **J Biomed Biotechnol**.v 138, p 797, 2012:

KNIP, M; SIMELL, O. Environmental Triggers of Type 1 Diabetes. **Cold Spring Harb Perspect Med**. v 2, n 7, p 007690, Jul 2012.

LAMBRIS, J.D.; RICKLIN, D.; GEISBRECHT, B. V. Complement evasion by human pathogens. **Nat Rev Microbiol**. V 6, n 2, p 132, Feb 2008.

LE Y. *et al.* HumanL-ficolin: plasmalevels, sugarspecificity, and assignment of its lectinactivity to the fibrinogen-like (FBG) domain. **FEBS Lett**.v 425, n 2, p 367-70, 27 Mar 1998

LEHUEN, A. *et al.* Immune cell crosstalkintype 1 diabetes. **Nat Rev Immunol**. v 10, n 7. p 501-13, Jul 2010.

LIU, Y. *et al.* Human M-ficolin is a secretory protein that activates the lectin complement pathway. **J Immunol**. v 175, n 5, p 3150-6, 1 Sep 2005.

LU, J. *et al.* Human ficolin: cDNA cloning, demonstration of peripheral blood leucocytes as the major site of synthesis and assignment of the gene to chromosome 9. **Biochem J**. v 313, n Pt 2, p 473-8, 1996, 15 Jan 1996.

MASTELLOS, D.; LAMBRIS, J, D. Cross-disciplinary research stirs new challenges into the study of the structure, function and systems biology of complement. **Adv Exp Med Biol**. v 586, p 1-16. 2006

MATSUSHITA, M. *et al.* A novel human serum lectin with collagen- and fibrinogen-like domains that functions as an opsonin. **Journal of Biological Chemistry**.v271, n 5 p 2448–2454. 1996.

MATSUSHITA, M. *et al.* Activation of the lectin complement pathway by H-ficolin (Hakata antigen), **J Immunol**.v 168, n 7, p 3502-6,1 Apr 2002.

MATSUSHITA, M. Ficolins: complement-activating lectins involved in innate immunity. **J Innate Immun**. v 2 n 1, p 24-32. 2010.

MATSUSHITA, M.; ENDO, Y.; FUJITA, T. Cutting edge: complement-activating complex of ficolin and mannose-binding lectin-associated serine protease. **Journal of Immunology**. v164, n 5, p 2281–2284. 1 Mar 2000.

MATSUSHITA, M.; FUJITA, T. Ficolins and the lectin complement pathway. **Immunol Rev**. v 180, p 78-85. Apr. 2001.

MØLLER-KRISTENSEN, M. *et al.* Mannan-binding lectin recognizes structures on ischaemicreperfused mouse kidneys and is implicated in tissue injury. **Scand J Immunol**. v 6, n 5, p.426-34. May 2005.

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

MUNTHE-FOG, L. *et al.* The impact of FCN2 polymorphisms and haplotypes on the Ficolin-2 serum levels. **Scand J Immunol**, v. 65, n. 4, p. 383–92, abr. 2007.

MURPHY, K.; TRAVERS, P.; WALPORT, M. Falhas nos mecanismos de defesa do hospedeiro. In: MURPHY, K.; TRAVERS, P.; WALPORT, M. **Imunobiologia de Janeway**, Porto Alegre: Artmed, p. 495-544, 2010b.

MURPHY, K.; TRAVERS, P.; WALPORT, M. O sistema complemento e a imunidade inata. In: MURPHY, K.; TRAVERS, P.; WALPORT, M. **Imunobiologia de Janeway**, Porto Alegre: Artmed, p. 61-81, 2010a.

NARENDRAN, P.; ESTELLA, E.; FOURLANOS, S. Immunology of type 1 diabetes **Q J Med**; v. 98, p. 547–56, 2005.

NETH, O. *et al.* Deficiency of mannose-binding lectin and burden of infection in children with malignancy: a prospective study. **Lancet**, v 358, n 9282,;p 614-8, 25 Aug 2001.

NG, P. M. *et al.* C-reactive protein collaborates with plasma lectins to boost immune **EMBO J**, v 26, n 14, p 3431-40. 25 Jul 2007.

NICHOLAS J. *et al.* L-ficolin specifically binds to lipoteichoic acid, a cell wall constituent of Gram-positive bacteria, and activates the lectin pathway of complement. **J Immunol**, v 172, n 2, p 1198-202. 15 Jan 2004.

NOBLE, J. A, ERLICH, H. A. Genetics of type 1 diabetes. **Cold Spring Harb Perspect Med**. v.2(1), Jan 2012: a 007732.

NORIS, M.; REMUZZI G. Overview of Complement Activation and Regulation **Semin Nephrol**. v 33, n 6, p 479–492. Nov 2013

PALMER J. P. *et al.* C-peptide is the appropriate outcome measure for type 1 diabetes clinical trials to preserve beta-cell function: report of an ADA workshop, 21-22 October 2001. **Diabetes**.v 53, p 250–264, 2004.

QUEIROZ, M. S. Type 1 diabetes and autoimmune polyendocrine syndromes. **Arquivos brasileiros de endocrinologia e metabologia**, v. 52, n. 2, p. 198-204, mar. 2008.

QU, H.; RICKLIN, D.; LAMBRIS, J. D. Recent developments in low molecular weight complement inhibitors. **Mol Immunol**. v 47, n 2-3, p 185-95, Dec 2009.

REWERS, M. Challenges in Diagnosing Type 1 Diabetes in Different Populations. **Diabetes Metab J.** v 36, n 2, p 90–97, Apr 2012.

REWERS, M.; KLINGENSMITH, G. J. Prevention of type 1 diabetes. **Diabetes Spectr.** v 10, p 282-92, 1997.

ROJAS-VILLARRAGA, A. *et al.* Introducing Polyautoimmunity: Secondary Autoimmune Diseases No Longer Exist. **Autoimmune Dis**, p. 254-.319, 2012.

SCHLAPBACH, L. J. *et al.* M-ficolin in the neonatal period: Associations with need for mechanical ventilation and mortality in premature infants with necrotizing enterocolitis. **Mol Immunol.** v 46, p 2597–2603, . Aug 2009.

SCHWAEBLE, W. *et al.* The mannan-binding lectin-associated serine proteases (MASPs) and MAp19: four components of the lectin pathway activation complex encoded by two genes. **Immunobiology.** v 205, n 4-5,;p 455-66, Sep 2002.

STENGAARD-PEDERSEN, K. *et al.* Inherited deficiency of mannan-bindinglectin-associated serine protease 2. **N Engl J Med**, v. 349, n. 6, p. 554-60, ago 2003.

SUMIYA, M. *et al.* Molecular basis of opsonic defect in immunodeficientchildren. **Lancet**, v 337, n 8757, p 1569-70. 29 Jun 1991.

SUTHERLAND, A. P. *et al.* Interleukin-21 Is Required for the Development of Type 1 Diabetes in NOD Mice. **Diabetes**, v 58, p. 1144-1155, 2009.

TAKAHASHI, M. *et al.* Mannose-binding lectin (MBL)-associated serine protease (MASP)-1 contributes to activation of the lectin complement pathway. **J Immunol.** v 180, n 9, p 6132-8. May 2008.

TANIO, M. *et al.* Trivalent recognition unit of innate immunity system: crystal structure of trimeric human M-ficolin fibrinogen-like domain. **J Biol Chem.** v 282, n 6, p 3889-95,9 Feb 2007.

TAYLOR, M. *et al.* Additional Autoimmune Disease Found in 33% of Patients at Type 1 Diabetes Onset, **Diabetes Care.** v 34, n 5, p 1211–1213, May 2011.

THE, C. *et al.* M-ficolin is expressed on monocytes and is a lectin binding to N-acetyl-D-glucosamine and mediates monocyte adhesion and phagocytosis of Escherichia coli. **Immunology.** v 101, n 2, p 225-32, Oct 2000.

TURNER, M. W. Mannose-binding lectin: the pluripotent molecule of the innate immune system. **Immunol Today.** v 17, n 11, p 532-40, Nov 1996.

VAN DEN DRIESSCHE, A. *et al.* Type 1 diabetes and autoimmune polyglandular syndrome: a clinical review, **Neth J Med.** v 67, n 11, p 376-87, Dec 2009.

VANDER, C. B. *et al.* Polymorphisms in the fcolin 1 gene (FCN1) are associated with susceptibility to the development of rheumatoid arthritis. **Rheumatology (Oxford)** v 46, p 1792–1795, 2007.

VARDANYAN, M. *et al.* Pancreas vs. islet transplantation: a call on the future. **Curr Opin Organ Transplant.** v15, n 1, p 124–130, 2010.

WAGNER, E.; FRANK, M. M. Therapeutic potential of complement modulation. **Nat Rev Drug Discov.** v 9, n 1, p 43-56, Jan 2010.

WALSH, M. C. *et al.* Mannose-binding lectin is a regulator of inflammation that accompanies myocardial ischemia and reperfusion injury. **J Immunol.** v 175, n 1, p 541-6, 1 Jul 2005.

WANG, L. *et al* Gene set analysis of genome-wide association studies: methodological issues and perspectives. **Genomics.** v 98, n 1, p 10.1016, Jul 2011.

WENZLAU, J. M. *et al.* The cation efflux transporter ZnT8 (Slc30A8) is a major autoantigen in human type 1 diabetes. **Proc Natl Acad Sci US A.** 2007; 104: 17040–17045.

WINTER, W.E.; Harris, N.; Schatz, D. Type 1 Diabetes Islet Autoantibody Markers. **Diabetes Technology & Therapeutics.** v 4, p 817-838, 2002.

WITTENBORN, T. *et al.* Characteristics and biological variations of M-ficolin, a pattern recognition molecule, in plasma. **J Innate Immun.** v 2, n 2, p167–180, 2010.

ZHANG XL, ALI MA. Ficolins: structure, function and associated diseases. **Adv Exp Med Biol.** v 15, n105, p632, 2008.

APÊNDICE A – Polymorphism in ficolin-1 (*FCNI*) gene is associated with an earlier onset of Type 1 Diabetes Mellitus in children and adolescents from northeastern Brazil.

Manuscrito submetido à revista Journal of Genetics (Fator de impacto: 1.013)

Autores

Zilma Pereira dos Anjos^a; Manuella Maria Silva Santos^b; Natassia Javorski Rodrigues^c; Glaucia Alyne Nunes de Lacerda^c; Jaqueline Araujo^d; Jaqueline de Azevêdo Silva^c; Nathália de Alencar Cunha Tavares^c; Rafael Lima Guimarães^{b, c}; Sergio Crovella^{b, c, *}; Lucas André Cavalcanti Brandão^{a, c}

Filiação:

^aDepartment of Pathology, Federal University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil.

^bDepartment of Genetics, Federal University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil.

^cKeizo Asami Immunopathology Laboratory (LIKA), Federal University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil

^dPediatric Endocrinology Unity of Clinical Hospital, Federal University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil

*Corresponding author. Av. Prof. Moraes Rego, S/N, Cidade Universitária. Zip Code: 50670-901. Recife, Pernambuco, Brazil. Phone: +55 8121268484 and fax: +55 8121268485. www.ufpe.br/lik

E-mail address: croveller@gmail.com

Polymorphism in ficolin-1 (*FCNI*) gene is associated with an earlier onset of Type 1 Diabetes Mellitus in children and adolescents from northeastern Brazil.

Zilma Pereira dos Anjos^a; Manuella Maria Silva Santos^b; Natassia Javorski Rodrigues^c; Glaucia Alyne Nunes de Lacerda^c; Jaqueline Araujo^d; Jaqueline de Azevêdo Silva^c; Nathália de Alencar Cunha Tavares^c; Rafael Lima Guimarães^{b, c}; Sergio Crovella^{b, c, *}; Lucas André Cavalcanti Brandão^{a, c}

^aDepartment of Pathology, Federal University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil.

^bDepartment of Genetics, Federal University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil.

^cKeizo Asami Immunopathology Laboratory (LIKA), Federal University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil

^dPediatric Endocrinology Unity of Clinical Hospital, Federal University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil

*Corresponding author. Av. Prof. Moraes Rego, S/N, Cidade Universitária. Zip Code: 50670-901. Recife, Pernambuco, Brazil. Phone: +55 8121268484 and fax: +55 8121268485. www.ufpe.br/lika

E-mail address: crovelser@gmail.com

Abstract

Ficolins are innate immune proteins able to activate the complement system by the lectin pathway. Single nucleotide polymorphisms (SNPs) of *FCNI* and *FCN2* genes, encoding for ficolin 1 and 2, have been related with susceptibility to infectious and autoimmune diseases. Our study aims at investigating the association between *FCNI* and *FCN2* functional or tagSNPs and the development of type 1 diabetes mellitus (T1D). Two SNPs at *FCNI*, rs2989727 and rs1071583 and three at *FCN2*, rs17514136, rs3124954 and rs7851696 were studied in 204 children diagnosed with T1D and 193 healthy individuals all from North East Brazil. No direct associations were found with the T1D onset or with the insurgence of T1D related celiac disease (CD) and autoimmune thyroiditis (AIDT). However,

the genotype T/T (rs1071583) of *FCNI* was associated with an early age at T1D diagnosis compared with C/C or C/T genotypes ($p= 0.05$), around two years of difference. Thus, we hypothesize that the T/T genotype (rs1071583) is not directly involved in the initial steps of T1D onset, but, after the trigger inducing T1D, individuals carrying this genotype could increase/accelerate the pancreatic autoimmune response. Despite our results indicate some importance of *FCNI* in the context of T1D, additional replica studies should be performed to clarify the role of ficolins in T1D.

Keywords: Type 1 Diabetes, Ficolins, Autoimmunity, SNP, Complement System.

Introduction

The Lectin Pathway of Complement System acts in the elimination of pathogens, being able to phagocyte and induce inflammation response. The lectin pathway is activated by two different lectins, the mannose binding lectin (MBL) and ficolins. The carbohydrates recognition domain (CRD) of both lectins are responsible to scan molecules present at the surface of pathogens as well as of anomalous and apoptotic cells in order to activate inflammation response by the complement cascade or promote the phagocytosis by opsonization of these cells (Runza *et al.* 2008). Three humans ficolins were described: M-ficolin (ficolin-1), L-ficolin (ficolin-2) and H-ficolin (ficolin-3), encoded by the *FCNI*, *FCN2* and *FCN3* genes, respectively (Messias-Reason *et al.* 2009b; Hu *et al.* 2013). Even if *FCNI* and *FCN2* genes are located at the same chromosome region, 9q34, they present a differential expression pattern. *FCNI* is mainly expressed by leukocytes in intracellular secretory granules and is secreted in the interstitium and plasma. *FCN2* is expressed in liver's cells and ficolin-2 protein once produced is secreted in the plasma (Garred *et al.* 2009).

Several studies suggested the role of ficolins and MBL in the development of autoimmune disorders due to their ability to promote the apoptotic bodies' clearance, to increase the inflammation and to avoid viral infection (Messias-Reason *et al.* 2009a; Atkinson *et al.* 2004; Vander Cruyssen *et al.* 2007). Previous findings from our research group described the influence of *MBL2* gene functional single nucleotide polymorphisms (SNP) in the onset of type 1 diabetes (T1D) and other autoimmune disorders, namely celiac disease (CD) and autoimmune thyroiditis (AIDT), in childhood and adolescence in a population from the State of Pernambuco, Brazil (Araujo *et al.* 2009).

In this work we have extended our investigations to assess the possible influence of *FCN1* and *FNC2* functional SNPs in T1D development and the insurgence of related CD and AITD. Our hypothesis is that decrease in ficolins production/function in interstitium or plasma, related to the presence of such SNPs, located at regulatory region of *FCN1* and *FCN2* genes, may be responsible for apoptotic bodies' accumulation with a future autoimmune response in pancreatic tissues. Moreover, these SNPs in *FCN1* and 2 could be involved with the autoantibody production in the autoimmune thyroiditis and celiac disease in T1D patients.

Material and Methods

Patients and healthy individuals

The study was carried out at three pediatric endocrinology reference services in Pernambuco, Brazil (Instituto de Medicina Integral Professor Fernando Figueira, Hospital da Restauração e Hospital das Clínicas), from March of 2010 to December 2013. Children and adolescents were diagnosis with T1D according to American Diabetes Association criteria (2012). Patients enrolled in the study that accepted to participate assigned a written free and informed consent. The project was approved by the local ethics committee (Instituto de Medicina Integral Professor Fernando Figueira, number 1717/2010).

In this study, 204 T1D subjects (median age 13.5 years) diagnosed with T1D were enrolled as patients group. 193 healthy individuals (median age 30 years) were recruited, as healthy individuals, without clinical signs or family history of T1D and not related to the patient group. Both T1D patients and healthy individuals were born and lived in the same geographical region of Recife, Pernambuco, Brazil. As Brazilians are considered an admixed population, due to recent events of European and African migrations, we previously studied the ethnical composition of Recife population in order to avoid spurious association: we used 12 genetic ancestries in formative markers (AIMs) described by Kosoy *et al.* (2009), demonstrating a contribution of 59.7%, 23% and 17.3% of European, African and Native Amerindian ancestry, respectively (Data under publication).

Diagnosis of autoimmune thyroid and celiac disease

Antibodies to thyroid peroxidase (anti-TPO) and anti-transglutaminase (anti-tTG) were determined by chemio-luminescence (anti-TPO Ab, diagnostic products IMMULITE Co, Los Angeles) and by ELISA kit I-tTG (Eurospital, Trieste, Italy), respectively, following manufacturer's instructions. Individuals with anti-TPO antibodies (greater than 35 IU / ml

basis, according to manufacturer's suggestion) were considered as AITD. Individuals positive for anti-tTG antibodies were subsequently screened for the presence of HLA DQ2 and/or DQ8 haplotypes, using (Eurospital, Trieste, Italy) kit I-DQ.

DNA Extraction

Genomic DNA was extracted from peripheral whole blood using Wizard Genomic DNA purification kit (Promega) according to the standard laboratory protocols.

Polymorphism selection and genotyping

The *FCN1* and *FCN2* are located at chromosome 9q34. After *in silico* and literature search we selected five SNPs: The -1981 (rs2989727) and 7919 (rs1071583) located at promoter region and in exon 9 of *FCN1* gene, respectively, and the SNPs -4 (rs17514136), +5839 (rs3124954) and +6424 (rs7851696) located at 5'UTR, intron 1 and exon 8 of *FCN2* gene, respectively. SNP in 5'UTR region of *FCN2* have been associated with variations in serum concentration of the protein, whereas the polymorphism located in exon 8, which encodes the domain similar to fibrinogen, has been associated with an increase in the ability to link the acetylated residues of the protein (Luz *et al.* 2013). The rs3124954 represents a haploblock tagged by rs3128624 of *FCN2* gene.

The SNPs at promoter and exon 9 of *FCN1* could regulate both the expression and the synthesis of ficolin-1 and were previously associated with autoimmune disorder (Vander Cruyssen *et al.* 2007). The rs1071583 of *FCN1* is synonymous SNP that changes dramatically the frequency of codon usage in the translation process, there by altering the rate of bioavailable protein and was associated with other autoimmune events (<http://www.kazusa.or.jp/codon/>).

Genotyping was performed using commercially available TaqMan probes (Applied Biosystem). The rs2989727 and rs1071583, by C_26745032_10 and C_1819018_1_, respectively. The rs17514136, rs3124954 and rs7851696, by C_25765134_10, C_27462209_20 and C_29220549_20), respectively. TaqMan reactions were set up based on the manufacture's protocol and the samples were run at 7500 Real-Time PCR instrument (Applied Biosystem).

Statistical analysis

Allelic discrimination was performed as suggested by the manufacturer (TaqMan® Genotyping Software), and analyzed using Genotyping Transposer software. Using the R

statistical package (www.r-project.org), we obtained the chi-square test to correlate polymorphism distribution with the susceptibility to develop T1D and its clinical features as well as to evaluate the Hardy-Weinberg equilibrium. Linkage disequilibrium within *FCN1* and *FCN2* SNPs and haplotypes reconstruction were assessed using the Haploview and SNPstast softwares (version 4.2).

Odds Ratio (OR) and 95% Confidence Intervals (CI) were also computed. In all analyses, p-value < 0.05 were considered statistically significant.

The association with the age of T1D onset was performed using the package SNPAssoc, implemented in statistical software R (Version 3.0.0, <http://www.r-project.org>).

Results

In this study, five single nucleotide polymorphisms in *FCN1* (2 SNPs) and *FCN2* (3 SNPs) genes were analyzed in 204 T1D patients and 193 healthy subjects, classified according to the presence of other autoimmune disorder, namely CD and AITD. The distribution of allele and genotype frequencies of *FCN1* and *FCN2* SNPs in T1D patients and healthy individuals is reported in table 1.

Allele and genotype frequencies of *FCN1* gene polymorphisms (rs2989727 and rs1071583) were in Hardy-Weinberg equilibrium in both T1D patients and healthy individuals groups. The *FCN2* SNPs frequencies were also in Hardy-Weinberg equilibrium, except for the rs7851696 (+6424 G>T variant) at exon 8 in both groups. No statistical differences were found in the SNPs distribution of T1D patients, CD and AITD subgroups and healthy individuals (Table 1; P-value >0.05) in all genetic models, *i.e.* codominant, dominant, recessive, overdominant and log-additive (data not shown).

Only the rs1071583 at *FCN1* was associated with age-at-diagnosis of T1D (p-value: 0.016; AIC: 1095; dif: -2.20; 95%CI: -3.997 to -0.419; Table 2). This association shows the genotype T/T as major susceptibility risk factor for an earlier insurgence of diabetes when compared to C/C and C/T genotypes. Patients with T/T genotypes could develop T1D around two years earlier than the others patients. No statistical association with the sex distribution was obtained for all five loci (P-value > 0.05, data not shown).

Since SNPs may act in combination to increase the risk of disease, the haplotypes of the studied *FCNs* SNPs were investigated and their frequencies in T1D and healthy control groups were compared. In spite of lack of strong LD between rs2989727 - rs1071583 SNPs ($D'=0.2$), individuals carrying the C allele at both SNPs showed some protection against T1D onset (p-value: 0.0003, OR: 0.53, 95%CI= 0.38 – 0.75) as show in Table 3.

Discussion

T1D is a multifactorial autoimmune disease, caused by one or more environmental factors that interact with the genetic profile of the individual. In fact, the development of T1D has been linked to environmental factors, and within them, viruses and bacterial toxins have been reported as playing an important role (Kyvik *et al.* 1995; Tsutsumi *et al.* 2003; Hansen *et al.* 2004). In the context of infectious triggering of T1D, it is known that ficolins can activate the lectin pathway of complement after binding to various microbial ligands such as mannose (Ohta *et al.* 1990), lipoteichoic acid (Lynch *et al.* 2004), GlcNAc (Matsushita *et al.* 1996), lipopolysaccharide (Zhao *et al.* 2002; Neth *et al.* 2000). Thus it can be assumed that the reduction or deficiency of serum and interstitium ficolin-1/2 in children and adolescents could be a risk factor for T1D onset. Furthermore, as ficolins are involved in the cleaning of apoptotic bodies, its deficiency may also be associated with a poor removal of apoptotic cells, resulting in the spread of autoantigens and immune system activation (Runza *et al.* 2008; Boniotto *et al.* 2005).

The knowledge of ficolin in autoimmune diseases remains scarce; in fact we have found in the literature only one of genetic association study with autoimmune disorder. Vander Cruyssen, *et al.* (2007) described the association of rs2989727 and rs1071583 in *FCN1* with the development of rheumatoid arthritis. Both SNPs were included in the present studies, but no association with T1D development was found. Furthermore, these SNPs were not involved in the insurgence of CD or AITD or both. As Vander Cruyssen, *et al.* (2007), demonstrated a strong linkage disequilibrium (LD) between the SNPs rs2989727 and rs1071583, we also performed LD analysis and found that the combination of alleles C-C (for the rs2989727 and rs1071583, respectively) were associated with protection to T1D development, even if these SNPs were not in LD in our studied population. Unfortunately, Vander Cruyssen, *et al.* (2007) did not perform the haplotype association, limiting our discussion.

The mannose binding lectin (MBL) and ficolin proteins may share the same molecular function and both take part in similar innate immune pathways as synonymous proteins, *i.e.*, the absence of one protein could be masked by the presence of the other one. So, we hypothesize that individuals carrying low levels of FCN1 or FCN2 could present normal, or even, high levels of MBL, thus creating a balance in the complement activation and apoptotic clearance. Despite these major functions similarities between MBL and ficolins, the ficolin-1 is the unique to be released by leukocytes that infiltrates the interstitium during the inflammation,

and we believe that the absence of ficolin-1 in the microenvironmental of the inflammatory process in pancreas tissues will not be balanced by the MBL presence. However, according to our results this hypotheses was not confirmed, corroborating Munthe-Fog *et al.* (2012) findings that demonstrated that the rs2989727 do not influence the *FCNI* expression in monocytes. Interesting, children carrying the T/T genotype (rs1071583 of *FCNI*) presented an earlier age of diagnosis compared with genotypes C/ C or C/T, in a recessive model. The rs1071583 is a synonymous SNP at exon 9, that changes CAA to CAG, and the codon CAA has lower codon usage related to CAG (12.3 vs 34.2 per thousand of transcription) [<http://www.kazusa.or.jp/codon/>], consequently, individuals carrying the genotype T/T (*i.e.* the codon CAA) could produce smaller quantity of ficolin 1. This finding suggests that *FCNI* is not implicated in triggering T1D onset, but it could be involved in the chronic conditions of T1D autoimmunity. After the initial autoimmune response, the recruitment of leucocytes that produce a smaller quantity of ficolin 1 could diminish the apoptotic clearance and anticipating the autoimmune profile. However, further functional studies should be performed to clarify this hypothesis.

Conclusion

This is the first report aiming at studying the genetic role of *FCNI* and *FCN2* in North Eastern Brazilian children and adolescents with T1D. Despite, no significant association was found between the studied SNPs and T1D onset as well as with the insurgency of autoimmune disorder (CD and AITD) in these patients, the SNP rs1071583 was correlated with the an earlier age of diagnosis. In addition, the SNP combination rs2989727 and rs1071583 was involved with T1D protection. We are aware of the limitations of our study, related basically to the low number of individuals analyzed as well as to the absence of functional validation (ELISA, Western etc.) of the impact of *FCNI* and *FCN2* SNPs on the production and functionality of the proteins: so both genetic replica and immunological functional studies should be done to increase our knowledge of *FCN* genes in the development of T1D.

References

Araujo J., Segat L., Guimarães R.L., Brandão L.A., Souza P.E., Santos S. *et al.* 2009 Mannose binding lectin gene polymorphisms and associated auto-immune diseases in type 1 diabetes Brazilian patients. *Clin Immunol.* **131**, 254-9

Atkinson A.P., Cedzynski M., Szemraj J., St Swierzko A., Bak-Romaniszyn L., Banasik M. *et al.* 2004 L-ficolin in children with recurrent respiratory infections. *Clin Exp Immunol.* **138**, 517-20.

Boniotto M., Braida L., Baldas V., Not T., Ventura A., Vatta S. *et al.* 2005 Evidence of a correlation between mannose binding lectin and celiac disease: a model for other autoimmune diseases. *J Mol Med (Berl).* **83**, 308-15.

Garred P., Honoré C., Ma Y.J., Munthe-Fog L., Hummelshøj T. 2009 MBL2, FCN1, FCN2 and FCN3-The genes behind the initiation of the lectin pathway of complement. *Mol Immunol.* **46**, 2737-44.

Hansen T.K, Tarnow L., Thiel S., Steffensen R., Stehouwer C.D., Schalkwijk C.G. *et al.* 2004 Association between mannose-binding lectin and vascular complications in type 1 diabetes. *Diabetes.* **53**, 1570.

Hu Y.L., Luo F.L., Fu J.L., Chen T.L., Wu S.M., Zhou Y.D. *et al.* 2013 Early increased ficolin-2 concentrations are associated with severity of liver inflammation and efficacy of anti-viral therapy in chronic hepatitis C patients. *Scand J Immunol.* **77**, 144-50.

Kosoy R., Nassir R., Tian C., White P.A., Butler L.M., Silva G. 2009 Ancestry Informative Marker Sets for Determining Continental Origin and Admixture Proportions in Common Populations in America. *Hum Mutat.* **30**, 69–78.

Kyvik K. O., Green A., Beck-Nielsen H. 1995 Concordance rates of insulin dependent diabetes mellitus: A population based study of young Danish twins. *BMJ.* **311**, 913.

Luz P.R., Boldt A.B., Grisbach C., Kun J.F., Velavan T.P., Messias-Reason I.J. 2013 Association of L-ficolin levels and FCN2 genotypes with chronic Chagas disease. *PLoS One.* **4**, 60237.

Lynch N.J., Roscher S., Hartung T., Morath S., Matsushita M., Maennel D.N. *et al.* 2004 L-ficolin specifically binds to lipoteichoic acid, a cell wall constituent of Gram-positive bacteria, and activates the lectin pathway of complement. *J Immunol.* **15**, 1198-202.

Matsushita M., Endo Y., Taira S., Sato Y., Fujita T., Ichikawa N. *et al.* 1996 A novel human serum lectin with collagen- and fibrinogen-like domains that functions as an opsonin. *J Biol Chem.* **271**, 2448-54.

Messias-Reason I., Kreamsner P.G., Kun J.F. 2009a Unctinal haplotypes that produce normal ficolin-2 levels protect against clinical leprosy. *J Infect Dis.* **199**, 801-4.

Messias-Reason I.J., Schafranski M.D., Kremsner P.G., Kun J.F. 2009b Ficolin 2 (FCN2) functional polymorphisms and the risk of rheumatic fever and rheumatic heart disease. *Clin Exp Immunol.* **157**, 395-9.

Munthe-Fog L., Hummelshoj T., Honoré C., Moller M.E., Skjoedt M.O., Palsgaard I. *et al.* 2012 Variation in FCN1 affects biosynthesis of ficolin-1 and is associated with outcome of systemic inflammation. *Genes Immun.* **13**, 515-22.

Neth O., Jack D.L., Dodds A.W., Holzel H., Klein N.J., Turner M.W. 2000 Mannose-binding lectin binds to a range of clinically relevant microorganisms and promotes complement deposition. *Infect Immun.* **68**, 688-93.

Ohta M., Okada M., Yamashina I., Kawasaki T. 1990 The mechanism of carbohydrate-mediated complement activation by the serum mannan-binding protein. *J Biol Chem.* **265**, 1980-4.1980-4.

Runza V.L., Schwaeble W., Männel D.N. 2008 Ficolins: novel pattern recognition molecules of the innate immune response. *Immunobiology.* **213**, 297-306.

Tsutsumi A, Ikegami H., Takahashi R., Murata H., Goto D., Matsumoto I., *et al.* 2003 Mannose binding lectin gene polymorphism in patients with type I diabetes. *Hum Immunol.* **64**, 621.

Vander Cruyssen B., Nuytinck L., Boullart L., Elewaut D., Waegeman W., Van Thielen M., *et al.* 2007 Polymorphisms in the ficolin1 gene (FCN1) are associated with susceptibility to the development of rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford).* **46**, 1792-5.

Zhao L., Ohtaki Y., Yamaguchi K., Matsushita M., Fujita T., Yokochi T. *et al.* 2002 LPS-induced platelet response and rapid shock in mice: contribution of O-antigen region of LPS and involvement of the lectin pathway of the complement system. *Blood.* **100**, 3233-9.

Table 1. Allele and genotype frequencies of FCN1 rs2989727, rs1071583, and FCN2 rs17514136, rs3124954, rs7851696 SNPs in healthy controls (HC) and type 1 diabetes (T1D) patients classified according to the insurgence of autoimmune thyroid (AITD) and celiac disease (CD).

	T1D+ AITD+CD+	T1D+ AITD+CD -	T1D+ AITD-CD+	T1D+ AITD-CD-	T1D+ (All)	HC
rs2989727	n=6(3%)	n=42(21%)	n=12(6%)	n=134(69%)	n=194(100%)	n=188(100%)
C	6 (50%)	45 (54%)	9 (38%)	131 (49%)	191 (49%)	176 (45%)
T	6 (50%)	39 (46%)	15 (63%)	137 (51%)	197 (51%)	200 (53%)
CC	2 (33%)	9 (21%)	3 (25%)	31 (23%)	45 (23%)	45 (24%)
CT	2 (33%)	27 (64%)	3 (25%)	69 (51%)	101 (51%)	86 (46%)
TT	2 (33%)	6 (14%)	6 (50%)	34 (25%)	48 (25%)	57 (30%)
rs1071583	n=6(3%)	n=42(20%)	n=12(6%)	n=134(66%)	n=204(100%)	n=188(100%)
C	10 (83%)	52 (62%)	183 (68%)	18 (75%)	263 (68%)	243 (65%)
T	2 (17%)	32 (38%)	85 (32%)	6 (25%)	125 (32%)	133 (35%)
CC	4 (67%)	15 (36%)	64 (48%)	8 (67%)	91 (47%)	80 (43%)
CT	2 (33%)	22 (52%)	55 (41%)	2 (17%)	81 (42%)	83 (44%)
TT	0 (0%)	5 (12%)	15 (11%)	2 (17%)	22 (11%)	25 (13%)
rs17514136	n=7(3%)	n=43(21%)	n=12(6%)	n=144(70%)	n=206(100%)	n=193
A	10 (71%)	71 (83%)	21 (88%)	220(88%)	315 (82%)	315 (79%)
G	4 (29%)	15 (17%)	3 (13%)	3 (13%)	86 (21%)	71 (18%)
AA	3 (43%)	31 (72%)	9 (75%)	9 (75%)	130 (64%)	130 (67%)
AG	4 (57%)	9 (21%)	3 (25%)	3 (25%)	62 (30)	55 (28%)
GG	0 (00%)	3 (07%)	0 (00%)	0 (00%)	12 (6%)	8 (4%)
rs3124954	n=8(4%)	n=43(21%)	n=12(6%)	n=144(70%)	n=207(100%)	n=193
C	9 (64%)	57 (66%)	15 (63%)	190 (67%)	271 (66%)	224 (61%)
T	5 (36%)	29 (34%)	9 (38%)	94 (33%)	137 (34%)	142 (39%)
CC	2 (29%)	20 (47%)	5 (42%)	68 (48%)	95 (47%)	69 (38%)
CT	5 (71%)	17 (40%)	5 (42%)	54 (38%)	81 (40%)	86 (47%)
TT	0 (00%)	6 (14%)	2 (17%)	20 (14%)	28 (14%)	28 (15%)
rs7851696	n=6(3%)	n=37(20%)	n=11(6%)	n=134(71%)	n=188(100%)	n=191
G	13 (93%)	63 (83%)	13 (93%)	230 (90%)	321 (88%)	343 (90%)
T	1 (07%)	13 (17%)	1 (07%)	26 (10%)	43 (12%)	39 (10%)
GG	6 (86%)	26(68%)	6 (86%)	106 (83%)	144 (79%)	158 (83%)
GT	1 (14%)	11 (29%)	1 (14%)	18 (14%)	33 (18%)	27 (14%)
TT	0 (00%)	1 (03%)	0 (00%)	4 (03%)	5 (03%)	6 (03%)

Table 2: Association between age of onset of type 1 diabetes and the polymorphism rs1071583 of *FCNI* gene.

	rs1071583	N	me	se	dif	lower	up	p-value	AIC
Codominant	C/C	91	7.86	0.42	0.002	-	-		
	C/T	81	7.52	0.48	-0.34	-1.549	0.87	0.05	1097
	T/T	22	5.45	0.63	-2.37	-4.25	-0.49		
Dominant	C/C	91	7.86	0.42	0.00	-	-	0.19	1100
	C/T - T/T	103	7.09	0.41	-0.77	-1.92	0.37		
Recessive	C/C - C/T	172	7.70	0.32	0.00	-	-	0.02	1095
	T/T	22	5.49	0.63	-2.21	-3.98	-0.42		
Overdominant	C/C - T/T	113	7.40	0.37	0.00	-	-	0.84	1101
	C/T	81	7.52	0.48	0.12	-1.41	1.29		
Log - additive	0.1.2	-	-	-	-0.91	-1.75	-0.06	0.04	1097

N: Number of individuals; me: average for a certain genotype; se: standard deviation of this average; dif: the difference between the averages of certain genotype with genotype reference; lower= lower limit of the confidence interval of difference; up = upper limit of the confidence interval of difference.