

**LINDIANE GOMES CRISÓSTOMO**

**Expressão dos receptores das interleucinas de cadeia  
gama comum em linfócitos T periféricos de pacientes  
portadores de diabetes mellitus tipo 1 com início recente**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da  
Universidade de São Paulo para obtenção do  
título de Doutor em Ciências

Programa de Endocrinologia

Orientadora: Maria Elizabeth Rossi da Silva

**São Paulo**

**2010**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**

Preparada pela Biblioteca da  
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Crisóstomo, Lindiane Gomes

Expressão dos receptores das interleucinas de cadeia gama comum em linfócitos T periféricos em pacientes portadores de diabetes mellitus tipo 1 com início recente / Lindiane Gomes Crisóstomo. -- São Paulo, 2010.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.  
Programa de Endocrinologia.

Orientadora: Maria Elizabeth Rossi da Silva.

Descritores: 1.Diabetes mellitus 2.Autoimunidade 3.Linfócitos T 4.Ativação linfocítica 5.Receptores de interleucina-21 6.Receptores de interleucina-2 7.Interleucina-4 8.Interleucina-7

USP/FM/DBD-184/10

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Carboidratos e Radioimunoensaio - LIM 18 da Disciplina de Endocrinologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, com a colaboração do Laboratório de Dermatologia e Imunodeficiências – LIM 56 e do Laboratório de Hormônios e Genética Molecular - LIM 42. Contou com apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP): 2006/06390-1

## ***Dedicatória***

*Aos meus pais, que me deram a vida e me ensinaram a vivê-la com dignidade e correção, que se doaram por inteiro e muitas vezes renunciaram aos seus sonhos para que eu realizasse os meus.*

*Ao meu marido, por acreditar mais em mim do que eu mesma, e pela inigualável paciência, motivação e conforto nos momentos mais difíceis. Sem você, seu amor e compreensão eu não teria conseguido!*

# ***Agradecimentos***

A conclusão desta tese representa um grande marco em minha jornada. Uma enorme conquista pessoal e profissional, que só pôde ser realizada com a valiosa colaboração de amigos, colegas e familiares. Agradeço imensamente a todos que tornaram esta caminhada possível !

Aos meus pais, Lindbergue e Gislane, pelo apoio incondicional em todos os momentos e escolhas. Agradeço todo o esforço para me proporcionarem uma educação de qualidade, e por me abrirem um mundo de possibilidades do qual agora posso desfrutar. Obrigada por serem exemplos de força, caráter, dignidade, companheirismo e amor.

Ao meu marido Rogério, por estar ao meu lado em todos os passos desta árdua caminhada, apoio crucial nos momentos de falta de força ou fé. Você me convenceu a iniciar esta jornada, e sem você ao meu lado ela nunca teria findado.

Aos meus irmãos, cunhadas, sobrinhos e sobrinhas, por fazerem parte da minha vida, ajudando a fazê-la mais leve e descontraída, mas também dividindo os momentos de dificuldades e atribulações.

À minha orientadora, Maria Elizabeth Rossi da Silva, por ter acreditado no meu potencial e prontamente me acolhido no LIM-18. Meus sinceros agradecimentos por sua presença constante, ensinamentos preciosos, paciência e colaboração.

Ao meu “co-orientador” Dewton de Moraes Vasconcelos, pilar de conhecimentos em Imunologia e citometria de fluxo, por ter me ajudado sobremaneira com todas as dúvidas imunológicas e por ter aberto as portas do LIM-56, permitindo assim que este projeto fosse realizado.

A Noêmia e Rosângela, magas da citometria de fluxo. Sem a preciosa ajuda de vocês esta tese não teria sido realizada!

A querida amiga Luciana Montenegro, não só pela inestimável ajuda com o PCR em tempo real, mas principalmente pelo companheirismo e amizade em todos os demais momentos da vida.

A Rosa Fukui e Aritânia Santos, peças fundamentais para a realização da metodologia desta tese, companheiras e amigas de LIM-18. O apoio de vocês foi essencial para que este projeto tenha se desenrolado de maneira harmônica e coesa.

A Adriana, Fátima, Fernanda, Greci, Márcia Regina, e Maria José: cada uma de vocês, à sua maneira, contribuiu de maneira única e fundamental para a realização deste trabalho.

Aos demais pós-graduandos do LIM-18: Jéssica, Débora, Vinícius, Tereza, Renata, Kátia e Maisa, que ajudaram a fazer do LIM-18 um local de trabalho agradável e prazeroso.

A Emília, pelas agradáveis conversas e conselhos, e pelo auxílio com o PCR em tempo real.

Ao Dr. Alexander de Lima Jorge, que me ajudou sobremaneira com a análise estatística e interpretação do PCR em tempo real. Sua contribuição foi preciosa para a conclusão desta tese.



As enfermeiras do ambulatório de endocrinologia do Hospital das Clínicas da USP e do laboratório do Instituto da criança do HCFMUSP, pela grande ajuda na coleta do sangue dos pacientes e controles.

Aos assistentes da unidade de Endocrinologia Pediátrica do Instituto da Criança, Dra. Nuvarte, Dr. Durval, Dra. Thais, Dr. Vaê, Dr. Hilton, Dr. Hamilton e Dra. Leandra por todos os ensinamentos durante o início de minha jornada pela endocrinologia e pelo apoio e incentivo a continuar minha formação acadêmica realizando este doutorado.

Aos colegas da endocrinologia pediátrica que a mim confiaram seus pacientes diabéticos, especialmente a Dra Ruth Rocha. Muito obrigada pela cooperação, essencial para a realização desta tese.

As queridas amigas Débora e Camila, companheiras desde o início da caminhada na pediatria e endocrinologia pediátrica. Vocês foram minha inspiração para a entrada no doutorado e no fantástico mundo da pós-graduação.

Aos pacientes, objetivo maior de toda e qualquer atividade científica.

## ***Sumário***

**Lista de abreviaturas**

**Lista de símbolos**

**Lista de Figuras**

**Lista de Tabelas**

**Lista de Anexos**

**Resumo**

**Summary**

<b>1</b>	<b>Introdução .....</b>	<b>1</b>
1.1	Genética do DM1A.....	2
1.2	DM1A e autoimunidade.....	4
1.3	Homeostase de células T e vias de ativação dos linfócitos TCD4+ ....	7
1.4	Interleucinas de cadeia gama comum.....	10
1.4.1	Interleucina 21 e seu receptor .....	12
1.4.2	Interleucina 2 e seu receptor .....	17
1.4.3	Interleucina 4 e seu receptor .....	18
1.4.4	Interleucina 7 e seu receptor .....	19
1.4.5	Demais interleucinas de cadeia gama comum .....	20
1.5	Justificativa para o estudo dos receptores das interleucinas de cadeia gama comum em pacientes com DM1A .....	22
<b>2</b>	<b>Objetivos .....</b>	<b>23</b>
<b>3</b>	<b>Métodos .....</b>	<b>25</b>
3.1	Considerações éticas .....	26
3.2	Casuística .....	26
3.2.1	Pacientes.....	26
3.2.2	Controles .....	27
3.3	Avaliação hormonal e bioquímica: .....	28
3.4	Genotipagem dos alelos HLA -DR e -DQ.....	28
3.5	Determinação dos autoanticorpos pancreáticos: .....	29

3.6	Citometria de fluxo .....	30
3.7	Reação de cadeia de polimerase (PCR) em tempo real .....	33
3.7.1	Extração de RNA total e obtenção de c-DNA .....	33
3.7.2	Estudo da expressão do <i>IL-21R</i> , <i>IL2R<math>\alpha</math></i> e <i>IL-2R<math>\beta</math></i> por PCR em tempo real .....	34
3.8	Análise estatística .....	36
3.9	Estratégias do estudo .....	36
<b>4</b>	<b>Resultados .....</b>	<b>39</b>
4.1	Caracterização dos pacientes e controles: .....	40
4.2	Expressão dos receptores de interleucinas de cadeia gama comum determinada por citometria de fluxo .....	41
4.2.1	Expressão do receptor da Interleucina 21 .....	41
4.2.2	Expressão da cadeia alfa do receptor da Interleucina 2 (CD25).....	44
4.2.3	Expressão da cadeia beta do receptor da Interleucina 2 (CD122).....	47
4.2.4	Expressão do receptor da Interleucina 4 (CD124).....	48
4.2.5	Expressão do receptor da Interleucina 7 (CD127).....	49
4.2.6	Correlações entre expressão dos receptores de interleucinas de cadeia gama comum e títulos de autoanticorpos pancreáticos.....	50
4.3	Reação de cadeia de polimerase em tempo real (PCR em tempo real).....	51
4.3.1	Expressão do RNAm do receptor da IL-21 .....	52
4.3.2	Expressão do RNAm da cadeia alfa do receptor da IL-2.....	53
4.3.3	Expressão do RNAm da cadeia beta do receptor da IL-2....	55
<b>5</b>	<b>Discussão.....</b>	<b>57</b>
<b>6</b>	<b>Conclusões .....</b>	<b>66</b>
<b>7</b>	<b>Anexos.....</b>	<b>68</b>
<b>8</b>	<b>Referências .....</b>	<b>102</b>

## ***Lista de abreviaturas***

cDNA	ácido desoxirribonucleico complementar
CD	<i>cluster of differentiation</i>
DM1A	Diabetes mellitus tipo 1 A
DNA	ácido desoxirribonucléico
DP	desvio padrão
ECD	ficoeritrina <i>Texas Red</i>
FasL	ligante Fas
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
HLA	Antígeno Leucocitário Humano
I125	iodo 125
IFN- $\gamma$	interferon gama
IgE	imunoglobulina E
IgG	imunoglobulina G
IL	Interleucina
IL-2R $\alpha$	Cadeia alfa do receptor da Interleucina 2
IL-2R $\beta$	Cadeia beta do receptor da Interleucina 2
IL-4R	Receptor da interleucina 4
IL-7R	Receptor da interleucina 7
IL-21R	Receptor da interleucina 21
LES	Lupus Eritematoso sistêmico
MFI	Intensidade média de fluorescência
MHC	Complexo Principal de Histocompatibilidade
PC5	Ficoeritrina –cianina 5

PE	Ficoeritrina
PE/CY5	Ficoeritrina CY5
PCR	reação em cadeia de polimerase
RNA	ácido ribonucleic
RNAm	ácido ribonucléico mensageiro
SNP	<i>Single nucleotide polymorphism</i>
STAT	<i>Signal Transducers and Activators of Transcription</i>
Taq	<i>Thermus aquaticus</i> enzima polimerase
Th	células T <i>helper</i>
TNF- $\alpha$	fator de necrose tumoral alfa
TNF- $\beta$	fator de necrose tumoral beta
Treg	células T regulatórias

## ***Lista de símbolos***



<	menor
=	igual
>	maior
≤	menor ou igual
≥	Maior ou igual
μL	microlitro
mg/L	miligrama por litro
ng/mL	nanograma por mililitro
rpm	rotações por minuto
U/mL	unidades por mililitro

## ***Lista de figuras***

<b>Figura 1:</b>	Vias de ativação de linfócitos TCD4+ .....	9
<b>Figura 2:</b>	Interleucinas de cadeia gama comum e seus receptores .....	11
<b>Figura 3:</b>	Fluxograma da estratégia inicial do estudo .....	38
<b>Figura 4:</b>	Fluxograma da estratégia final do estudo .....	38
<b>Figura 5:</b>	Expressão do receptor da interleucina 21 (IL-21R) em linfócitos T CD3 <sup>+</sup> .....	42
<b>Figura 6:</b>	Expressão do receptor da Interleucina-21 (IL-21R) em linfócitos TCD4 <sup>+</sup> .....	43
<b>Figura 7:</b>	Expressão da cadeia alfa do receptor da Interleucina 2 (IL-2R $\alpha$ ) em linfócitos T CD3 <sup>+</sup> .....	45
<b>Figura 8:</b>	Expressão da cadeia alfa do receptor da Interleucina 2 (IL-2R $\alpha$ ) em linfócitos T CD4 <sup>+</sup> .....	45
<b>Figura 9:</b>	Expressão do receptor da Interleucina 4 (IL-4R) em linfócitos T CD4 <sup>+</sup> .....	49
<b>Figura 10:</b>	Expressão do receptor da Interleucina 7 em linfócitos T CD3 <sup>+</sup> .....	49
<b>Figura 11:</b>	Expressão do gene do receptor da Interleucina 21 (IL-21R) em leucócitos periféricos .....	52
<b>Figura 12:</b>	Expressão relativa (RQ) do RNAm do gene do receptor da Interleucina 21 (IL-21R) .....	53
<b>Figura 13:</b>	Expressão do gene da cadeia alfa do receptor da interleucina 2 (IL-2R $\alpha$ ) em leucócitos periféricos .....	54
<b>Figura 14:</b>	Expressão relativa (RQ) do RNAm do gene da cadeia alfa do receptor da interleucina 2 (IL-2R $\alpha$ ) em pacientes portadores de DM1A .....	54
<b>Figura 15:</b>	Expressão do gene da cadeia beta do receptor da interleucina 2 (IL-2R $\beta$ ) em leucócitos periféricos .....	55
<b>Figura 16:</b>	Expressão relativa (RQ) do RNAm do gene da cadeia beta do receptor da interleucina 2 (IL-2R $\beta$ ) em pacientes portadores de DM1A .....	56

## ***Lista de tabelas***

<b>Tabela 1:</b>	Expressão do receptor da Interleucina-21 (IL-21R) em linfócitos T periféricos .....	42
<b>Tabela 2:</b>	Intensidade média de Fluorescência (MFI) para o receptor da Interleucina-21 em linfócitos T periféricos.....	43
<b>Tabela 3:</b>	Expressão da cadeia alfa (IL-2R $\alpha$ ) do receptor da Interleucina 2 em linfócitos T periféricos.....	44
<b>Tabela 4:</b>	Intensidade média de fluorescência da cadeia alfa do receptor da Interleucina 2 e .....	46
<b>Tabela 5:</b>	Porcentagem de células T regulatórias (CD4+CD25 <sup>high</sup> ) em pacientes portadores de DM1A e indivíduos controle.....	46
<b>Tabela 6:</b>	Expressão da cadeia beta (IL2R $\beta$ ) do receptor da Interleucina-2 em linfócitos T periféricos.....	47
<b>Tabela 7:</b>	Intensidade média de fluorescência da cadeia beta do receptor da Interleucina 2 em em linfócitos T periféricos.....	47
<b>Tabela 8:</b>	Expressão do receptor da Interleucina 4 (IL-4R) em linfócitos T periféricos .....	48
<b>Tabela 9:</b>	Intensidade média de fluorescência do receptor da Interleucina 4 .....	48
<b>Tabela 10:</b>	Expressão do receptor da Interleucina 7 (IL-7R) em linfócitos T periféricos .....	50
<b>Tabela 11:</b>	Intensidade média de fluorescência do receptor da Interleucina 7 .....	50

## ***Lista de anexos***

<b>ANEXO 1:</b>	Dados clínicos dos pacientes portadores de diabetes mellitus tipo 1A .....	69
<b>ANEXO 2:</b>	Dados laboratoriais dos pacientes portadores de DM1A.....	70
<b>ANEXO 3:</b>	Dados clínicos e laboratoriais dos indivíduos do grupo controle .....	71
<b>ANEXO 4:</b>	Dados de hemograma para pacientes portadores de DM1A e indivíduos controle .....	72
<b>ANEXO 5:</b>	Expressão do receptor da Interleucina-21(IL-21R) em linfócitos T periféricos .....	74
<b>ANEXO 6:</b>	Intensidade média de fluorescência (MFI) do receptor da Interleucina 21 em linfócitos T periféricos.....	76
<b>ANEXO 7:</b>	Expressão da cadeia alfa (IL-2R $\alpha$ ) do receptor da Interleucina-2 em linfócitos T periféricos.....	78
<b>ANEXO 8:</b>	Intensidade média de fluorescência (MFI) da cadeia alfa do receptor da Interleucina 2 (IL-2R $\alpha$ ) em linfócitos T periféricos .....	80
<b>ANEXO 9:</b>	Porcentagem de células T regulatórias (CD4+CD25 <sup>high</sup> ) em pacientes portadores de DM1A e controles .....	82
<b>ANEXO 10:</b>	Expressão da cadeia beta (IL-2R $\beta$ ) do receptor da Interleucina-2 em linfócitos T periféricos.....	83
<b>ANEXO 11:</b>	Intensidade média de fluorescência (MFI) da cadeia beta do receptor da Interleucina 2 em linfócitos T periféricos.....	85
<b>ANEXO 12:</b>	Expressão do receptor da Interleucina 4 (IL-4R) em linfócitos T periféricos .....	87
<b>ANEXO 13:</b>	Intensidade média de fluorescência (MFI) do receptor da Interleucina 4 (IL-4R) em linfócitos T periféricos.....	89
<b>ANEXO 14:</b>	Expressão do receptor da Interleucina 7 em linfócitos T periféricos .....	91
<b>ANEXO 15:</b>	Intensidade média de fluorescência (MFI) do receptor da Interleucina 7 em linfócitos T periféricos.....	93

<b>ANEXO 16:</b> Correlação entre títulos de Anticorpo anti-descarboxilase do ácido glutâmico 65 (anti-GAD65) e expressão dos receptores de interleucinas de cadeia gama comum.....	95
<b>ANEXO 17:</b> Correlação entre títulos de Anticorpo anti-tirosina fosfatase (anti-IA2) e expressão dos receptores de interleucinas de cadeia gama comum.....	97
<b>ANEXO 18:</b> Expressão relativa do gene do receptor da interleucina 21 (IL-21R) por PCR em tempo real em pacientes portadores de DM1A divididos em tercís .....	99
<b>ANEXO 19:</b> Expressão relativa do gene da cadeia alfa do receptor da interleucina 2 (IL-2R $\alpha$ ) por PCR em tempo real em pacientes portadores de DM1A divididos em tercís .....	100
<b>ANEXO 20:</b> Expressão relativa do gene da cadeia beta do receptor da interleucina 2 (IL-2R $\beta$ ) por PCR em tempo real em pacientes portadores de DM1A divididos em tercís .....	101



***Resumo***

Crisóstomo LG. *Expressão dos receptores das interleucinas de cadeia gama comum em linfócitos T periféricos em pacientes portadores de diabetes mellitus tipo 1 com início recente* [tese]. São Paulo. Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; 2010. 113p.

O Diabetes Mellitus tipo 1 (DM1A) é uma doença autoimune caracterizada pela infiltração pancreática de linfócitos T e B, macrófagos e células dendríticas, levando à perda progressiva da capacidade de secreção de insulina pelas células beta pancreáticas. A homeostase das células T, ou seja, o desenvolvimento e manutenção apropriados dos números e funções das células T são essenciais para a integridade do sistema imune. Classicamente acreditava-se que as células T CD4+ poderiam se subdividir em duas populações efetoras distintas, T *helper* 1 e T *helper* 2. Recentemente, foram descritas duas novas vias de ativação de linfócitos T CD4+: a via Th17, que tem papel fundamental na autoimunidade; a via T regulatória, onde células T CD4+CD25<sup>high</sup> são essenciais na tolerância periférica e proteção contra autoimunidade. As Interleucinas (IL) de cadeia gama comum agem em várias etapas desta diferenciação linfocítica. A IL-21 é o membro mais recente desta família de citocinas, que inclui também: IL-2, IL-4, IL-7, IL-9 e IL-15. A IL-21 atua através da interação com seu receptor, o IL-21R, apresentando ações pleiotrópicas e, como regra, pró-inflamatórias. Em estudos com modelos animais de diabetes autoimune verificou-se que a IL-21 e seu receptor são essenciais para o desenvolvimento da doença, porém ainda não há estudos sobre a ação desta interleucina no DM1 em humanos. O objetivo de nosso estudo foi avaliar o papel dos receptores das interleucinas de cadeia gama comum na patogênese do DM1A através da determinação da expressão da proteína de superfície e do RNA mensageiro destes receptores em pacientes com DM1A de início recente, em comparação com indivíduos controles normais, e da correlação destes valores com títulos de autoanticorpos pancreáticos. Estudamos a expressão da proteína de superfície do IL-21R, IL-2R $\alpha$  (CD25), IL-2R $\beta$  (CD122), IL-4R (CD124) e IL-7R (CD127) em linfócitos T periféricos de 35 pacientes com DM1 e 25 controles sadios utilizando citometria de fluxo. O tempo médio de diagnóstico do DM1 foi de 3 meses, e todos os pacientes estavam em uso de insulina no momento da coleta de sangue. Auto-anticorpos pancreáticos (anti-GAD65 e anti-IA2) foram dosados através de radioimunoensaio. A expressão do RNAm de *IL-21R*, *IL-2R $\alpha$*  e *IL-2R $\beta$*  foi quantificada por PCR em tempo real em 23 dos pacientes portadores de DM1A. Detectamos, pela primeira vez, diminuição significativa na expressão proporcional de IL-21R, CD25 e CD122 em linfócitos TCD3+ e TCD4+, além de diminuição na expressão de CD124 em linfócitos T CD4+ e CD127 em linfócitos T CD3+. Verificamos também redução significativa na quantidade de células

TCD4+CD25<sup>high</sup> (T regulatórias) nos pacientes DM1A. Não houve correlação entre expressão dos receptores de superfície das interleucinas de cadeia gama comum e títulos de autoanticorpos pancreáticos. Realizamos o PCR em tempo real para quantificar a expressão do RNA mensageiro (RNAm) dos receptores de interleucinas de cadeia gama comum, e avaliar se esta correspondia à expressão das proteínas de superfície obtida através de citometria de fluxo. Comparamos a expressão do RNAm de *IL-21R*, *IL-2R $\alpha$*  e *IL-2R $\beta$*  nos pacientes DM1A dividindo-os em tercios de acordo com os valores de expressão de proteína de superfície obtidos por citometria de fluxo em linfócitos T CD3<sup>+</sup>, e verificamos que não houve diferença entre os 3 grupos na expressão relativa dos genes estudados. Portanto, em nossa casuística a redução da expressão da proteína de superfície dos receptores de interleucinas de cadeia gama comum possivelmente decorreu de alterações posteriores à transcrição do RNA mensageiro.

**Descritores:** 1.Diabetes mellitus 2.Autoimunidade 3.Linfócitos T  
4.Ativação linfocítica 5.Receptores de interleucina-21 6.Receptores de interleucina-2 7.Interleucina-4 8.Interleucina-7

# ***Summary***

Crisóstomo, LG. *Expression of common gamma chain cytokines receptors in peripheral T lymphocytes of recent onset type 1 diabetes patients* [thesis]. São Paulo. "Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo"; 2010. 113p.

Type 1 diabetes (T1D) is a chronic autoimmune disease characterized by pancreatic infiltration of T and B lymphocytes, macrophages and dendritic cells, leading to a progressive destruction of the insulin-producing  $\beta$ -cells. Homeostasis of T cells can be defined as the ability of the immune system to maintain normal T-cell counts and to restore T-cell numbers following T-cell depletion or expansion. It was classically believed that the CD4<sup>+</sup> T cells could be activated into two distinct effector populations, T helper1 and T helper2. It was recently described two new pathways of CD4<sup>+</sup> T lymphocytes activation: the Th17 pathway, that plays a fundamental role in autoimmunity and the regulatory pathway (Treg), where CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> T cells are essential to maintain peripheral tolerance and therefore protect against autoimmunity. The common gamma chain cytokines interfere with several steps of the CD4<sup>+</sup> T lymphocytes differentiation. Interleukin-21 (IL-21) is the most recent member of this family, that also includes IL-2, IL-4, IL-7, IL-9 and IL-15, and has pleiotropic effects on the immune system. Interleukin-21 acts through interaction with its receptor, the IL-21R, which is expressed in a great variety of immune cells. Various studies with animal models of autoimmune diabetes demonstrated that IL-21 and its receptor are essential for the development of the disease, but there are no studies evaluating the role of this interleukin and its receptor in T1DM in humans. The aim of our study was to assess the role of common gamma chain-dependent cytokine receptors in the pathogenesis of T1D, by determining the expression of the surface protein and mRNA of these receptors in recent-onset T1D patients and correlating these values with titles of pancreatic autoantibodies. We studied the surface protein expression of IL-21R, IL-2R $\alpha$  (CD25), IL-2R $\beta$  (CD122), IL-4R (CD124) and IL-7R (CD127) in peripheral T lymphocytes of 35 patients with T1D and 25 healthy controls using flow cytometry. Mean T1D duration was 3 months and all patients were using insulin at the time of blood withdraw. Pancreatic autoantibodies (anti-GAD65 and anti-IA2) were assessed by radioimmunoassay. The mRNA expression of IL-21R, IL-2R $\alpha$  and IL-2R $\beta$  was quantified by real time PCR in 23 of the T1D patients. We detected for the first time a statistically significant decrease in the proportional expression of IL-21R, CD25 and CD122 on CD3<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup> T lymphocytes, a decrease in the expression of CD124 on CD4<sup>+</sup> T cells and CD127 on CD3<sup>+</sup> T lymphocytes. We also observed a significant reduction in the amount of CD4<sup>+</sup> CD25<sup>high</sup> (T regulatory cells) in T1D patients. There was no

correlation between the expression of the surface receptors of common gamma chain cytokines and titles of pancreatic autoantibodies. We performed real-time PCR to quantify RNA expression of common gamma-chain interleukin receptors, and evaluate if these values corresponded to those of surface proteins obtained using flow cytometry. We compared the mRNA expression of IL-21R, IL-2R $\alpha$  and IL-2R $\beta$  in T1D patients by dividing them into tertiles according to the expression values of surface protein obtained by flow cytometry in CD3+T lymphocytes. We observed that there was no difference in the relative expression of mRNA among the 3 groups of patients. Therefore, in our study, the reduction of surface protein expression of common gamma chain cytokines receptors was possibly due to alterations that occurred after the transcription of mRNA.

**Descriptors:** 1.Diabetes mellitus 2.Autoimmunity 3.T lymphocyte  
4.Lymphocyte activation 5.Interleukin-21 receptor 6.Interleukin-2 receptor  
7.interleukin-4 8.interleukin-7

# ***1 Introdução***

O diabetes mellitus tipo 1A (DM1A) é uma doença caracterizada pela infiltração pancreática de linfócitos T e B e outras células do sistema imune, levando à perda progressiva da capacidade de secreção de insulina pelas células beta pancreáticas. O DM1A é uma patologia autoimune crônica e multifatorial, onde fatores genéticos e ambientais interagem de maneira complexa, determinando assim a gênese e a progressão da mesma.

## 1.1 Genética do DM1A

O DM1A apresenta características hereditárias poligênicas: mais de quarenta *loci* que conferem suscetibilidade já foram descritos, estando os mais importantes localizados nos cromossomos 1, 2, 6 e 11<sup>1</sup>. A região do sistema do antígeno leucocitário humano (HLA), localizada no complexo principal de histocompatibilidade (MHC) no braço curto do cromossoma 6, constitui o principal locus de suscetibilidade para DM1A, denominado IDDM1 (40% a 50% do risco genético para DM tipo 1)<sup>2</sup>. O MHC apresenta três classes de moléculas intimamente relacionadas. As moléculas da classe I (HLA - A, - B e -C) estão associadas com o processamento e apresentação de antígenos intracelulares, enquanto que os da classe III codificam proteínas do sistema complemento e outros componentes do sistema imune.



Os genes de classe II (HLA –DR, -DQ, - DP) são expressos em células do sistema imune que incluem monócitos/macrófagos, células dendríticas, epiteliais tímicas, linfócitos B e linfócitos T ativados e atuam no processamento e na apresentação de proteínas extracelulares. Portanto, moléculas de classe II possuem um papel importante na ativação das respostas autoimunes e são as mais importantes relacionadas ao DM1A. No locus HLA-DR, os alelos - DR\*03 ou - DR\*04 são os mais freqüentes nos pacientes diabéticos<sup>3</sup>. Considerando-se que 30% a 40% desses pacientes portadores de DM1A, principalmente as crianças, são heterozigotos HLA-DR\*03/DR\*04, esse genótipo confere o maior risco para a doença, seguido pela homozigose para - DR\*04 e, finalmente, para - DR\*03. Os alelos DRB1\*0405 e \*0401 são de predisposição, os \*0402 e \*0404 são neutros e os \*0403, \*0406 e \*0407 são protetores<sup>4</sup>. Em caucasianos, os alelos - DQA1\*0301, - DQB1\*0302 e - DQA1\*0501, - DQB1\*0201 são os mais importantes na suscetibilidade ao diabetes autoimune e encontram-se em desequilíbrio de ligação com os alelos HLA-DR\*04 e DR\*03, respectivamente, influenciando no risco de evolução para DM1A determinado por aqueles alelos<sup>4</sup>. Por outro lado, alguns haplótipos são protetores para DM1A, particularmente HLA-DRB1\*1501/DQA1\*0102-DQB1\*0602 (DR2-DQ6), sendo o alelo \*0602 o principal responsável pela proteção<sup>5</sup>.

O segundo maior locus de susceptibilidade para o DM1A, denominado IDDM2, situa-se na região 5' do gene da insulina (INS), no cromossomo 11p15 e contribui com 10% da suscetibilidade genética para a doença. A maior

associação com DM1A foi definida para a região minissatélite não transcrita, altamente polimórfica, com números variáveis de repetições consecutivas (VNTR), composta de 14 a 15 pares de base de oligonucleotídeos que se repetem. Esta região compreende três classes de alelos divididos de acordo com seu tamanho, que é determinado pelo número de repetições: 26-63 repetições (alelos de classe I), 140-200 repetições (alelos de classe III), sendo os alelos de classe II, intermediários, extremamente raros. Os alelos de classe I são considerados de susceptibilidade para DM1A, com risco relativo variando de 1,9 a 3,5 nas diferentes populações<sup>6</sup>. Os alelos de classe III, considerados protetores, estão associados à redução de 60% a 70% no risco de desenvolver DM1A. Condicionam, no timo, níveis mais elevados de RNAm da insulina e da proteína pré-pró-insulina, que é um antígeno-chave na patogênese do diabetes. A maior transcrição tímica de insulina modulada pelos alelos de classe III aumenta a probabilidade de seleção negativa das células T tímicas auto-reativas, conferindo melhor tolerância imune nos indivíduos portadores desses alelos<sup>5</sup>.

## 1.2 DM1A e autoimunidade

O diabetes mellitus tipo 1 é uma doença autoimune crônica onde clones de células T auto-reativas destroem as células  $\beta$  pancreáticas, levando à dependência de insulina exógena<sup>7</sup>. Inúmeras evidências corroboram a natureza autoimune desta patologia: a presença de infiltrado

mononuclear dentro e ao redor das ilhotas (insulite); a presença de marcadores de autoimunidade humorais e celulares contra as células beta; a associação do DM1A com outras doenças autoimunes; a associação com determinados haplótipos do sistema HLA. Os autoanticorpos relacionados às ilhotas pancreáticas podem ser detectados no sangue periférico de indivíduos com risco para desenvolver DM1A vários anos antes das manifestações clínicas da doença e incluem: autoanticorpos anti- insulina (IAA), anti-ilhota (ICA), anti descarboxilase do ácido glutâmico 65 (anti-GAD65) e anti tirosina fosfatase (IA2). Entretanto, nem todos os indivíduos portadores dos autoanticorpos desenvolvem diabetes plenamente manifesto, o que indica que a insulite, embora seja um pré-requisito, nem sempre é progressiva. Além disso, os autoanticorpos pancreáticos aparentam não ter participação direta na morte das células beta: o processo destrutivo é mediado pela infiltração de linfócitos T CD4 e CD8 auto-reativos.<sup>7</sup>

Progresso considerável já foi feito no entendimento da patogênese das doenças autoimunes, e a perda de tolerância central e/ou periférica constitui ponto crítico na gênese da autoimunidade<sup>8</sup>. Na tolerância central, as células T autoreativas são destruídas no timo através de vias de apoptose. A maioria dos estudos com modelos animais de DM1A mostram que, nessa condição, as células T autoreativas são resistentes a apoptose central, o que predispõe ao surgimento da doença autoimune<sup>9</sup>. Há também evidências que esta resistência central à apoptose das células T autoreativas contribua para o desenvolvimento do DM1A em humanos<sup>10</sup>.

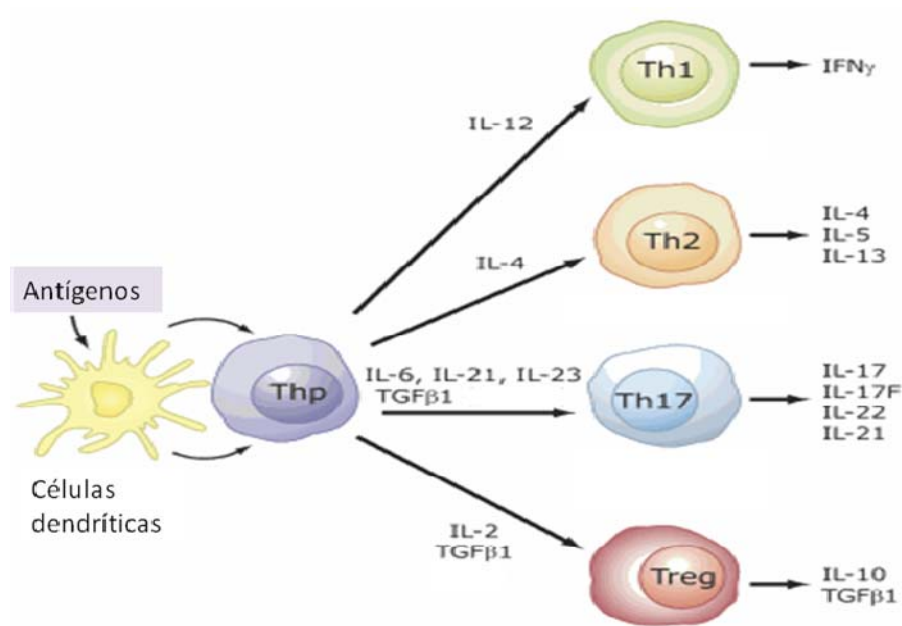
Já a tolerância periférica é exercida através de múltiplos mecanismos, sendo um dos principais a ação das células T regulatórias (Treg): estas células controlam o desenvolvimento, o tráfego e a proliferação das células T efetoras. As células Treg são principalmente as células T CD4<sup>+</sup> que apresentam alta expressão da molécula de superfície CD25 (cadeia alfa do receptor da interleucina 2) e elevados níveis de FoxP3 (*forkhead Box P3*), fator de transcrição intracelular envolvido na função regulatória. Humanos sem FoxP3 funcional apresentam a doença autoimune denominada IPEX (*Immunodysregulation polyendocrinopathy enteropathy X-linked syndrome*), com a presença de autoanticorpos contra uma grande gama de órgãos<sup>11</sup>. Recentemente, estudos mostraram correlação entre alta expressão de FoxP3 e expressão baixa ou ausente do receptor da Interleucina 7 (IL-7R ou CD127)<sup>12-13</sup>. Glicsic-Milosavljevic e colaboradores (2007) demonstraram que o nível de apoptose das células Treg é significativamente aumentado nos 6 primeiros meses do diagnóstico de DM1A em humanos, voltando a valores mais baixos após esse período<sup>14</sup>. Com isso, aventam a possibilidade de quantidades diminuídas de células Treg exercerem papel fundamental na gênese do DM1A. Apesar de bem comprovado que o processo de destruição das células beta pancreáticas se deve à infiltração de linfócitos TCD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> autoreativos, os mecanismos moleculares e as vias de citocinas que controlam esse processo destrutivo ainda não são completamente entendidos<sup>75-76</sup>.

### 1.3 Homeostase de células T e vias de ativação dos linfócitos TCD4+

A homeostase das células T, ou seja, o desenvolvimento e manutenção apropriados dos números e funções das células T são essenciais para a integridade do sistema imune<sup>15</sup>. Os progenitores das células T, provenientes da medula óssea, inicialmente migram para o timo, onde sofrem vários processos de seleção e apoptose, sendo então exportados para a periferia como células T maduras, porém *naive*. Quando as células T *naive* encontram um antígeno apropriado (apresentado pelas células apresentadoras de antígenos) elas proliferam e se diferenciam em linfócitos T efetores. Esses efetores podem ser linfócitos T *helper*, que orquestram a resposta imune por ativarem outras células imunológicas, ou linfócitos T citotóxicos, que são as células responsáveis pela erradicação de células alvo. Após a erradicação da fonte de antígenos, a maioria das células T efetoras morre através de apoptose, porém uma pequena parte destas células é mantida e se tornam as células de memória<sup>16</sup>. Proteínas de membrana podem ser utilizadas como marcadores para se distinguir funcionalmente as diferentes subpopulações de linfócitos T. A proteína de superfície CD3 caracteriza a subpopulação de linfócitos T, servindo para distingui-los dos linfócitos B e outras células imunológicas. A maioria dos linfócitos T *helper* expressa a proteína de superfície CD4, ou seja, são linfócitos T CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>. Já a maioria dos linfócitos T citotóxicos expressa a proteína de superfície CD8, sendo então CD3<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup> <sup>17</sup>.

Anticorpos específicos marcados com sondas para essas moléculas de superfície podem ser detectados por vários métodos, sendo o principal a citometria de fluxo, e são usados para identificar e isolar as várias populações de linfócitos<sup>17</sup>.

As células T *helper* (Th) CD4<sup>+</sup>, quando ativadas, orquestram as respostas imunes ao se diferenciarem em vários subconjuntos de células T, que atuam de maneiras diferentes, realizando funções específicas. Esta diferenciação depende dos padrões específicos de secreção de citocinas aos quais as células Th são expostas. Classicamente acreditava-se que as células TCD4<sup>+</sup> poderiam se subdividir em duas populações efetoras distintas, T *helper* 1 (Th1) e T *helper* 2 (Th2). A diferenciação das células T *helper* é definida pela habilidade da célula de produzir, seletivamente, grandes quantidades de citocinas efetoras específicas quando há exposição a determinado antígeno. Células Th1 são, tipicamente, produtoras de IFN- $\gamma$ , IL-2, TNF- $\beta$  e TNF- $\alpha$ , sendo essenciais para o estabelecimento de respostas imunes celulares, caracterizadas por um infiltrado rico em neutrófilos polimorfonucleares, linfócitos e macrófagos e pela formação de granulomas. As células Th2 produzem, caracteristicamente, IL-4, IL-5, IL-13 e são importantes indutoras da síntese de IgE e anticorpos pelas células B (Figura 1).



**Figura 1:** Vias de ativação de linfócitos TCD4+. As células T progenitoras (Thp) diferenciam-se em subconjuntos funcionalmente distintos de células T (Th1, Th2, Th17 e Treg) de acordo com a influência de citocinas específicas. As células T diferenciadas influenciam o sistema imune, em parte, através da secreção de citocinas específicas. Th = linfócito T helper; Treg = célula T regulatória; IL = interleucina; IFN- $\gamma$  = interferon gama; TGF- $\beta$  = *transforming growth factor beta*.

Recentemente foram descritas duas novas vias de ativação das células TCD4+: as vias Th17 e T regulatória.

A via Th17 representa um subgrupo diferente de células T, produtoras de interleucina 17 (IL-17),<sup>18-19</sup> que possuem papel fundamental na mediação de um grande número de doenças autoimunes<sup>20</sup>. Para que as células T *naive* se diferenciem em TH17 é, inicialmente, necessária sua exposição ao *transforming growth factor  $\beta$*  (TGF- $\beta$ ) e à interleucina 6 (IL-6)<sup>21</sup>, porém estímulos adicionais também participam desta diferenciação. Um dos principais passos para o desenvolvimento das células Th17 é que estas

células adquirem a capacidade de produzir interleucina 21 (IL-21), pois esta aquisição amplifica a geração de células Th17 de maneira autócrina<sup>22</sup>. Além disso, alguns estudos demonstraram que a IL-21 pode substituir a IL-6 no papel de promover a diferenciação inicial em Th17<sup>23</sup>. Outros estudos, entretanto, refutam esta hipótese mostrando que, em ratos, apenas a IL-6 é suficiente para o desenvolvimento da via Th17 e autoimunidade, mesmo na ausência de IL-21 ou de seu receptor (IL-21R)<sup>24</sup>.

A via T regulatória (Treg) é uma via que leva à imunossupressão e proteção contra doenças autoimunes. Também é iniciada pela presença de TGF- $\beta$ , na ausência de um ambiente pró-inflamatório, ou seja, na ausência de IL-6. As células T regulatórias compreendem as células TCD4<sup>+</sup> que apresentam grande quantidade de CD25 (cadeia alfa do receptor da IL-2 ou IL-2R $\alpha$ ) expresso em sua superfície, sendo conhecidas por T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>. Como já previamente descrito, são células importantes na manutenção da tolerância periférica e proteção contra clones de células T autoreativas.

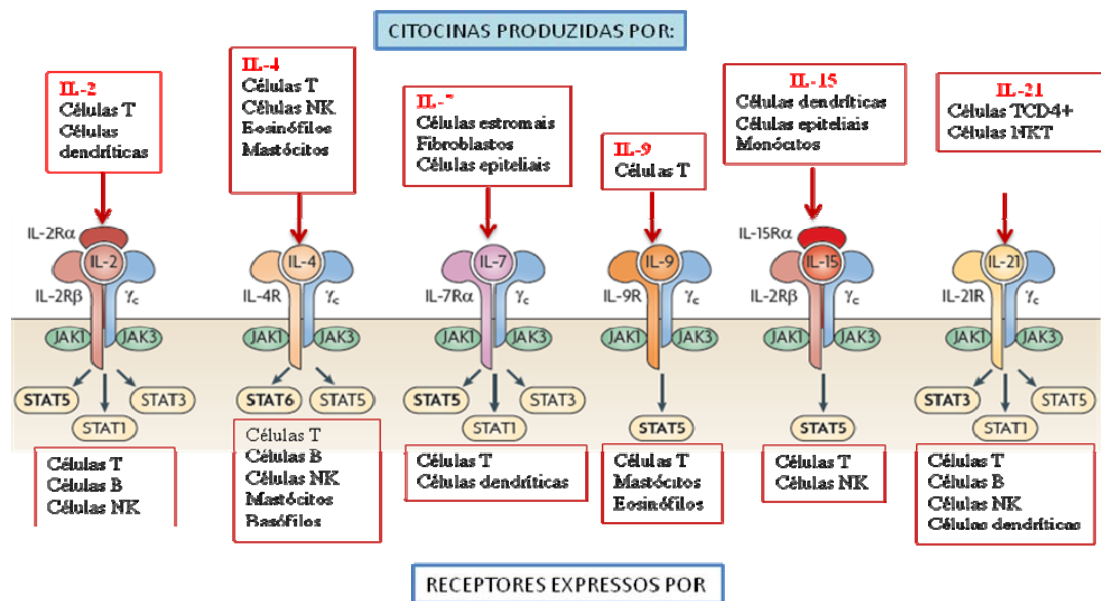
#### 1.4 Interleucinas de cadeia gama comum

A resposta imune a patógenos envolve esforços coordenados de múltiplos componentes dos sistemas linfóide e mielóide. Isto inclui a resposta imune inata, mediada por células *natural killer* (NK), células dendríticas, granulócitos, monócitos e macrófagos, e a resposta imune



adaptativa, gerada pelos linfócitos. A coordenação destas respostas fica a cargo de uma rede de citocinas responsáveis pela maturação celular e controle dos efetores.<sup>25</sup>

A família de citocinas do tipo I consiste de 6 citocinas que apresentam a cadeia gama comum em seus receptores, também conhecidas como interleucinas de cadeia gama comum. Esta família é composta pelas interleucinas (IL)-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15 e IL-21, capazes de atuar tanto na resposta imune inata quanto na adaptativa, e alterações na sua sinalização estão associadas à autoimunidade (Figura 2)<sup>26</sup>.



**Figura 2:** Interleucinas de cadeia gama comum e seus receptores. Todos os receptores apresentam a cadeia gama comum ( $\gamma_c$ ), e ativam as proteínas Janus Kinase 1 (JAK1), JAK3 e proteínas STAT (signal transducer and activator of transcription). A principal STAT ativada está em negrito. IL= interleucina; Células NK = células *Natural Killer*. (modificado de Rochman, 2009<sup>27</sup>).

### 1.4.1 Interleucina 21 e seu receptor

A IL-21 é o mais novo membro da família de interleucinas de cadeia gama comum, produzida em linfócitos TCD4+ ativados, células Th17 e células NK <sup>28-29</sup>. Seu gene localiza-se no braço longo do cromossomo 4 (4q26-q27), bem próximo ao gene codificador da interleucina 2. A IL-21 atua através da interação com seu receptor (IL-21R), expresso principalmente em linfócitos TCD4+ e CD8+, mas também em linfócitos B, células NK, células dendríticas, macrófagos e queratinócitos, o que confere espectro de ação extremamente amplo para esta interleucina. O receptor da IL-21 tem seu gene codificador localizado no braço curto do cromossomo 16 (16p11) e seus níveis de RNAm elevam-se com a ação da própria IL-21<sup>30</sup>. A localização bastante diversificada do IL-21R, aliada ao fato de sua expressão ser diretamente proporcional à da IL-21 tornam este receptor o candidato ideal para estudo da própria IL-21, pois esta apresenta meia vida extremamente curta e quantificação bastante problemática <sup>31</sup>. A IL-21, à semelhança das demais interleucinas de cadeia gama comum, atua ativando a família de proteínas JAK-quinase (tirosina-quinases intracelulares), sendo que JAK-1 liga-se ao sítio específico do IL-21R e JAK-3 liga-se ao receptor gama comum <sup>32</sup>. Através destas ligações há a ativação de STAT1 (signal transducer and activator of transcription) e STAT3, e num menor grau, de STAT5A e STAT5B. Esta ativação predominante de STAT1 e STAT3 destaca a IL-21 dos demais membros de sua família.

A IL-21 apresenta ações pleiotrópicas, dentre as quais se destacam:

- regulação da proliferação e da função das células TCD8+, em ação sinérgica com IL-15 ou IL-7<sup>30</sup>;
- ativação da proliferação e diferenciação de células B em células produtoras de imunoglobulinas<sup>33</sup>;
- aumento da atividade das células NK<sup>34</sup>;
- Inibição da apresentação de antígenos pelas células dendríticas<sup>28</sup>
- ativação e manutenção da via Th17, importante para o desenvolvimento da autoimunidade<sup>23-24</sup>;
- diminuição da indução de células Treg FoxP3<sup>+</sup> pelo TGF- $\beta$ , com possível inibição da via Treg<sup>22</sup>.

Estudos recentes demonstram um papel potencial para a interação IL-21/IL-21R na gênese e progressão de diversas doenças autoimunes, como:

### **A- Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES)**

O lúpus eritematoso sistêmico é uma doença inflamatória crônica, multissistêmica, de causa desconhecida e de natureza autoimune, caracterizada pela presença de diversos auto-anticorpos. Evolui com manifestações clínicas polimórficas, com períodos de exacerbações e remissões. De etiologia não esclarecida, o desenvolvimento da doença está ligado à predisposição genética e à fatores ambientais.

Em 2007, Herber e colaboradores<sup>35</sup> demonstraram que a IL-21 apresenta papel patogênico em modelos animais de lúpus, e que o bloqueio do IL-21R com IL-21R.Fc diminuiu a progressão da doença em ratos MRL-Faz (lpr). Estudo recente também demonstrou que o receptor da IL-21 exerce um papel crítico na patogênese do LES em ratos BXSB-Yaa, outro modelo animal de LES<sup>36</sup>.

Ainda em 2007, Sawalha e colaboradores<sup>37</sup> demonstraram associação entre dois SNPs (*Single Nucleotide Polymorphism*) no gene da IL-21 e LES em humanos. Entretanto, trabalhos envolvendo expressão de IL-21/IL-21R em humanos e sua associação com LES são bastante escassos. Um deles demonstrou diminuição da expressão do receptor da IL-21 em linfócitos B periféricos em 60 pacientes portadores de LES, quando comparados a controles sadios. Interessante notar que neste estudo a diminuição da expressão do IL-21R estava significativamente associada aos títulos de anticorpo anti-DNA nativo, ou seja, pacientes que apresentavam maiores títulos de autoanticorpos exibiam menor expressão de IL-21R<sup>38</sup>.

## **B- Artrite reumatóide (AR)**

A artrite reumatóide é uma doença autoimune humoral onde há danos aos tecidos das articulações pela presença de imunocomplexos. No infiltrado sinovial podemos encontrar linfócitos T e B, macrófagos, neutrófilos e fibroblastos. Acredita-se que a IL-21 exerça função importante na patogênese da AR por ativar a produção de anticorpos. Em modelos animais de AR já foi demonstrado que o bloqueio do receptor da IL-21 diminuiu os

sinais clínicos e histológicos da doença<sup>339</sup>. A análise de membranas sinoviais por estudos histológicos e de biologia molecular demonstrou expressão exacerbada da IL-21 e do IL-21R em pacientes portadores de AR, quando comparados a controles normais<sup>40-41</sup>.

### **C- Esclerose múltipla e Encefalite Autoimune Experimental**

A esclerose múltipla (EM) é uma doença de sistema nervoso central que ocorre quando o sistema imune ataca a camada protetora de mielina que recobre as células nervosas. Na encefalite autoimune experimental (EAE), modelo animal de EM, demonstrou-se que a IL-21 é essencial para o desenvolvimento da via Th17: ao se avaliar camundongos *knockout* para IL-21 e IL-21R, verificou-se uma grande redução na progressão da EAE<sup>22-23</sup>. Entretanto, outro estudo mostrou que o bloqueio do IL-21R exacerbava os sintomas de EAE, aumentando IL-17 e diminuindo as células Treg<sup>42</sup>. Ainda não se conhecem os mecanismos responsáveis por esses resultados experimentais tão conflitantes.

### **D- Diabetes mellitus tipo 1A**

Assim como em humanos, no modelo animal de diabetes tipo 1A, conhecido como camundongo NOD (*non-obese diabetic*), também há a destruição das células beta pancreáticas por células T ativadas. Há um grande número de genes associados com DM1A em humanos e no camundongo NOD. Além dos loci para HLA (Idd1) e gene da insulina (Idd2),

um dos locus de grande interesse atual localiza-se no cromossomo 4 nos humanos e no cromossomo 3 em camundongos (*Idd3*), e codifica as citocinas IL-2 e IL-21<sup>43-44</sup>. No camundongo NOD já foi demonstrada a diminuição da expressão do alelo da IL-2, o que explica boa parte do efeito de susceptibilidade do locus *Idd3*<sup>45</sup>. A importância da IL-21 no *Idd3* ainda é bastante controversa, pois os alelos da IL-2 e da IL-21 apresentam forte desequilíbrio de ligação, tanto que um haplótipo da IL-2 é sempre herdado com o mesmo haplótipo de IL-21<sup>46</sup>. Estudos de ligação em humanos mostraram associação da região IL-2/IL21, localizada no braço longo do cromossomo 4 (região 4q27), com DM1A<sup>47</sup>. Além disso, variações polimórficas dos genes da IL-21 e do IL-21R foram associadas com susceptibilidade genética ao DM1A de maneira aditiva<sup>48</sup>.

No camundongo NOD, a linfopenia induz à expansão homeostática de clones de células T autoreativas, e, para que esta expressão de autoimunidade ocorra são necessárias as presenças da IL-21 e do IL-21R<sup>49</sup>. Além disso, dois estudos recentes mostraram que a IL-21 participa do desenvolvimento de DM1A nestes modelos animais. Em 2008, Spolski e colaboradores verificaram que camundongos NOD *knockout* para IL-21R não apresentavam o infiltrado linfocítico pancreático típico do DM1A<sup>50</sup>. Já em 2009 Sutherland e colaboradores mostraram resultados semelhantes: camundongos NOD *knockout* para IL-21R eram resistentes à insulite, não produziam autoanticorpos e não evoluíam para a doença<sup>51</sup>. Entretanto, ainda não existem na literatura trabalhos demonstrando a expressão e o papel da IL-21 e do IL21-R no DM1A em humanos.

### 1.4.2 Interleucina 2 e seu receptor

A interleucina 2 é produzida principalmente por linfócitos TCD4<sup>+</sup> ativados e exerce suas atividades biológicas ao se ligar ao seu receptor de alta afinidade, o IL-2R. O IL-2R é formado por 3 subunidades: a cadeia  $\alpha$  (IL-2R $\alpha$  ou CD25); a cadeia  $\beta$  (IL-2R $\beta$  ou CD122) e a cadeia  $\gamma$ , comum a todos os receptores de interleucinas de cadeia gama comum (figura 2) <sup>52</sup>.

A IL-2 exerce efeitos sobre uma grande variedade de tipos celulares, mas suas funções mais importantes dizem respeito aos linfócitos T: ela promove a proliferação e expansão de linfócitos TCD4<sup>+</sup> e TCD8<sup>+</sup> antígeno-específicos. Nas células TCD4<sup>+</sup>, a IL-2 estimula a diferenciação nas vias Th1 e Th2, induz a apoptose de linfócitos T ativados e ajuda no desenvolvimento das células Treg<sup>53</sup>. Além disso, a IL-2 também aumenta a atividade citotóxica de linfócitos TCD8<sup>+</sup> e ativa a proliferação de células T CD8<sup>+</sup> de memória.

Acredita-se que o principal papel da IL-2 seja promover *downregulation* de respostas imunes, com o intuito de prevenir a autoimunidade. Estes efeitos supressores podem ser obtidos de duas maneiras: ativação de vias pró-apoptóticas, através do aumento da expressão do ligante FAS (FasL) em células T ativadas<sup>54</sup> e aumento do desenvolvimento das células Treg<sup>55</sup>.

Já foi demonstrado em modelos animais murinos que as células TCD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> (Treg) podem prevenir o desenvolvimento de DM1A <sup>56-57</sup>. Vários estudos em humanos comparando pacientes com DM1A e controles sadios demonstraram diminuição das células TCD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> nos pacientes

diabéticos<sup>58-59</sup>. Glisic-Milosavljevic e colaboradores em 2007 observaram que pacientes com DM1A de início recente (até seis meses de diagnóstico) apresentavam níveis mais elevados de apoptose das células TCD4+CD25<sup>high</sup>, quando comparados a controles normais e diabéticos com mais de 6 meses de diagnóstico, o que sugere que níveis diminuídos de células TCD4+CD25<sup>high</sup> seja um fator marcante no desenvolvimento do DM1A.<sup>14</sup> Long e colaboradores verificaram diminuição da expressão do IL-2R em linfócitos T CD4+ de pacientes com DM1A, e demonstraram que esta alteração na sinalização da IL-2 contribuiu para redução da expressão de FoxP3, o que poderia prejudicar o correto estabelecimento da tolerância periférica<sup>60</sup>.

### 1.4.3 Interleucina 4 e seu receptor

A interleucina 4 (IL-4) é produzida principalmente por linfócitos TCD4+ ativados, mas também por células NK, mastócitos, eosinófilos e basófilos, sendo essencial para estimular a produção de imunoglobulinas IgE e IgG1 pelas células B<sup>61-62</sup>. Tem ação pleiotrópica, pois, além de ser a principal citocina de ativação da via Th2, também tem papel importante na sobrevivência e diferenciação de linfócitos T<sup>63</sup>. Em sistemas experimentais, a IL-4 também é capaz de estimular a proliferação de fibroblastos, colágeno e proteoglicanos<sup>64-65</sup>. A IL-4 está presente em grande quantidade em tecidos de pacientes com doenças inflamatórias crônicas, e exerce suas ações biológicas através de sua ligação com dois tipos de receptores. O receptor tipo I é composto de duas subunidades, IL-4R $\alpha$  (CD124) e a



cadeia gama comum, e sua expressão é restrita a células derivadas da medula óssea. O receptor tipo II é formado pela cadeia IL-4R $\alpha$  combinada com a cadeia  $\alpha$ 1 da IL-13. Os receptores tipo II são mais amplamente distribuídos, porém não são encontrados nos linfócitos T, e também transmitem os sinais da IL-13. Na maioria dos tipos celulares, a estimulação do IL-4R via IL-4 leva à ativação de STAT 6<sup>66</sup> e deleção específica de IL-4, IL-4R $\alpha$  ou STAT 6 compromete severamente a diferenciação da via Th2.

Estudo publicado em 2002<sup>67</sup> descreve possível associação entre diabetes mellitus tipo 1A e polimorfismos no gene do IL-4R. Neste trabalho foram genotipados oito SNPs no gene do IL-4R e observada evidência de ligação deste gene com DM1A. Entretanto, vários estudos posteriores descartaram associação ou interação entre os genes da IL-4 e do IL-4R e diabetes mellitus tipo 1<sup>68-69</sup>.

#### **1.4.4 Interleucina 7 e seu receptor**

A interleucina 7 (IL-7) é uma citocina produzida principalmente pelas células estromais de órgãos linfóides (timo e medula óssea)<sup>70</sup>, sendo fundamental para a homeostase dos linfócitos T desde o seu desenvolvimento até sua manutenção ao atuar como regulador central destas células T. A IL-7 é essencial para a homeostase de linfócitos TCD4<sup>+</sup>, enquanto que para a homeostase de células T CD8<sup>+</sup>, é necessária sua interação com a IL-15<sup>71-72</sup>. A IL-7 é capaz de afetar a sobrevivência de células T periféricas CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> por promover aumento da expressão de

proteínas pró-sobrevivência, como a proteína inibidora de apoptose bcl-2, além de redistribuir proteínas pró-apoptóticas, como Bax e Bad<sup>73</sup>. Estudos com camundongos mostraram que, em animais deficientes de IL-7 ou IL-7R, o desenvolvimento das células T no timo era prejudicado<sup>74-75</sup>. A IL-7 também é um importante fator de sobrevivência para as células T na periferia: ela aumenta a sobrevivência e a proliferação de células T *naive* que expressem altos níveis de IL-7R $\alpha$ <sup>76</sup>.

Para que esta citocina exerça suas funções biológicas, ela deve se ligar ao seu receptor de alta afinidade, o IL-7R. A interação IL-7/IL-7R ativa a via Jak/STAT, levando à ativação de STAT5<sup>77</sup>. O receptor da IL-7 é formado por uma cadeia alfa (CD127), além da cadeia gama comum. A expressão do IL-7R $\alpha$  é regulada de maneira dinâmica por vários fatores, incluindo várias citocinas<sup>73</sup>. As citocinas pró-sobrevivência (IL-2, IL-4, IL-6, IL-7 e IL-15) podem suprimir a expressão do IL-7R $\alpha$ , enquanto que IFN $\alpha$ - $\beta$ , TNF- $\alpha$  e glicocorticóides podem aumentar a expressão deste receptor<sup>73</sup>. Estudos recentes mostraram que o IL-7R, ao ativar proteínas STAT5, também contribui para o desenvolvimento e função das células Treg e homeostase periférica de células T<sup>78</sup>.

#### **1.4.5 Demais interleucinas de cadeia gama comum**

Duas outras citocinas completam a família de interleucinas de cadeia gama comum: interleucina 9 (IL-9) e interleucina 15 (IL-15).

A IL-9 é produzida por linfócitos TCD4+ ativados, principalmente por células da via Th2, mas também por componentes da via Th17<sup>79</sup>. A IL-9 atua como fator proliferativo para linfócitos T, e exerce suas atividades através da ligação com seu receptor específico. O receptor da IL-9 (IL-9R) é composto por duas subunidades: a cadeia alfa específica e a cadeia gama comum. A ligação da IL-9 com seu receptor leva ao recrutamento de Jak1 e Jak3, com subsequente ativação de STAT1, STAT3 e STAT5.<sup>80-81</sup> Estudo recente demonstrou que a IL-9 é capaz de induzir a diferenciação de células Th17, além de aumentar a função das células Treg FoxP3+ naturais<sup>79</sup>.

A interleucina 15 tem muitos efeitos biológicos semelhantes a IL-2, principalmente porque ambas sinalizam através de receptores com duas subunidades idênticas. Suas ações principais estão relacionadas ao desenvolvimento, crescimento e função das células NK e linfócitos T CD8+, não atuando em células T CD4+.<sup>82</sup> O receptor da IL-15 é um complexo formado por três subunidades: a cadeia IL-2R $\beta$ , a cadeia gama comum e a subunidade alfa específica. A ligação da IL-15 ao seu receptor ativa Jak1 e Jak3, com posterior ativação de STAT3 e STAT5. Por ativar STAT5, cogita-se que a IL-15 e sua interação com IL-15R também contribua para o desenvolvimento e manutenção das células Treg<sup>27</sup>.

## **1.5 Justificativa para o estudo dos receptores das interleucinas de cadeia gama comum em pacientes com DM1A**

A etiologia do DM1A é complexa, com múltiplos fatores agindo em conjunto para a gênese e progressão da doença. Atualmente sabe-se que o DM1A é causado diretamente pela infiltração pancreática de linfócitos T CD4 e CD8 autoreativos e linfócitos B, levando à destruição das células  $\beta$  pancreáticas e conseqüente deficiência de insulina. Entretanto, ainda não se conhecem os mecanismos moleculares e as citocinas que controlam o surgimento deste processo inflamatório. As interleucinas de cadeia gama comum participam da homeostase de linfócitos T CD4+, CD8+, linfócitos B, células NK e vários outros componentes do sistema imune, atuando tanto na imunidade inata quanto na adaptativa. Apesar de exercerem inúmeras funções essenciais ao controle imunológico, o papel destas interleucinas e seus receptores no diabetes mellitus tipo 1 em humanos ainda não foi elucidado. Portanto, o estudo destes receptores de interleucinas de cadeia gama comum pode contribuir para melhor entendimento dos mecanismos autoimunes associados à patogenia do DM1A.

## ***2 Objetivos***

Avaliar o papel dos receptores das interleucinas de cadeia gama comum na patogênese do DM1A através de:

- Determinação da expressão da proteína de superfície e do RNA mensageiro dos receptores das interleucinas de cadeia gama comum (IL-21R, IL-2R $\alpha$  e  $\beta$ , IL-4R e IL-7R) em pacientes com DM1A de início recente em comparação com indivíduos controles normais;
- Correlação dos valores de expressão dos receptores das interleucinas de cadeia gama comum com expressão de autoimunidade (títulos de autoanticorpos pancreáticos).

## ***3 Métodos***

### 3.1 Considerações éticas

Este estudo foi conduzido de acordo com princípios éticos, seguindo as orientações contidas na declaração de Helsinki. Consentimento por escrito foi obtido de todos os pacientes, pais ou tutores antes que os procedimentos de pesquisa fossem iniciados. O protocolo de estudo foi submetido ao comitê de ética da instituição (CAPPesq) e aprovado.

### 3.2 Casuística

#### 3.2.1 Pacientes

Nosso grupo de estudo foi composto por 35 pacientes portadores de diabetes mellitus tipo 1 de início recente (máximo 6 meses de diagnóstico). Foram utilizados os seguintes critérios de seleção:

#### **Critérios de Inclusão:**

- Diagnóstico laboratorial de diabetes: 2 glicemias de jejum acima de 126 mg/dl e/ou 1 glicemia aleatória acima de 200 mg/dl com sintomas clínicos de diabetes (polifagia, perda de peso, poliúria, polidipsia);



- Evidência laboratorial de diabetes autoimune: presença de 1 ou mais autoanticorpos pancreáticos positivos e/ou alelos HLA de risco para DM1A;
- Necessidade precoce e mantida de insulino terapia;
- Idade entre 1 e 18 anos.

**Critérios de exclusão:**

- Diabetes de causa não autoimune;
- Presença de patologias cardíacas, hepáticas, renais ou pulmonares crônicas ou agudas;
- Uso de medicações (exceto insulina).

Dentre os pacientes inicialmente selecionados para o estudo (n=37) dois foram excluídos, por apresentarem diabetes de causa não autoimune e doença hepática crônica, respectivamente.

**3.2.2 Controles**

O grupo controle foi composto por 25 indivíduos saudáveis, de faixa etária semelhante à dos pacientes portadores de diabetes mellitus tipo 1A, sem história familiar de diabetes mellitus tipo 1A e antecedente de qualquer doença autoimune. Foram excluídos indivíduos que apresentaram

autoanticorpos pancreáticos positivos (1 indivíduo) ou que estivessem em uso de quaisquer medicamentos hormonais (1 indivíduo em uso crônico de corticóides).

### **3.3 Avaliação hormonal e bioquímica:**

Foram dosados glicemia, hemoglobina glicada e peptídeo C em jejum através de kits comerciais.

### **3.4 Genotipagem dos alelos HLA -DR e -DQ**

O DNA genômico obtido de sangue total colhido com EDTA foi separado pelo método de “*Salting-out*”. A amplificação dos alelos HLA-DRB1 e DQB1 foi realizada pela técnica de PCR alelo específica (PCR SSP - Sequence Specific Primers) utilizando o conjunto diagnóstico de tipagem para DRB1 genérico e DQB1 subtipagem (Micro SSP™ Allele Generic and Specific HLA classe II DNA Typing Tray-One-Lambda INC). O conjunto para análise dos alelos DRB1 constituiu-se de 23 diferentes oligonucleotídeos iniciadores de seqüências específicas e do gene da  $\beta$ -globina humano utilizado como controle negativo. O conjunto para análise dos alelos DQB1 constituiu-se de 31 diferentes oligonucleotídeos iniciadores de seqüências específicas e do gene da  $\beta$ -globina humano. Acrescentou-se aos tubos

contendo os iniciadores uma mistura de oligonucleotídeos, alíquotas de DNA (100 ng) e a enzima Taq-DNA-polimerase - 5 unidades/L (2,5 µL para DRB1 e 3,5 µL para DQB1). A seguir foram submetidos à amplificação com ciclos pré-definidos pelo fabricante em termociclador MJ. As amostras de DNA amplificado foram transferidas e submetidas à eletroforese em gel de agarose (2,5%), corado com brometo de etídio. As bandas foram visualizadas após exposição à luz ultravioleta por sistema de fotografia e as fotos, arquivadas em computador e analisadas através de programa específico fornecido pelo fabricante (One Lambda DNA/LMT versão 3.8).

### **3.5 Determinação dos autoanticorpos pancreáticos:**

#### **Anticorpos anti-descarboxilase do ácido glutâmico 65 (anti-GAD65) e Anti-proteína homóloga à tirosina-fosfatase (anti-IA2)**

As dosagens dos anticorpos anti-GAD65 e anti-IA2 foram realizadas por radioimunoensaio (reagentes da RSR, UK), onde o antígeno recombinante (GAD 65 ou IA2) marcado com I<sup>125</sup> foi incubado à temperatura ambiente (para anti-GAD65) e à 4°C (para anti-IA2) por 16 a 24 horas respectivamente com o soro a ser analisado. Os complexos antígeno-anticorpo formados foram tratados com suspensão de proteína A. O imunocomplexo marcado agregado foi separado por centrifugação e a quantificação de I<sup>125</sup>, presente no precipitado contendo o imunocomplexo, efetuada em contador gama automático (Cobra II, Perkin-Elmer). A quantificação dos anticorpos foi realizada por extrapolação a

partir de curva padrão realizada no mesmo ensaio. Foram efetuadas curvas padrão com concentrações de anti-GAD65 variando entre 0,1 U/mL a 300 U/mL e com anti-IA2 variando entre 0,1 a 50 U/mL. O nível médio de anti-GAD65 obtido no nosso laboratório em 282 indivíduos controles foi  $0,12 \pm 0,23$  U/mL e os coeficientes de variação intra e inter ensaios, 3 e 5,5%, respectivamente. Foram consideradas negativas as amostras com anti- GAD65 de 0 a 0,8 U/mL (média  $\pm$  3DP), e valores  $> 0,8$  U/mL, considerados positivos. A nossa população controle apresentou valores médios de anti-IA2 de  $0,07 \pm 0,13$  U/mL. Foram consideradas negativas as amostras com anti-IA2 variando entre 0 a 0,5 U/mL (média  $\pm$  3DP), e valores  $> 0,5$  U/mL, considerados positivos. As variações intra e inter ensaio foram 4,3% e 3,4%, respectivamente.

### **3.6 Citometria de fluxo**

A citometria de fluxo é uma técnica que permite uma análise rápida, objetiva e quantitativa de células em suspensão. As células da amostra em suspensão são marcadas com anticorpos monoclonais específicos ligados a fluorocromos, que permitem a identificação e a quantificação de células pelo tamanho, granulosidade e intensidade de fluorescência. Após a marcação específica, as células são introduzidas numa câmara de fluxo vibratória. O fluxo de células que atravessa a câmara é envolvido por uma solução tampão, sendo que 500 a 10000 células ou partículas passam em fila simples por segundo pelo sensor eletrônico. O fluxo é iluminado por laser de

argônio (azul), que tem comprimento de onda de 488 nm. Cada célula é avaliada com relação ao tamanho (dispersão de luz anterior), granulocidade (dispersão de 90°) e intensidade de fluorescência para detecção de antígenos de superfície diferentes (imunofenotipagem). A avaliação do tamanho relativo da célula ("*Forward scatter – FSC*") e da granulocidade ou complexidade interna da célula ("*Side Scatter – SSC*") permite a classificação dos leucócitos em linfócitos, monócitos e granulócitos. A avaliação da intensidade média de fluorescência (MFI) ocorre para detecção de antígenos de superfície diferentes marcados com anticorpos monoclonais específicos para cada célula individualmente. Portanto, a citometria de fluxo pode fornecer dois tipos de informações:

- 1) avalia dentro da população celular estudada a quantidade total de células que expressam determinada molécula de superfície. Este resultado é dado em porcentagem em relação ao total da população celular estudada;
- 2) avalia para cada célula a quantidade de moléculas de superfície expressas. Este resultado é a intensidade média de fluorescência (MFI), expresso em logaritmo de base 10.

A citometria de fluxo foi realizada em sangue total, coletado em K<sub>3</sub>EDTA, sendo as amostras processadas imediatamente após a chegada ao laboratório.

Foi feita marcação direta com anticorpos (painéis com quatro marcações), utilizando os anticorpos: CD3-FITC, CD4-ECD, CD8-PC5,

CD19-PE, CD56-PE/CY5 (Beckman Coulter, Fullerton, CA), CD25-PE, CD122-PE, CD124-PE, CD127-PE e IL-21R-PE (R&D Systems, Minneapolis, MN). Foram também utilizados controles isotípicos IgG1-FITC, IgG1-PE, IgG1-PC5. (Immunotech -France).

Procedeu-se da seguinte maneira: 70 µl de sangue total foram incubados com anticorpos monoclonais em doses que variaram de 2 a 5 µl por tubo. Após 20 minutos de incubação em ambiente protegido da luz, as amostras foram lisadas em equipamento MULTI Q-PREP (Beckman-Coulter - USA), utilizando kit de lise de hemácias IMMUNOPREP (Beckman-Coulter - USA).

As amostras foram analisadas no citômetro de fluxo COULTER EPICS-XL MCL (Beckman-Coulter), equipado com laser de argônio, de 488 nm, com capacidade para análise de quatro fluorescências diferentes, em programa SYSTEM II. O alinhamento do laser do equipamento foi verificado com a utilização de pérolas de poliestireno, marcadas com fluorocromos, FLOW-CHECK (Beckman-Coulter). Foram adquiridas 10.000 células dentro do *gate* de linfócitos, no gráfico de FSC X SSC. As fluorescências foram analisadas em gráficos de quadrante (ou dot plot): FL4 X FL2; FL4 X FL3; FL1 X FL2; FL1 X FL3. Posteriormente, os resultados foram salvos em modo *listmode* do programa Summit v 4.0, e as amostras reanalisadas utilizando *gate* em células TCD3+. Os valores em percentual obtidos no citômetro foram transformados em valores absolutos com base no número total de linfócitos obtidos em contador hematológico CELL-DYN 1400 (Abbott).

### **3.7 Reação de cadeia de polimerase (PCR) em tempo real**

#### **3.7.1 Extração de RNA total e obtenção de c-DNA**

A extração do RNA total foi realizada pelo método do tiocianato de guanidina-fenol-clorofórmio (Trizol<sup>®</sup>). Após adicionar Trizol<sup>®</sup> ao “pellet” de leucócitos, foram acrescentados 200  $\mu$ L de clorofórmio para cada 1 mL de TRIZOL<sup>®</sup>, sendo a solução vigorosamente agitada e deixada em repouso em temperatura ambiente por 10 minutos. Após este período, as amostras foram centrifugadas a 12.000 g por 15 minutos a 4°C. Após esta centrifugação observou-se a formação de 3 fases da solução: um sobrenadante translúcido contendo o RNA total, uma fase intermediária leitosa (DNA) e uma fase inferior rosada (proteínas). O sobrenadante foi transferido para novos tubos, sendo acrescentados 500  $\mu$ L de isopropanol para precipitação do RNA total. As amostras foram deixadas 10 minutos em temperatura ambiente e depois centrifugadas a 12.000 g por 10 minutos a 4°C. Após esta centrifugação, o sobrenadante foi desprezado e o “pellet” de RNA, lavado uma vez com etanol 75% a -20°C, seguido por centrifugação a 7.500 g por 5 minutos.

Após remoção do etanol por inversão, deixamos o tubo contendo o “pellet” de RNA em posição invertida e à temperatura ambiente por 30 minutos para secar. A seguir, o “pellet” de RNA foi suspenso novamente em 50  $\mu$ L de água livre de RNase e incubado a 65°C por 20 minutos. Duas alíquotas de 5  $\mu$ L foram obtidas, sendo que uma foi utilizada para quantificação e avaliação da pureza do RNA total extraído em

espectrofotômetro e a outra foi submetida à eletroforese em gel de agarose a 1% com posterior visualização em transiluminador ultravioleta e fotografada com sistema digital de captura de imagem ou filme Polaroid® para avaliação da integridade do RNA extraído. O RNA extraído foi então submetido à transcrição reversa (RT – “reverse transcription step”) no qual o DNA complementar (cDNA) é produzido através do uso de iniciadores randômicos provenientes do kit Superscript III (Invitrogen). Quantidade semelhante de RNA (16 µg) foi utilizada para RT de todas as amostras.

### **3.7.2 Estudo da expressão do *IL-21R*, *IL2R $\alpha$* e *IL-2R $\beta$* por PCR em tempo real**

Após extração do RNA total e síntese de cDNA total, 25 pacientes tiveram seu cDNA submetido a reações de PCR em tempo real pelo método Taqman®, para a avaliação do nível de expressão do RNA dos genes *IL21-R*, *IL2R $\alpha$*  e *IL-2R $\beta$* . Foram utilizados, respectivamente, os seguintes ensaios Taqman® inventoriados da Applied Biosystems (Foster City, Ca, USA): Hs00222310\_m1, Hs00907777\_m1 e Hs01081697\_m1. As reações de RT-PCR em tempo real foram realizadas pelo método Taqman®, utilizando-se ABI 7000 Sequence Detection Systems. O kit Taqman®R Gene Expression Assay é composto por um par de iniciadores e a sonda FAMTM. Os iniciadores foram localizados em exons dos genes estudados com o objetivo de serem específicos para a amplificação do cDNA e não sofrerem interferência da presença de DNA genômico. Como controle endógeno,



foi utilizado o gene da  $\beta$  actina. As sondas dos genes em estudo foram marcadas com uma fluorescência - FAM, enquanto a da  $\beta$ -actina (gene endógeno) foi marcada com VIC. Estas sondas marcadas geram comprimentos de ondas bem distintos, que emitem sinais captados pela câmera CCD do aparelho

Na quantificação relativa do *IL-21R*, *IL2R $\alpha$*  e *IL-2R* utilizou-se como calibrador um pool de cDNA obtido de 10 crianças participantes do grupo controle inicial. No cálculo da quantificação, de forma a permitir uma comparação expressa em número de vezes em relação à expressão em leucócitos de crianças-controle, utilizou-se o método  $2^{-\Delta\Delta CT}$ , conforme descrito por Livak<sup>83</sup>.  $\Delta CT$  é a diferença de expressão entre o gene alvo e o endógeno de uma determinada amostra e o  $\Delta\Delta CT$  corresponde à diferença entre o  $\Delta CT$  da amostra de cada paciente e o  $\Delta CT$  do calibrador, ou seja, do pool de crianças-controle.

As reações foram preparadas em triplicata, em um volume final de 25  $\mu$ l, contando 12,5  $\mu$ l de Taqman® Universal mastermix 2X, 1,25  $\mu$ l de cada ensaio (iniciadores e sonda) 20X, 3  $\mu$ l de cDNA (obtidos a partir de 200 ng de RNA total) e H<sub>2</sub>O MiliQ a completar. Como controle de qualidade das reações, o coeficiente de variação máximo permitido nas triplicatas foi de 2%. As condições de termociclagem compreendem uma incubação a 50°C por 2 minutos, seguida pela ativação da Taq polimerase Gold a 95°C por 15 segundos, intercalados com hibridação e extensão a 60°C por minuto.

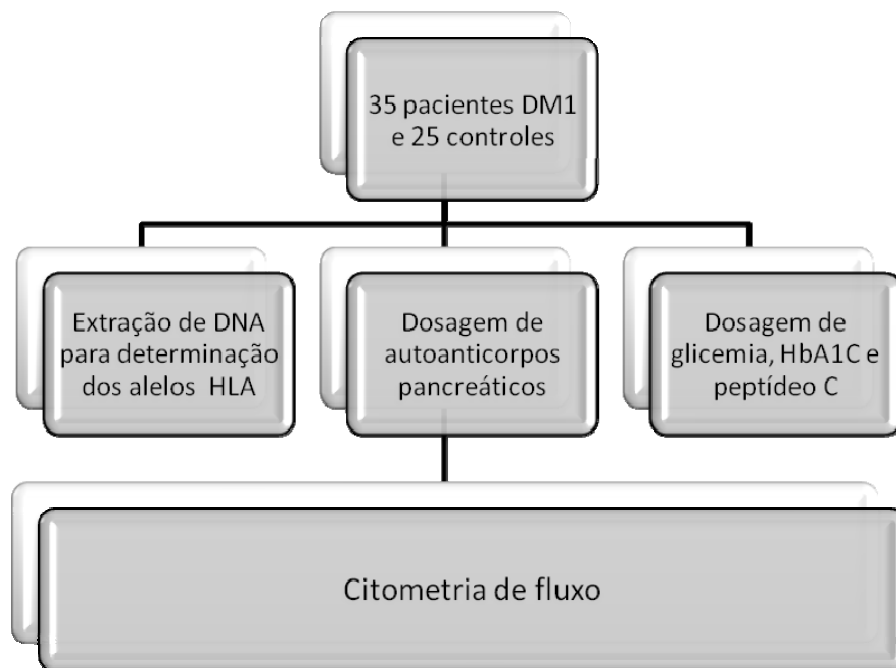
### **3.8 Análise estatística**

Os resultados são apresentados como média  $\pm$  1 desvio-padrão ou como mediana e percentis 5 e 95. O tipo de distribuição das variáveis contínuas foi analisado pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. A diferença entre os grupos para variáveis numéricas com distribuição normal foi analisada por teste T de Student, enquanto variáveis com distribuição não paramétrica foram analisadas pelo teste de Mann-Whitney. A análise de correlação entre amostras foi realizada através do teste de correlação de Pearson e, para a avaliação de três grupos simultâneos, utilizou-se o teste de ANOVA. Foi considerada significância estatística quando  $p < 0,05$ . A análise estatística foi realizada utilizando-se o programa GraphPad prism 4.0 (Graph Pad software, USA)

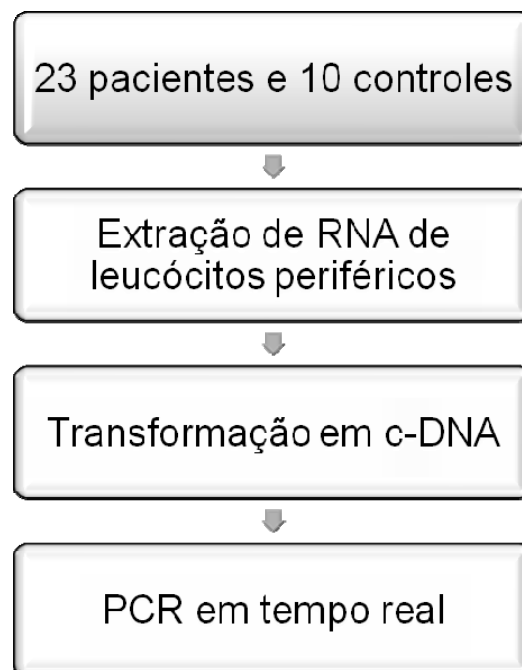
### **3.9 Estratégias do estudo**

Trinta e cinco pacientes portadores de diabetes mellitus tipo 1A de início recente (até seis meses de diagnóstico) foram inicialmente selecionados. O DNA genômico foi obtido de todos os pacientes para o estudo dos alelos HLA -DR e -DQ. Também foram dosados os autoanticorpos pancreáticos (AC anti-GAD65 e AC anti-IA2) e os níveis de glicose e peptídeo C das 35 crianças e adolescentes. Todos foram submetidos a estudo de citometria de fluxo para quantificação dos seguintes

receptores de superfície: IL-21R, IL-2R $\alpha$ , IL-2R $\beta$ , IL-4R E IL-7R. Os 25 pacientes do grupo controle foram submetidos aos mesmos procedimentos acima descritos. Na figura 3 temos o fluxograma descritivo da estratégia inicial do estudo. Posteriormente, extraímos RNA total para a síntese de c-DNA de 23 dos 35 pacientes portadores de DM1, com o intuito de realizar PCR em tempo real, método utilizado para avaliar a expressão do RNA mensageiro dos genes: *IL-21R*, *IL-2R $\alpha$*  e *IL-2R $\beta$* . Para o PCR em tempo real foi extraído o RNA total de 10 controles, sendo este pool de c-DNA utilizado como calibrador. Na figura 4 temos o fluxograma descritivo da estratégia final do estudo.



**Figura 3:** Fluxograma da estratégia inicial do estudo



**Figura 4:** Fluxograma da estratégia final do estudo

## ***4 Resultados***

#### 4.1 Caracterização dos pacientes e controles:

Foram estudados 35 pacientes portadores de diabetes mellitus tipo 1A, sendo 19 do sexo masculino e 16 do sexo feminino, com diagnóstico há no máximo 6 meses do momento da coleta (média: 3 meses). A idade dos pacientes variou entre 1 e 16 anos (média:  $8,44 \pm 4,48$  anos), e todos estavam em uso de insulina no momento da coleta. Houve predomínio da raça branca, da qual faziam parte 20 dos 35 pacientes.

Todos os pacientes relataram hiperglicemia ao diagnóstico, com ou sem cetonúria. Em nossa coleta foram dosadas glicemia e hemoglobina glicada de todos os pacientes, e apenas 3 deles apresentavam hemoglobina glicada abaixo de 6,5%. Trinta e um dos 35 pacientes apresentavam pelo menos um dos autoanticorpos pancreáticos positivos. Os quatro pacientes com autoanticorpos negativos tinham características clínicas compatíveis com DM1A, além de alelos de HLA de risco para DM1A (-DR3 e/ou -DR4). Nos anexos 1 e 2 temos respectivamente as tabelas com os dados clínicos e laboratoriais dos pacientes selecionados para o estudo.

O grupo controle foi composto por 25 crianças e adolescentes de faixa etária semelhante á dos pacientes (média: 8,1 anos), todos sem antecedentes de doença autoimune e sem história familiar de DM1. Todos os indivíduos do grupo controle apresentaram glicemia normal (64 a 95 mg/dL) e autoanticorpos pancreáticos negativos (Anexo 3).

## **4.2 Expressão dos receptores de interleucinas de cadeia gama comum determinada por citometria de fluxo**

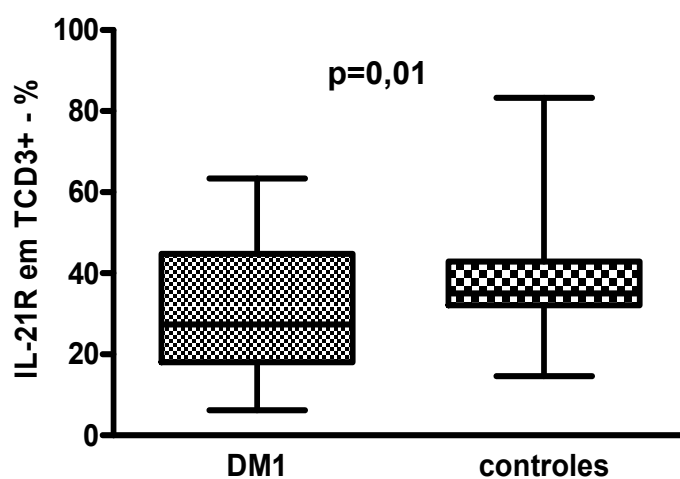
Determinamos a porcentagem de linfócitos T periféricos que expressavam os receptores de interleucinas de cadeia gama comum: IL-21R, IL-2R $\alpha$ , IL-2R $\beta$ , IL-4R e IL-7R. Em todas estas determinações não houve diferença no número de linfócitos totais ou no percentual de linfócitos T CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> ao se comparar o grupo dos pacientes diabéticos com o grupo controle (Anexo 4).

### **4.2.1 Expressão do receptor da Interleucina 21**

Verificamos, em pacientes portadores de DM1A, diminuição estatisticamente significativa da expressão de IL-21R tanto em linfócitos T CD3<sup>+</sup> (Figura 5) quanto em linfócitos TCD4<sup>+</sup> (Figura 6). Na tabela 1 temos os valores percentuais da expressão do IL-21R em cada grupo celular. No anexo 5 podemos verificar os resultados completos da citometria de fluxo em relação ao receptor da IL-21.

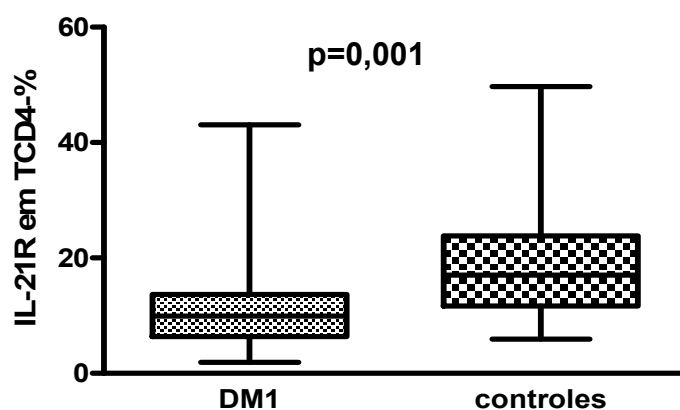
**Tabela 1:** Expressão do receptor da Interleucina-21 (IL-21R) em linfócitos T periféricos de pacientes portadores de DM1A e indivíduos controle obtida por citometria de fluxo

	Análise	Expressão de IL-21R em linfócitos T CD3+ (%)	Expressão de IL-21R em linfócitos T CD4+ (%)	Expressão de IL-21R em linfócitos T CD8+ (%)
<b>Pacientes DM1A</b>	mediana	27,40	9,67	16,50
	percentil 5	12,60	4,48	5,18
	percentil 95	56,30	31,16	30,95
<b>Indivíduos controle</b>	mediana	35,00	17,00	15,70
	percentil 5	13,60	5,20	5,20
	percentil 95	56,30	31,16	30,95
	Teste de Mann-Whitney (p=)	0,010	0,001	0,997



**Figura 5:** Expressão do receptor da interleucina 21 (IL-21R) em linfócitos T CD3<sup>+</sup> periféricos em pacientes DM1A e controles (em porcentagem)





**Figura 6:** Expressão do receptor da Interleucina-21 (IL-21R) em linfócitos TCD4<sup>+</sup> periféricos em pacientes DM1A e controles (em porcentagem).

Avaliamos também a intensidade média de fluorescência (MFI) do receptor da interleucina 21 em linfócitos totais, ou seja, para cada célula estudada, a quantidade de moléculas de superfície expressas. Verificamos diminuição estatisticamente significativa na MFI do IL-21R em pacientes portadores de DM1A quando comparados a controles sadios (Tabela 2). No anexo 6 temos os dados completos do MFI do receptor da IL-21 em pacientes e controles.

**Tabela 2:** Intensidade média de Fluorescência (MFI) para o receptor da Interleucina-21 em linfócitos T periféricos para pacientes DM1A e controles

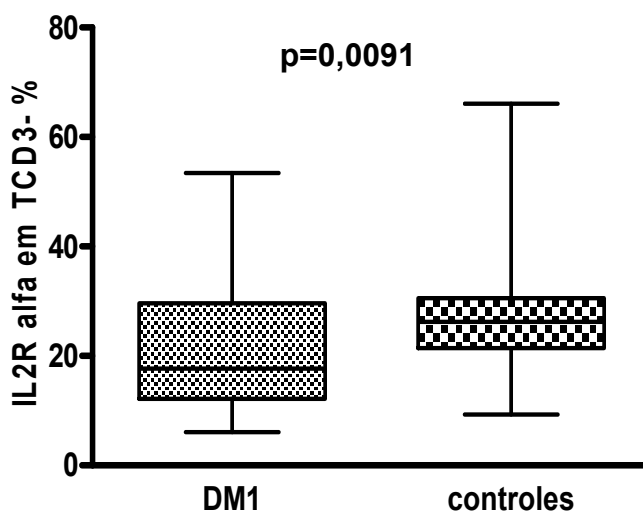
	Pacientes DM1A	Indivíduos controle
<b>Mediana</b>	1,42	12,02
<b>Percentil 5</b>	1,38	3,54
<b>Percentil 95</b>	1,55	52,35
<b>Teste de Mann-Whitney (p=)</b>	0,0124	

#### 4.2.2 Expressão da cadeia alfa do receptor da Interleucina 2 (CD25)

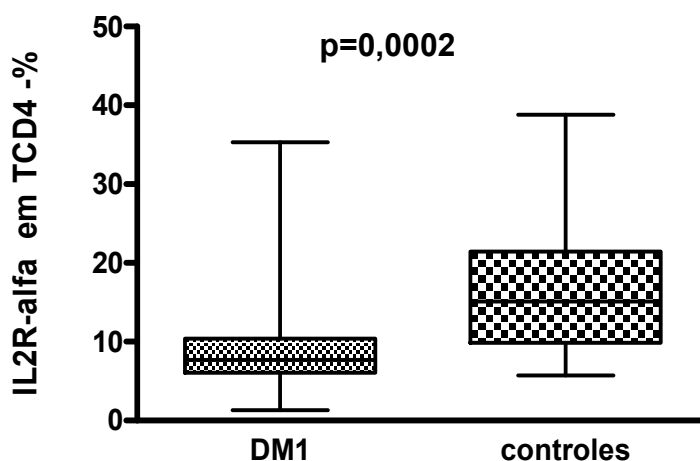
A expressão da cadeia alfa do receptor da IL-2 (IL-2R $\alpha$ ) foi menor no grupo de pacientes portadores de DM1A em linfócitos T CD3+ e CD4+ (Figuras 7 e 8, respectivamente). Não houve diferença na expressão do IL-2R $\alpha$  em linfócitos T CD8+ (Tabela 3). No anexo 7 temos as tabelas completas com todos os dados da citometria de fluxo de pacientes e controles em relação ao IL-2R $\alpha$ .

**Tabela 3:** Expressão da cadeia alfa (IL-2R $\alpha$ ) do receptor da Interleucina 2 em linfócitos T periféricos de pacientes portadores de DM1A e indivíduos controle obtida por citometria de fluxo

	Análise	Expressão de IL2R $\alpha$ em linfócitos TCD3+ (%)	Expressão de IL2R $\alpha$ em linfócitos TCD4+ (%)	Expressão de IL2R $\alpha$ em linfócitos TCD8+ (%)
<b>Pacientes DM1A</b>	Mediana	17,70	7,70	8,56
	Percentil 5	9,43	2,33	2,55
	Percentil 95	46,54	25,26	28,02
<b>Indivíduos controle</b>	Mediana	26,20	15,10	9,37
	Percentil 5	14,94	6,55	3,08
	Percentil 95	51,76	30,78	20,58
	Teste de Mann-Whitney (p=)	0,0091	0,0002	0,6199



**Figura 7:** Expressão da cadeia alfa do receptor da Interleucina 2 (IL-2R $\alpha$ ) em linfócitos T CD3<sup>+</sup> em pacientes DM1A e controles (em porcentagem)



**Figura 8:** Expressão da cadeia alfa do receptor da Interleucina 2 (IL-2R $\alpha$ ) em linfócitos T CD4<sup>+</sup> em pacientes DM1A e controles (em porcentagem).

Foi também analisada a intensidade média de fluorescência (MFI) para IL-2R $\alpha$ , e observamos diminuição significativa da MFI dos pacientes DM1A em relação aos controles (Tabela 4). No anexo 8 temos os dados completos da MFI em relação ao IL-2R $\alpha$ .

**Tabela 4:** Intensidade média de fluorescência da cadeia alfa do receptor da Interleucina 2 em pacientes DM1A e controles, em linfócitos T periféricos.

	<b>DM1A</b>	<b>Controles</b>
<b>Mediana</b>	1,41	4,38
<b>Percentil 5</b>	1,38	2,15
<b>Percentil 95</b>	1,55	9,95
<b>Teste de Mann-Whitney (p=)</b>	0,0099	

Ainda em relação ao IL-2R $\alpha$  (CD25), utilizamos o programa Summit v 4.0 (DakoCytomation, USA), que permite separar as células TCD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> (Treg) do universo das células TCD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>, sendo este resultado fornecido em porcentagem em relação ao número total de linfócitos TCD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>. O número de células Treg em 15 de nossos pacientes com DM1A de início recente foi comparado com o de 19 controles. Verificamos redução significativa no número de células Treg nos pacientes com DM1A em relação aos controles (Tabela 5 e Anexo 9).

**Tabela 5:** Porcentagem de células T regulatórias (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>) em pacientes portadores de DM1A e indivíduos controle

	<b>Pacientes DM1A</b>	<b>Indivíduos controle</b>
<b>Mediana</b>	0,86%	1,14%
<b>Percentil 5</b>	0,65%	0,93%
<b>Percentil 95</b>	0,92%	1,37%
<b>Teste de Mann-Whitney (p=)</b>	<0,0001	

### 4.2.3 Expressão da cadeia beta do receptor da Interleucina 2 (CD122)

A expressão do IL-2R $\beta$  em linfócitos TCD3+ e CD4+ foi significativamente menor em pacientes portadores de DM1A em comparação a controles normais (Tabela 6 e Anexo 10). Entretanto, não foi observada alteração estatisticamente significativa na MFI do IL-2R $\beta$  ao compararmos casos e controles (Tabela 7 e Anexo 11).

**Tabela 6:** Expressão da cadeia beta (IL2R $\beta$ ) do receptor da Interleucina-2 em linfócitos T periféricos de pacientes portadores de DM1A e indivíduos controle obtida por citometria de fluxo

Análise		Expressão de IL2R $\beta$ em linfócitos TCD3+ (%)	Expressão de IL2R $\beta$ em linfócitos TCD4+ (%)	Expressão de IL2R $\beta$ em linfócitos TCD8+ (%)
<b>Pacientes DM1A</b>	Mediana	15,40	2,80	10,60
	Percentil 5	7,03	0,67	3,60
	Percentil 95	47,28	19,44	30,68
<b>Indivíduos controle</b>	Mediana	22,10	10,40	11,30
	Percentil 5	10,96	1,62	5,91
	Percentil 95	58,58	28,26	21,36
Teste de Mann-Whitney (p=)		0,0330	0,0009	0,6628

**Tabela 7:** Intensidade média de fluorescência da cadeia beta do receptor da Interleucina 2 em em linfócitos T periféricos de pacientes DM1A e controles

	Pacientes DM1A	Indivíduos controle
<b>Mediana</b>	3,91	5,77
<b>Percentil 5</b>	0,97	2,38
<b>Percentil 95</b>	16,63	42,61
<b>Teste de Mann Whitney (p=)</b>	0,06	

#### 4.2.4 Expressão do receptor da Interleucina 4 (CD124)

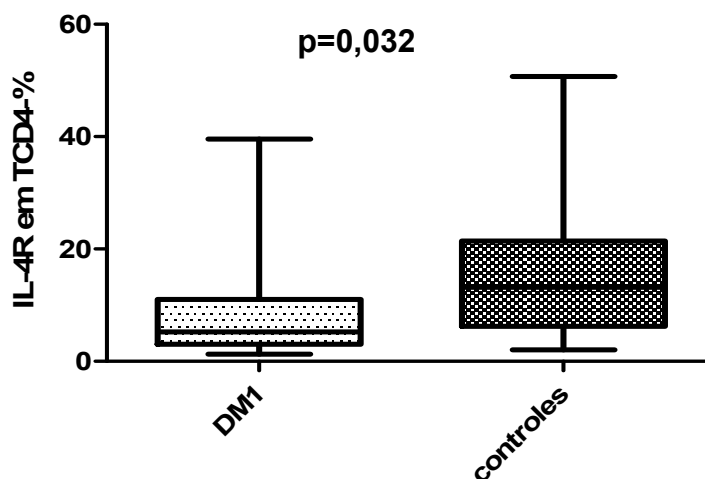
A expressão do receptor da interleucina 4 (IL-4R) em linfócitos TCD4<sup>+</sup> e sua intensidade média de fluorescência foram significativamente menores em pacientes com DM1A que em controles normais (Tabelas 8 e 9, Figura 9 e Anexos 12 e 13).

**Tabela 8:** Expressão do receptor da Interleucina 4 (IL-4R) em linfócitos T periféricos de pacientes portadores de DM1A e indivíduos controle obtida por citometria de fluxo

	<b>Análise</b>	<b>Expressão de IL4R em linfócitos TCD3+ (%)</b>	<b>Expressão de IL4R em linfócitos TCD4+ (%)</b>	<b>Expressão de IL4R em linfócitos TCD8+ (%)</b>
<b>Pacientes DM1A</b>	Mediana	18,40	5,24	11,80
	Percentil 5	7,23	2,31	3,32
	Percentil 95	48,18	33,70	30,39
<b>Indivíduos controle</b>	Mediana	26,50	13,20	10,70
	Percentil 5	11,86	3,29	5,47
	Percentil 95	57,68	31,34	22,12
	Teste de Mann-Whitney (p=)	0,060	0,032	0,319

**Tabela 9:** Intensidade média de fluorescência do receptor da Interleucina 4 em pacientes DM1A e controles, em linfócitos T periféricos.

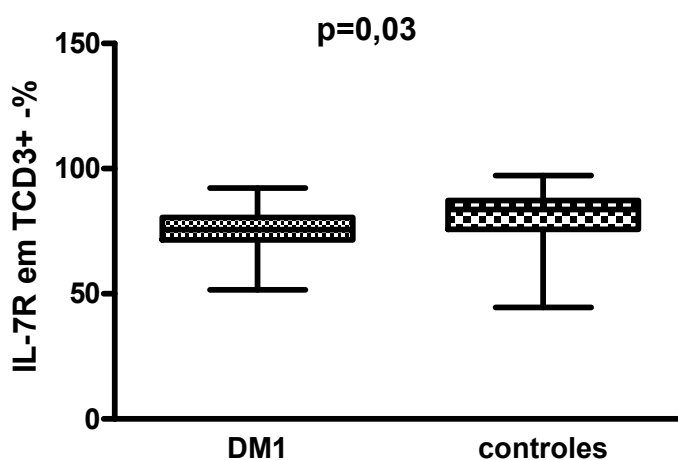
	<b>Pacientes DM1A</b>	<b>Indivíduos Controles</b>
<b>Mediana</b>	10,30	24,63
<b>Percentil 5</b>	2,93	22,66
<b>Percentil 95</b>	40,68	34,04
<b>Teste de Mann-Whitney (p=)</b>	0,02	



**Figura 9:** Expressão do receptor da Interleucina 4 (IL-4R) em linfócitos T CD4+ em pacientes DM1A e controles

#### 4.2.5 Expressão do receptor da Interleucina 7 (CD127)

Pacientes com DM1A apresentaram menor expressão do receptor da IL-7 em linfócitos T CD3+, quando comparados a controles normais (Figura 10, Tabela 10 e Anexo 14). Além disso, a intensidade média de fluorescência foi significativamente menor nos pacientes DM1A (Tabela 11 e Anexo 15).



**Figura 10:** Expressão do receptor da Interleucina 7 em linfócitos T CD3+ em pacientes DM1A e controles

**Tabela 10:** Expressão do receptor da Interleucina 7 (IL-7R) em linfócitos T periféricos de pacientes portadores de DM1A e indivíduos controle obtida por citometria de fluxo

	<b>Análise</b>	<b>Expressão de IL-7R em linfócitos TCD3 (%)</b>	<b>Expressão de IL-7R em linfócitos TCD4+ (%)</b>	<b>Expressão de IL-7R em linfócitos TCD8+ (%)</b>
<b>Pacientes DM1A</b>	Mediana	75,60	42,80	28,00
	Percentil 5	61,12	31,10	18,72
	Percentil 95	89,71	57,20	37,17
<b>Indivíduos controle</b>	Mediana	83,70	45,20	27,00
	Percentil 5	55,60	34,06	20,26
	Percentil 95	89,24	59,76	38,00
	Teste de Mann-Whitney (p=)	0,030	0,130	0,618

**Tabela 11:** Intensidade média de fluorescência do receptor da Interleucina 7 em pacientes DM1A e controles, em linfócitos T periféricos

	<b>Pacientes DM1A</b>	<b>Indivíduos controle</b>
<b>Mediana</b>	157,06	506,44
<b>Percentil 5</b>	24,46	58,40
<b>Percentil 95</b>	1794,50	1770,68
<b>Teste de Mann-Whitney (p=)</b>	0,03	

#### **4.2.6 Correlações entre expressão dos receptores de interleucinas de cadeia gama comum e títulos de autoanticorpos pancreáticos**

Não houve correlação entre os títulos de autoanticorpos pancreáticos (anti-GAD65 e anti-IA2) com a expressão dos receptores de interleucinas de cadeia gama comum em linfócitos T periféricos (Anexos 16 e 17).



### 4.3 Reação de cadeia de polimerase em tempo real (PCR em tempo real)

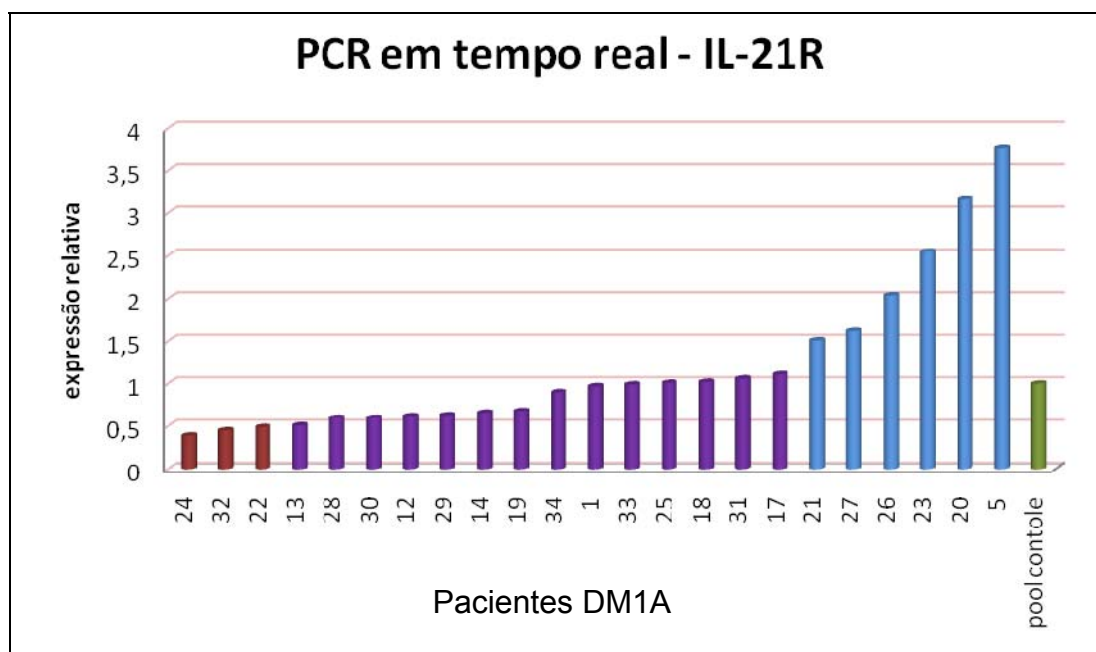
Realizamos a PCR em tempo real para quantificar a expressão do RNA mensageiro (RNAm) dos genes dos receptores de interleucinas de cadeia gama comum, e avaliar se esta correspondia à expressão das proteínas de superfície obtida através de citometria de fluxo. Avaliamos o RNAm dos receptores das três interleucinas com expressão reduzida de proteína de superfície tanto em linfócitos T CD3<sup>+</sup> quanto em CD4<sup>+</sup> de 23 pacientes portadores de DM1A. A expressão relativa (RQ) do RNAm dos genes da *IL-21R*, *IL-2R $\alpha$*  e *IL-2R $\beta$*  foi obtida pela comparação da expressão destes genes de cada paciente com a aquela obtida em um pool de cDNA de crianças controle normais. Considerou-se este pool controle com expressão relativa = 1, e utilizou-se intervalo de confiança de 0,5 a 1,5.

Para avaliarmos a correlação entre expressão de proteína de superfície e RNA mensageiro, dividimos os pacientes em três grupos, de acordo com os valores de expressão dos receptores de interleucinas de cadeia gama comum obtida na citometria de fluxo em linfócitos T CD3<sup>+</sup>:

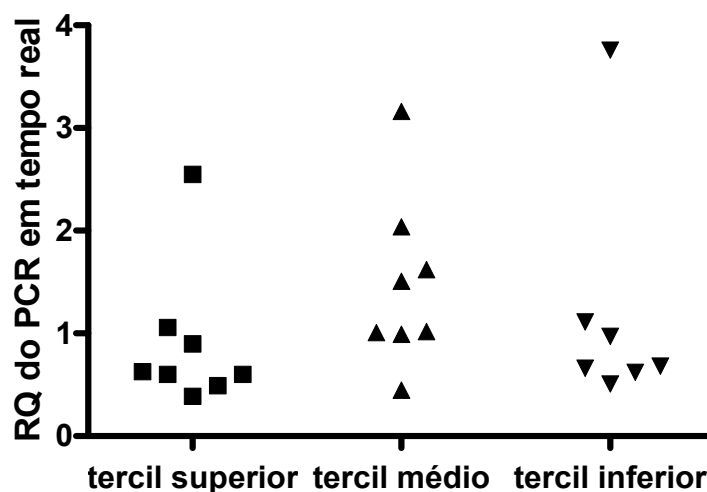
- Pacientes com maior expressão do receptor em estudo (tercil superior);
- Pacientes com expressão média do receptor em estudo (tercil médio);
- Pacientes com menor expressão do receptor em estudo (tercil inferior).

### 4.3.1 Expressão do RNAm do receptor da IL-21

Ao compararmos a expressão da proteína de superfície obtida por citometria de fluxo com a expressão do RNA mensageiro avaliada por PCR em tempo real, verificamos que não houve diferença significativa entre os três grupos de pacientes (tercis superior, médio e inferior). Na figura 11 temos os resultados completos do PCR em tempo real para *IL21R*. A figura 12 ilustra como a expressão relativa do RNA mensageiro do *IL21R* não apresenta alterações significativas entre os três grupos de pacientes. No anexo 18 temos os dados completos da comparação entre citometria de fluxo e PCR em tempo real para IL-21R.



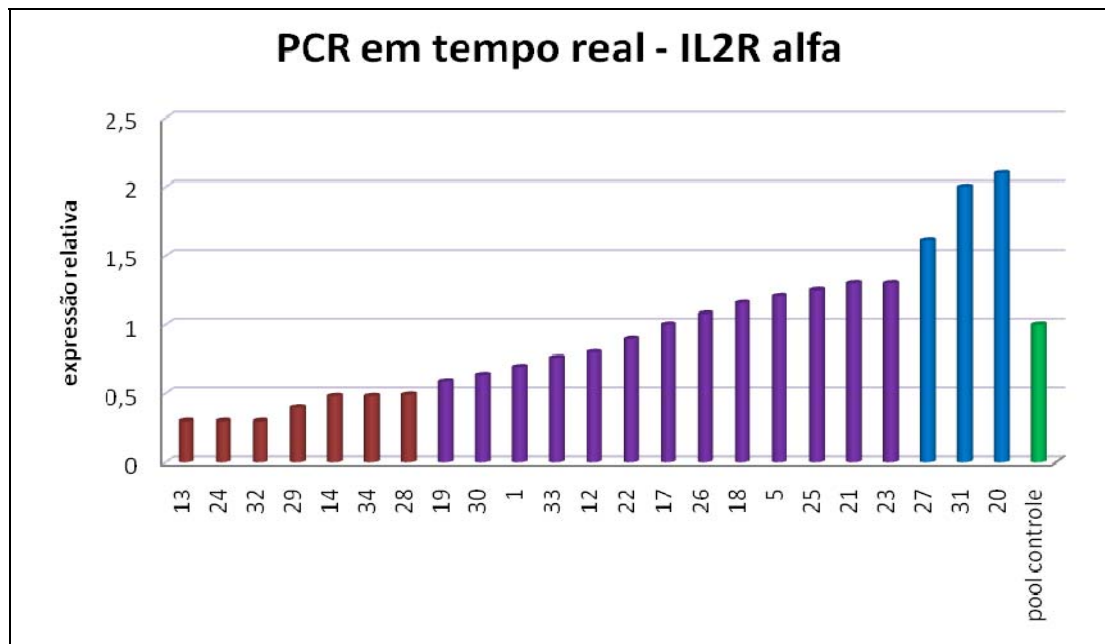
**Figura 11:** Expressão do gene do receptor da Interleucina 21 (IL-21R) em leucócitos periféricos de pacientes portadores de DM1A, em relação ao pool controle (mediana resultante do ensaio em triplicata)



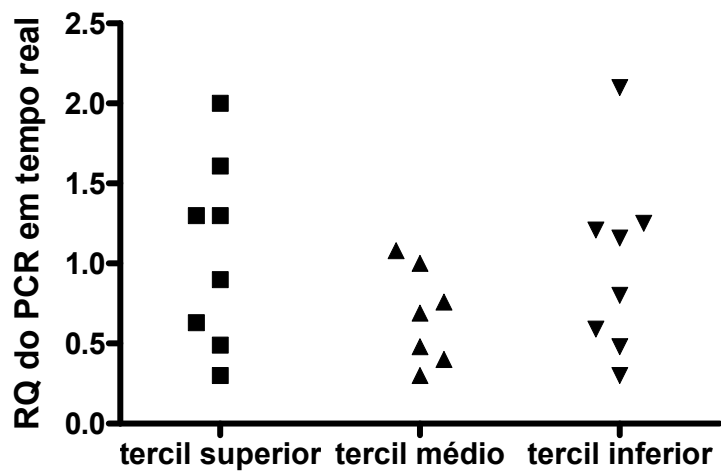
**Figura 12:** Expressão relativa (RQ) do RNAm do gene do receptor da Interleucina 21 (IL-21R) em pacientes portadores de DM1A agrupados em tercils de acordo com valores de proteína de superfície do IL-21R em linfócitos T CD3+ obtidos por citometria de fluxo

#### 4.3.2 Expressão do RNAm da cadeia alfa do receptor da IL-2

Ao compararmos a expressão da proteína de superfície do IL-2R $\alpha$  obtida por citometria de fluxo com a expressão do RNA mensageiro avaliada por PCR em tempo real, verificamos que não houve diferença significativa entre os três grupos de pacientes (tercis superior, médio e inferior). A figura 13 ilustra os resultados completos do PCR em tempo real para *IL2R $\alpha$* , e na figura 14 vemos como a expressão relativa do RNA mensageiro do *IL2R $\alpha$*  não diferiu nos três grupos de pacientes. O anexo 19 apresenta os dados completos da comparação entre citometria de fluxo e PCR em tempo real para IL-2R $\alpha$ .



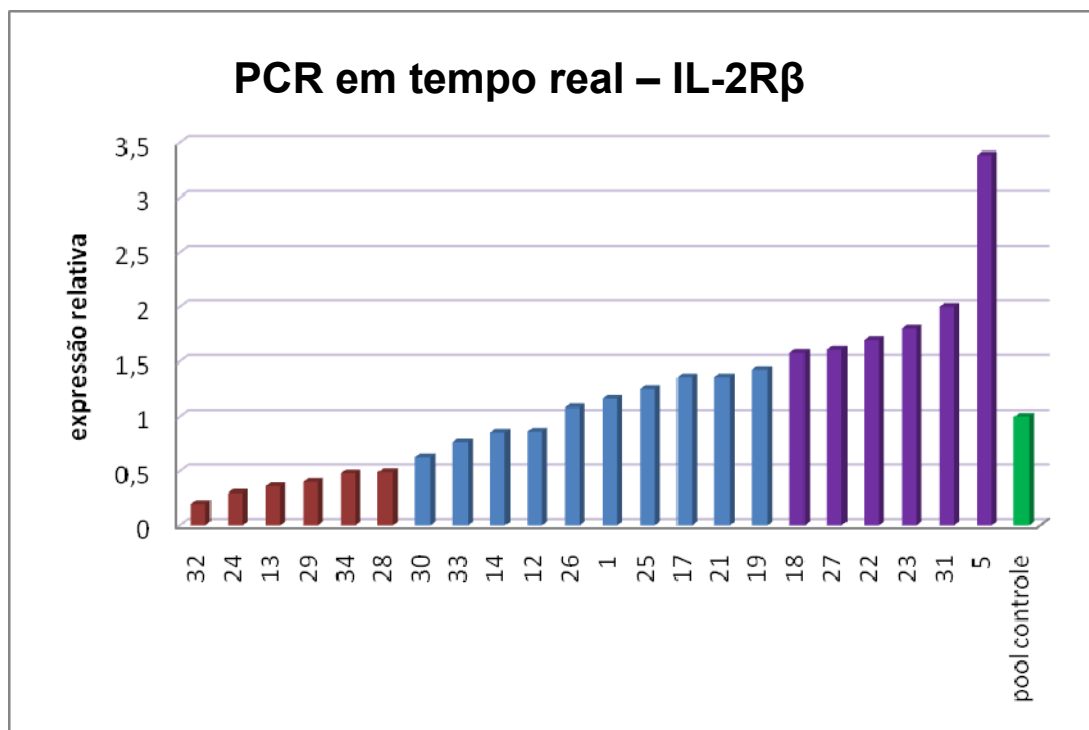
**Figura 13:** Expressão do gene da cadeia alfa do receptor da interleucina 2 (IL-2R $\alpha$ ) em leucócitos periféricos de pacientes portadores de DM1A em relação ao pool controle (mediana resultante do ensaio em triplicata).



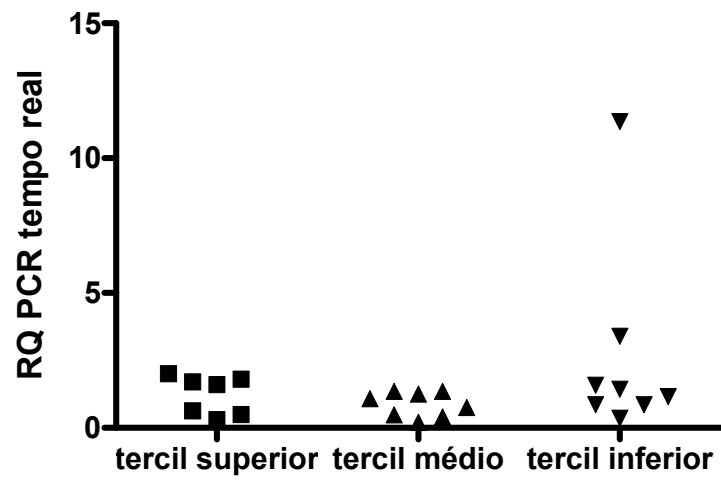
**Figura 14:** Expressão relativa (RQ) do RNAm do gene da cadeia alfa do receptor da interleucina 2 (IL-2R $\alpha$ ) em pacientes portadores de DM1A agrupados em tercis de acordo com valores de proteína de superfície do IL-2R $\alpha$  em linfócitos T CD3+ obtidos por citometria de fluxo.

### 4.3.3 Expressão do RNAm da cadeia beta do receptor da IL-2

Ao compararmos a expressão da proteína de superfície obtida por citometria de fluxo com a expressão do RNA mensageiro obtido por PCR em tempo real, verificamos que não houve diferença significativa entre os 3 grupos de pacientes (tercis superior, médio e inferior) em relação ao *IL2R $\beta$* . A figura 15 mostra os dados completos de PCR em tempo real para *IL-2R $\beta$*  enquanto a figura 16 ilustra como a expressão relativa do RNA mensageiro do *IL2R $\beta$*  não apresenta alterações significativas entre os três grupos de pacientes. No anexo 20 temos os resultados completos do PCR em tempo real para *IL2R $\beta$* .



**Figura15:** Expressão do gene da cadeia beta do receptor da interleucina 2 (*IL-2R $\beta$* ) em leucócitos periféricos de pacientes portadores de DM1A em relação ao pool controle (mediana resultante do ensaio em triplicata)



**Figura 16:** Expressão relativa (RQ) do RNAm do gene da cadeia beta do receptor da interleucina 2 (IL-2R $\beta$ ) em pacientes portadores de DM1A agrupados em tercils de acordo com valores de proteína de superfície do IL-2R $\beta$  em linfócitos T CD3+ obtidos por citometria de fluxo

## ***5 Discussão***

O diabetes mellitus tipo 1A é uma doença autoimune, poligênica e multifatorial, onde fatores genéticos, imunológicos e ambientais contribuem para a gênese e progressão da doença. Já está bem estabelecido que o processo destrutivo das células beta pancreáticas é mediado pela infiltração de linfócitos TCD4+ e CD8+ auto-reativos<sup>84-85</sup>, porém os mecanismos moleculares e as vias de citocinas que controlam este processo ainda não são completamente entendidos. Portanto, realizamos nossa pesquisa para determinar a expressão dos receptores de interleucinas de cadeia gama comum em pacientes portadores de DM1A de início recente, e assim melhor entender os mecanismos autoimunes associados à patogenia do DM1A.

Analizamos a expressão dos receptores de interleucinas de cadeia gama comum em 35 pacientes portadores de DM1A de início recente (máximo de seis meses de diagnóstico), por ser este o grupo com maior frequência de autoanticorpos e, provavelmente, maior intensidade do processo autoimune em andamento. Este grupo de pacientes foi pareado para idade e sexo com o grupo de indivíduos controle, sem história familiar de autoimunidade. Este pareamento foi necessário porque crianças de diferentes faixas etárias apresentam distinta distribuição na proporção de linfócitos em relação aos leucócitos totais.

A interleucina 21, o mais novo membro da família de interleucinas de cadeia gama comum, apresenta ações pleiotrópicas e, em geral,



pró-inflamatórias. Publicações recentes demonstram um papel potencial para a interação IL-21/IL-21R na gênese e progressão de diversas doenças autoimunes, tais como LES, artrite reumatóide e esclerose sistêmica<sup>32-38</sup>. Em se tratando de DM1A, há vários estudos em modelos animais demonstrando função importante da IL-21 e de seu receptor na gênese do processo inflamatório autoimune<sup>46-48</sup>. Entretanto, ainda não há dados acerca do papel deste receptor no desenvolvimento do DM1A em humanos.

Encontramos diminuição da expressão do IL-21R nos pacientes DM1A tanto em linfócitos T CD3+ quanto TCD4+ periféricos, quando comparada à dos controles normais. Observamos que não só o número de células que expressavam este receptor estava diminuído, como também a quantidade de receptores por célula (MFI) era menor nos pacientes DM1 que nos controles normais. Estes dados são inéditos na literatura, porém diferem dos observados em modelos animais de DM1A, onde o IL-21R é necessário para o desenvolvimento do diabetes autoimune<sup>46-48</sup>. Portanto, não podemos afastar a possibilidade de que a função deste receptor em humanos seja diferente daquela de modelos animais. No entanto, a expressão deste receptor está aumentada nos tecidos-alvo do processo inflamatório de outras doenças autoimunes em humanos. Este aumento de expressão foi verificado em material de biópsia de pele de portadores de esclerose sistêmica<sup>86</sup> e na sinóvia de pacientes portadores de artrite reumatóide<sup>38</sup>. Por outro lado, à semelhança dos nossos resultados, pacientes portadores de LES apresentaram diminuição da expressão do IL-21R em linfócitos B periféricos<sup>35</sup>. Assim, é possível que, por termos estudados células da

periferia (linfócitos T circulantes) e não diretamente as células das ilhotas pancreáticas (tecido-alvo do processo autoimune), não tenhamos observado aumento na expressão do IL-21R, visto que a periferia pode não espelhar o ambiente imunológico presente no sítio-alvo do processo autoimune. Há, ainda, a possibilidade de que na periferia ocorra um processo de *downregulation* destes receptores, na tentativa de proteção do organismo contra o processo inflamatório autoimune em atividade. A quantificação dos níveis circulantes da IL-21 seria importante para reforçar esta hipótese, porém é dificultada pelo fato da IL-21 ser produzida apenas em linfócitos TCD4<sup>+</sup> ativados e ter meia-vida extremamente curta.

A interleucina 2 é um dos principais reguladores do sistema imune, promovendo a proliferação e expansão de linfócitos TCD4<sup>+</sup> e TCD8<sup>+</sup> antígeno-específicos. Nas células TCD4<sup>+</sup> ela estimula a diferenciação nas vias Th1 e Th2 e induz a apoptose de linfócitos T ativados após o *clearance* dos patógenos. Além disso, a IL-2 aumenta a atividade citotóxica de linfócitos TCD8<sup>+</sup> e ativa a proliferação de células T CD8<sup>+</sup> de memória<sup>51</sup>. A IL-2 também induz tolerância imunológica, em parte devido ao fato de regular a formação de células T regulatórias<sup>27, 87</sup>. Para que a IL-2 exerça suas funções, é necessária sua interação com seu receptor de alta afinidade, o IL-2R, formado por 3 subunidades: cadeia  $\alpha$  (IL-2R $\alpha$ ); cadeia  $\beta$  (IL-2R $\beta$ ) e a cadeia  $\gamma$  comum. Long e colaboradores (2010) verificaram diminuição da sinalização do IL-2R em linfócitos T CD4<sup>+</sup> periféricos de pacientes com DM1A, porém com expressão de IL-2R mantida, e demonstraram que este defeito na sinalização da IL-2 contribuiu para

diminuição da expressão de FoxP3 em células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatórias.<sup>60</sup> A manutenção da expressão de IL-2R neste estudo pode ser creditada ao maior tempo de diagnóstico dos pacientes diabéticos e à população estudada, composta apenas de adultos (idades entre 18 e 58 anos). Em nosso estudo, através da citometria de fluxo, verificamos diminuição da expressão das cadeias alfa e beta do receptor da interleucina 2 em linfócitos T CD3<sup>+</sup> e CD4<sup>+</sup> periféricos. À semelhança dos resultados verificados para o IL-21R, esta menor expressão também se estendeu ao número de receptores por célula, com redução significativa do MFI do IL2R $\alpha$  e tendência à diminuição do MFI do IL-2R $\beta$ . Portanto, é possível que estas alterações verificadas na sinalização do IL-2R prejudiquem o desenvolvimento adequado da tolerância periférica, contribuindo assim para o estabelecimento do diabetes mellitus tipo 1A. A IL-21 também tem papel regulador global na homeostase de células T, e rapidamente estimula o aumento do RNA-m e síntese de Interferon  $\gamma$ , IL-2R $\alpha$ , IL-2R $\beta$  e IL-18R<sup>82</sup>. Assim, a diminuição da expressão dos receptores de IL-2 e IL-21 nos pacientes portadores de DM1A podem estar associadas. A importância de alterações na região IL-2/IL-21 e autoimunidade foi confirmada pela associação do polimorfismo rs6822844 e predisposição a Síndrome de Sjögren, lúpus eritematoso sistêmico e diabetes mellitus tipo 1<sup>88</sup>.

Outro dado importante que obtivemos foi a diminuição significativa do número de células TCD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>, as células T regulatórias. Existem duas classes de células T regulatórias: Células Treg naturais, que se desenvolvem no timo a partir de pré-células T e células Treg adaptativas,

que se desenvolvem na periferia a partir de células T maduras em resposta aos estímulos antigênicos<sup>89</sup>. STAT 5 aparenta ser vital para o desenvolvimento das células Treg, pois a ativação de STAT5 é suficiente para o aumento no número de células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>, mesmo na ausência de IL-2.<sup>90</sup> STAT5A e STAT5B são fatores essenciais na sinalização de IL-2R, sugerindo que outras citocinas da família gama comum, principalmente IL-7 e IL-15 (que também ativam STAT5), sejam importantes para o desenvolvimento e manutenção das células Treg<sup>27</sup>. A IL-21 não ativa preferencialmente STAT5 e não parece ter efeito direto na viabilidade, função ou ativação das Treg.

As células Treg de pacientes portadores de DM1A de início recente ou familiares com autoanticorpos pancreáticos positivos exibem expressão aumentada de genes pró-apoptóticos e diminuição de genes que codificam o sistema HLA e determinados receptores de interleucinas, incluindo IL-2R $\alpha$ , IL-2R $\beta$  e IL-7R<sup>91</sup>. Jailwala e colaboradores (2009) mostraram que as células Treg de pacientes portadores de DM1A apresentavam maior sensibilidade à apoptose, parcialmente devido à deprivação de sinais estimuladores do crescimento celular, especialmente IL-2<sup>91</sup>. Estudos anteriores demonstraram maior apoptose de células Treg nas fases iniciais do DM1A, com significativo declínio destas taxas após os seis primeiros meses de diagnóstico<sup>14</sup>, corroborando nosso achado de diminuição das células Treg nos pacientes DM1A de início recente. Como as células Treg controlam o desenvolvimento, o tráfego e a proliferação das células T efetoras, sua principal função é justamente a de imunomodulação, e, conseqüentemente, proteção contra

processos autoimunes<sup>58-59</sup>. Portanto, a significativa diminuição das células Treg parece ser mais causa que consequência do DM1A, podendo exercer papel importante na patogênese da doença.

A IL-4 tem papel fundamental tanto na imunidade humoral quanto celular, pois promove proliferação de células B, *switch* de classes das imunoglobulinas e diferenciação de linfócitos T, sendo a principal citocina de ativação da via Th2. Especula-se que, em algumas situações, as citocinas da via Th2 possam inibir a citotoxicidade dos linfócitos T mediada por Th1, porém em outras circunstâncias, a IL-4 pode levar ao desenvolvimento de respostas Th1<sup>62, 92</sup>. Estudos recentes demonstraram que a IL-4, assim como a IL-2, promove a proliferação das células Treg naturais<sup>93-95</sup>. Este efeito da IL-4 é compatível com o achado que as células Treg naturais expressam constitutivamente IL-4R $\alpha$ .<sup>96</sup> Em relação às células Treg adaptativas, a IL-4 tem efeitos variáveis: através da ativação do IL-4R $\alpha$ , a IL-4 pode induzir a formação de células T CD4+CD25+FoxP3+ *in vitro* na ausência de TGF- $\beta$ <sup>97</sup>. Em contraste, a indução de células Treg FoxP3+ pelo TGF- $\beta$  na periferia é bloqueada pela IL-4<sup>98</sup>.

Tanto a IL-2 quanto a IL-4 são citocinas essenciais na ativação de células T efectoras, e ambas promovem ativação e função de células Treg. A IL-4 pode desempenhar papel fundamental na manutenção do balanço entre ativação e controle das respostas imunes Th2, assim como a IL-2 ativa e controla as respostas Th1. Portanto, nosso achado de diminuição da expressão de IL-4R $\alpha$  nos linfócitos T periféricos de pacientes com DM1A corrobora a diminuição de células Treg encontrada, comprovando que a

indução de células Treg pela IL-4 pode ser um mecanismo homeostático importante no desenvolvimento da autoimunidade do DM1A.

A IL-7 é essencial para o desenvolvimento e homeostase de células T *naive* e de memória. A IL-7 e seu receptor também são essenciais para a formação de células Treg, via ativação de STAT5<sup>73</sup>. Em nosso estudo observamos diminuição da expressão de IL-7R em pacientes portadores de DM1A em linfócitos T CD3<sup>+</sup> periféricos e também menor intensidade média de fluorescência deste receptor, dados que solidificam a diminuição das células Treg observada nos pacientes DM1A.

Por outro lado, a expressão do receptor da IL-7 difere da de outras interleucinas de cadeia gama comum: enquanto estes receptores sofrem regulação positiva em células T ativadas, o IL-7R é expresso principalmente em células T *naive* e de memória em repouso, sofrendo regulação negativa após a ativação do receptor de células T<sup>27</sup>. Assim, em um estado de ativação imune (como o diabetes mellitus tipo 1 recém-diagnosticado), espera-se encontrar diminuição de IL-7R, em acordo com os dados observados em nosso estudo.

A família de citocinas de cadeia gama comum possui papel relevante na regulação de vários processos imunológicos. No entanto, não houve correlação entre os títulos de autoanticorpos pancreáticos (anti-GAD65 e anti-IA2) e a expressão de nenhum dos receptores de interleucinas de cadeia gama comum estudados. Portanto, em nossa casuística, a expressão dos receptores de interleucinas de cadeia gama comum não influenciou os títulos de autoanticorpos pancreáticos encontrados nos pacientes DM1A.

Para verificarmos se a diminuição da expressão da proteína de superfície dos receptores de interleucinas de cadeia gama comum observada pela citometria de fluxo decorria de alterações na transcrição do DNA ou após a tradução do RNA, realizamos a PCR em tempo real de 23 dos pacientes portadores de DM1A, estudando os genes *IL-21R*, *IL-2R $\alpha$*  e *IL-2R $\beta$* . Optamos por estudar estes três receptores por serem aqueles com expressão protéica diminuída tanto em linfócitos T CD3<sup>+</sup> quanto em CD4<sup>+</sup>. A expressão relativa (RQ) do RNAm dos pacientes DM1A foi obtida pela comparação com aquela de um pool de cDNA de dez crianças controle.

Os pacientes foram divididos em três grupos (tercis) de acordo com os valores de expressão protéica em linfócitos T CD3<sup>+</sup>, o que nos permitiu avaliar os resultados da PCR em tempo real de forma homogênea. Entretanto, vale ressaltar que a população de células estudadas na citometria de fluxo foi diferente da população celular avaliada na PCR em tempo real: nesta, avaliamos todos os leucócitos periféricos, enquanto na citometria de fluxo estudamos especificamente linfócitos T CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> ou CD8<sup>+</sup>. Verificamos que não houve diferença na expressão relativa do RNAm entre os três grupos de pacientes em nenhum dos genes estudados. Portanto, em nossa casuística a diminuição da expressão da proteína de superfície dos receptores de interleucinas de cadeia gama comum possivelmente decorreu de alterações posteriores à transcrição do RNA mensageiro.

## ***6 Conclusões***



- Demonstramos pela primeira vez diminuição da expressão do receptor da IL-21 em linfócitos T CD3<sup>+</sup> e CD4<sup>+</sup> periféricos em pacientes portadores de DM1 de início recente;
- Verificamos diminuição da expressão de IL-2R $\alpha$ , IL-2R $\beta$ , IL-4R e IL-7R em linfócitos T periféricos de pacientes portadores de DM1;
- Mostramos diminuição das células TCD4<sup>+</sup>CD25<sup>+high</sup> (Treg) em pacientes com DM1 de início recente;
- Não houve relação entre a expressão dos receptores de interleucinas de cadeia gama comum e títulos de autoanticorpos pancreáticos;
- A diminuição da expressão da proteína de superfície dos receptores de interleucinas de cadeia gama comum possivelmente decorreu de alterações posteriores à transcrição do RNA mensageiro no grupo de pacientes estudados.

## ***7 Anexos***

**ANEXO 1:** Dados clínicos dos pacientes portadores de diabetes mellitus tipo 1A

Identificação	sexo	idade (anos)	cor	estádio puberal	Duração do diabetes (meses)
1	M	11	Branca	P1G1	6,0
2	F	1	Branca	M1P1	6,0
3	M	3	Branca	P1G1	5,0
4	F	8	Não branca	M1P1	5,0
5	F	1	Branca	M1P1	5,0
6	M	5	Branca	P1G1	3,0
7	F	6	Não branca	M1P1	5,0
8	F	3	Não branca	M1P1	1,0
9	M	4	Não branca	M1P1	1,0
10	F	11	Não branca	M2P2	4,0
11	F	11	Branca	M2P2	1,0
12	F	11	Não branca	M2P2	5,0
13	M	16	Branca	P5G5	1,0
14	F	3	Branca	M1P1	6,0
15	M	9	Branca	P1G1	2,0
16	F	11	Branca	M2P2	1,0
17	F	4	Branca	M1P1	1,0
18	M	11	Branca	P2G2	6,0
19	F	9	Branca	M1P1	3,0
20	M	10	Não branca	P1G1	0,5
21	F	3	Branca	M1P1	0,5
22	M	10	Branca	P1G1	1,0
23	M	1	Branca	P1G1	6,0
24	M	13	Não branca	P3G3	0,5
25	M	10	Branca	P1G1	1,0
26	M	12	Não branca	P2G2	6,0
27	M	13	Branca	P3G3	0,5
28	F	10	Branca	M1P1	3,0
29	F	10	Não branca	M1P1	1,0
30	M	15	Não branca	P3G3	1,0
31	M	2	Não branca	P1G1	6,0
32	M	13	Não branca	P3G3	1,0
33	F	6	Branca	M1P1	6,0
34	M	16	Não branca	P5G5	3,0
35	M	16	Branca	P5G5	2,0

M= sexo masculino; F= sexo feminino

Estádio puberal classificado de acordo com os critérios de Tanner (M= mamas; P= pêlos; G = genitais)

**ANEXO 2: Dados laboratoriais dos pacientes portadores de DM1A**

Pacientes DM1A	AC Anti GAD65	AC Anti IA2	Glicemia	HbA1C	DRB1*	DRB2*	DQB1*	DQB2*
1	15	2.1	286	11,8	0301	0307	201	201
2	0,52	0,2	300	7,7	0301	16	201	502
3	1,07	9,8	123	7,3	0401	16	304	502
4	9.1	7.74	205	9,20	0301	0301	201	201
5	61.2	0.11	71	8,5	0301	0301	201	201
6	3,7	1,6	113	9,1	0301	0405	201	302
7	10,4	0,7	128	7,6	0301	0301	201	201
8	0.9	23.3	115	9,2	0301	9	201	202
9	1.8	19.5	82	12,2	0301	0402	201	302
10	56.3	11.9	126	7,4	0301	1	201	501
11	28.3	45.1	72	5,9	0405	0405	302	305
12	31.2	15.6	142	12,7	7	8	202	402
13	0.42	2.7	69	8,7	0401	13	302	604
14	53.5	1.07	138	12,6	0301	8	201	402
15	0,7	27,9	146	8,9	1	0405	501	302
16	34,4	3,2	98	6,8	1	0404	501	302
17	0,7	16,4	74	11,20	1	0401	501	301
18	0,6	11,6	128	9,00	1	0401	501	302
19	7,2	7,9	84	10,3	0301	0301	201	201
20	0,1	8,2	58	11,8	0401	8	302	303
21	25,8	10,7	56	10,4	0301	0404	201	302
22	13,3	27,5	89	8,8	0405	11	302	301
23	0	0,4	231	12,5	0301	0404	201	302
24	1,82	100	106	10	0405	13	302	303
25	9,5	0	162	7,5	0301	7	201	202
26	8	11,4	134	7,3	0408	11	301	302
27	0,7	1,1	372	15,2	0301	9	201	202
28	15,6	0,1	61	7,9	1	8	501	402
29	50,4	5,9	82	10,7	0301	0401	201	302
30	12,9	0	44	9,1	0405	7	303	303
31	0,4	0,4	316	9,2	0301	0301	201	201
32	0,3	0,5	352	10,5	0301	9	201	202
33	26,2	8,08	313	6,1	0301	0301	201	201
34	2,13	15,11	103	10,6	0301	0402	201	302
35	6,32	2,73	91	6,2	0301	9	201	202

Anticorpo anti descarboxilase do ácido glutâmico 65 (GAD65): normal até 0,8 UI/ml.

Anticorpo anti tirosina fosfatase (IA2) : normal até 0,5 UI/mL

Glicemia expressa em mg/dL

HbA1c (hemoglobina glicada) expressa em porcentagem

DRB1, DRB2, DQB1 e DQB2 : alelos genotipados do sistema HLA

**ANEXO 3: Dados clínicos e laboratoriais dos indivíduos do grupo controle**

Indivíduos Controle	idade (anos)	glicemia	Ac anti GAD65	Ac anti IA2	DRB1	DRB2	DQB1	DQB2
36	10	84	0,1	0	1	7	303	501
37	9	81	0,1	0	301	13	201	604
38	9	79	0	0,2	12	12	501	402
39	16	82	0,1	0,1	301	13	201	609
40	13	79	0	0	404	15	302	602
41	7	75	0	0	15	15	602	602
42	9	84	0	0	405	11	301	302
43	9	75	0	0	301	15	201	602
44	16	84	0,1	0,1	401	13	302	302
45	6	72	0,2	0	301	8	201	402
46	1	64	0,2	0,8				
47	4	78	0,2	0,2	406	15		
48	6	89	0	0	301	16		
49	2	81	0	0,2	7	13		
50	12	92	0,7	0	1	11		
51	4	79	0,1	0,3	13	13		
52	9	91	0	0	301	7		
53	8	84	0	0	16	12	301	301
54	1	79	0	0	1	10	501	501
55	7	79	0	0	13	13		
56	14	90	0,3	0	4	7		
57	11	84	0	0	4	16		
58	9	95	0	0,5	7	11		
59	9	79	0	0,5	7	16		
60	11	81	0	0,7	17	1		

Anticorpo anti descarboxilase do ácido glutâmico 65 (GAD65): normal até 0,8 UI/ml.

Anticorpo anti tirosina fosfatase (IA2): normal até 0,5 UI/mL

Glicemia expressa em mg/dL

HbA1c (hemoglobina glicada) expressa em porcentagem

DRB1, DRB2, DQB1 e DQB2 : alelos genotipados do sistema HLA

**ANEXO 4:** Dados de hemograma para pacientes portadores de DM1A e indivíduos controle

Pacientes DM1A	linfócitos totais	Linfócitos T CD3+ (%)	Linfócitos T CD4 + (%)	Linfócitos T CD8+ (%)
1	2789	71,60	38,20	26,20
2	5000	65,70	46,10	17,90
3	4400	69,50	43,00	21,40
4	2633	61,00	32,80	23,60
5	5400	71,20	49,30	19,60
6	2200	74,90	46,10	27,00
7	2400	70,35	40,40	27,20
8	3000	68,00	37,70	28,60
9	4500	67,20	31,70	27,70
10	2200	78,60	49,00	23,60
11	3000	78,90	45,20	31,30
12	2500	79,20	56,90	20,70
13	2600	78,90	41,80	34,10
14	3200	65,80	37,90	27,20
15	2300	59,80	31,50	23,70
16	2100	74,00	48,30	22,80
17	4500	75,60	43,80	25,60
18	2500	75,70	43,20	28,00
19	2800	71,90	48,60	21,80
20	2800	54,10	30,80	19,10
21	3500	72,50	48,20	22,00
22	2700	70,10	35,70	28,00
23	6000	52,70	31,90	17,70
24	2100	78,80	33,70	41,10
25	2200	77,70	43,70	27,40
26	2000	51,90	31,70	19,30
27	2800	78,90	38,10	34,90
28	2400	65,90	38,70	23,00
29	3200	74,20	43,10	27,60
30	2600	74,20	47,40	26,60
31	5200	71,90	49,50	21,70
32	1400	52,90	29,90	23,80
33	2800	76,80	45,30	28,20
34	2200	76,60	36,60	39,30
35	1800	68,40	29,00	36,20
mediana	2700	71,90	41,80	26,20
percentil 5	1940	52,84	30,53	18,74
percentil 95	5260	78,90	49,36	37,13
Teste de Mann-Whitney (p=)	0,58	0,21	0,20	0,30

**Anexo 4 (continuação):** Dados de hemograma para pacientes portadores de DM1A e indivíduos controle

Indivíduos controle	Linfócitos totais	Linfócitos T CD3+ (%)	Linfócitos T CD4+ (%)	Linfócitos T CD8+ (%)
36	2900	70,70	37,10	27,10
37	3800	72,80	46,80	23,80
38	1800	66,90	40,10	16,50
39	1800	50,00	27,90	19,90
40	3600	71,60	35,10	30,50
41	1600	66,60	37,00	22,90
42	1800	74,20	47,80	24,00
43	2000	66,20	36,60	18,60
44	2400	75,60	35,30	24,80
45	4900	79,90	50,00	28,10
46	4000	68,90	46,70	19,50
47	2300	54,30	27,40	23,30
48	2900	71,80	45,70	22,30
49	3800	65,50	39,30	26,70
50	4000	64,90	35,10	28,90
51	2500	73,30	37,10	31,00
52	2200	64,30	32,10	28,50
53	2700	65,70	42,50	23,30
54	3900	58,50	34,60	22,30
55	4400	63,40	40,00	20,00
56	2293	70,40	37,40	30,80
57	1706	64,50	27,70	32,00
58	3600	75,50	34,40	29,10
59	2979	68,40	45,80	21,30
60	1827	67,00	41,10	21,90
mediana	2700	67,00	37,10	23,80
percentil 5	1653	51,42	27,55	18,67
percentil 95	4650	77,85	48,58	36,67

**ANEXO 5:** Expressão do receptor da Interleucina-21(IL-21R) em linfócitos T periféricos de pacientes portadores de DM1A e indivíduos controle obtida por citometria de fluxo (porcentagem de linfócitos T periféricos que expressam o IL-21R)

Pacientes DM1A	Expressão de IL-21R em linfócitos T CD3+ (%)	Expressão de IL-21R em Linfócitos T CD4+ (%)	Expressão de IL-21R em linfócitos T CD8+ (%)
1	17,90	6,31	8,35
2	6,24	1,92	3,96
3	12,90	2,62	7,49
4	22,10	8,20	10,70
5	11,90	5,28	5,70
6	15,30	6,36	7,90
7	16,90	6,69	8,74
8	26,50	7,06	18,80
9	23,00	5,95	16,50
10	29,00	10,10	15,30
11	27,40	5,50	20,60
12	18,00	6,54	10,70
13	14,40	9,93	2,74
14	16,90	5,75	9,79
15	28,70	7,86	17,20
16	30,60	13,20	14,90
17	19,60	6,00	11,10
18	21,00	11,00	7,20
19	19,60	8,51	9,74
20	22,40	8,70	9,53
21	41,50	17,20	22,50
22	47,80	13,70	30,20
23	47,30	17,70	25,90
24	53,60	13,60	37,60
25	28,90	10,90	17,10
26	34,40	9,67	22,80
27	44,80	11,40	32,70
28	52,40	27,80	22,00
29	46,40	24,20	20,50
30	63,40	39,00	23,50
31	62,60	43,10	18,20
32	38,40	20,50	17,90
33	26,90	13,50	12,00
34	46,10	19,30	26,40
35	29,30	10,20	17,70
mediana	27,40	9,67	16,50
percentil 5	12,60	4,48	5,18
percentil 95	56,30	31,16	30,95



**ANEXO 5 (continuação):** Expressão do receptor da Interleucina-21(IL-21R) em linfócitos T periféricos de pacientes portadores de DM1A e indivíduos controle obtida por citometria de fluxo (porcentagem de linfócitos T periféricos que expressam o IL-21R).

Indivíduos Controle	Expressão de IL-21R em linfócitos T CD3+ (%)	Expressão de IL-21R em linfócitos T CD4+ (%)	Expressão de IL-21R em linfócitos T CD8+ (%)
36	27,80	6,31	18,40
37	14,60	8,10	5,22
38	30,90	12,00	17,10
39	37,30	15,70	20,90
40	39,60	11,00	27,40
41	28,30	11,40	15,70
42	35,20	15,90	19,00
43	68,00	39,90	17,00
44	71,20	35,60	21,00
45	83,30	49,70	32,00
46	49,80	33,10	13,70
47	35,00	18,20	15,10
48	18,20	5,91	11,00
49	34,70	19,90	15,70
50	33,50	16,90	15,60
51	34,70	17,00	15,70
52	42,80	19,80	21,00
53	31,60	18,50	13,50
54	42,70	24,30	16,90
55	35,80	22,90	11,60
56	32,80	16,00	15,40
57	32,60	14,00	16,20
58	43,50	7,10	4,30
59	33,00	23,40	9,40
60	43,00	27,40	14,20
mediana	35,00	17,00	15,70
percentil 5	13,60	5,20	5,20
percentil 95	69,60	37,75	31,48
Teste de Mann-Whitney (p=)	0,01	0,001	0,9966

**ANEXO 6:** Intensidade média de fluorescência (MFI) do receptor da Interleucina 21 em linfócitos T periféricos de pacientes DM1A e controles

<b>Pacientes DM1A</b>	<b>MFI para IL-21R</b>
1	3,14
2	1,20
3	2,35
4	4,82
5	9,69
7	2,80
8	4,47
9	4,18
10	6,20
11	3,96
12	4,05
13	4,41
14	3,09
15	6,87
16	9,55
17	5,99
18	8,61
19	4,10
20	8,17
21	16,36
22	24,87
23	46,43
24	16,53
25	7,58
26	6,18
27	4,68
28	20,45
29	15,67
30	34,88
31	4,61
32	12,06
33	7,48
34	19,41
35	10,02
mediana	6,53
percentil 5	2,64
percentil 95	28,37

**ANEXO 6 (continuação):** Intensidade média de fluorescência (MFI) do receptor da Interleucina 21 em linfócitos T periféricos de pacientes DM1A e controles

<b>Indivíduos controle</b>	<b>MFI para IL-21R</b>
36	2,27
37	26,75
38	7,75
39	7,12
41	162,30
42	16,82
43	16,35
44	9,50
45	6,99
46	12,25
47	14,09
48	3,16
49	7,28
50	8,58
51	15,57
52	25,47
53	11,79
54	6,03
55	21,52
56	11,17
57	36,58
58	54,81
59	16,38
60	8,45
mediana	12,02
percentil 5	3,59
percentil 95	52,08
Teste de Mann Whitney (p=)	0,0124

**ANEXO 7:** Expressão da cadeia alfa (IL-2R $\alpha$ ) do receptor da Interleucina-2 em linfócitos T periféricos de pacientes portadores de DM1A e indivíduos controle obtida por citometria de fluxo (porcentagem de linfócitos T periféricos que expressam o IL-2R $\alpha$ )

Pacientes DM1A	Expressão de IL2R- $\alpha$ em linfócitos TCD3+ (%)	Expressão de IL2R- $\alpha$ em linfócitos T CD4+ (%)	Expressão de IL2R- $\alpha$ em linfócitos T CD8+ (%)
1	17,80	8,07	7,22
2	6,10	3,41	2,43
3	10,60	3,51	6,06
4	19,40	1,30	6,00
5	12,20	7,50	4,00
6	12,20	7,19	4,59
7	11,60	7,29	3,41
8	12,00	3,15	8,56
9	10,70	2,58	7,94
10	16,00	5,74	9,40
11	20,80	6,50	13,80
12	12,50	8,07	3,80
13	7,85	6,07	0,99
14	14,40	7,96	5,65
15	19,10	7,14	10,50
16	17,50	7,50	9,50
17	16,80	7,23	8,45
18	10,10	6,34	2,60
19	12,50	7,70	4,45
20	13,70	8,70	3,53
21	37,50	15,50	21,00
22	38,10	8,40	27,30
23	35,10	10,40	22,80
24	45,10	10,40	32,90
25	14,30	5,19	9,29
26	23,00	1,73	21,20
27	39,00	9,50	29,70
28	38,40	21,30	15,90
29	29,60	16,60	12,80
30	53,40	35,30	17,70
31	49,90	34,50	14,40
32	22,90	15,30	8,00
33	19,30	11,70	7,10
34	28,30	14,20	14,00
35	17,70	7,80	9,56
mediana	17,70	7,70	8,56
percentil 5	9,43	2,33	2,55
percentil 95	46,54	25,26	28,02

**ANEXO 7 (continuação):** Expressão da cadeia alfa (IL-2R $\alpha$ ) do receptor da Interleucina-2 em linfócitos T periféricos de pacientes portadores de DM1A e indivíduos controle obtida por citometria de fluxo (porcentagem de linfócitos T periféricos que expressam o IL-2R $\alpha$ )

Indivíduos controle	Expressão de IL2R- $\alpha$ em linfócitos TCD3+ (%)	Expressão de IL2R- $\alpha$ em linfócitos TCD4+ (%)	Expressão de IL2R- $\alpha$ em linfócitos TCD8+ (%)
36	9,31	6,48	2,40
37	26,00	17,40	8,00
38	21,00	14,20	6,77
39	21,90	10,80	11,00
40	42,40	18,50	2,10
41	66,10	38,80	26,50
42	26,40	19,80	5,92
43	40,60	28,30	10,30
44	17,40	10,00	6,79
45	17,10	5,74	10,20
46	26,20	18,50	7,31
47	28,70	6,84	21,70
48	14,40	7,80	6,20
49	31,30	21,40	10,00
50	22,80	12,70	9,37
51	28,30	14,50	13,90
52	29,80	21,50	8,40
53	19,50	9,40	9,90
54	27,10	21,80	5,81
55	26,00	9,73	16,10
56	23,80	15,10	8,57
57	50,80	31,40	12,30
58	52,00	27,60	13,50
59	29,40	18,40	10,80
60	23,90	14,10	9,10
mediana	26,20	15,10	9,37
percentil 5	14,94	6,55	3,08
percentil 95	51,76	30,78	20,58
Teste de Mann-Whitney (p=)	0,0091	0,0002	0,6199

**ANEXO 8:** Intensidade média de fluorescência (MFI) da cadeia alfa do receptor da Interleucina 2 (IL-2R $\alpha$ ) em linfócitos T periféricos de pacientes DM1A e controles

<b>Pacientes DM1A</b>	<b>MFI para IL-2R<math>\alpha</math></b>
1	2,83
2	0,74
3	1,10
4	2,10
5	1,64
7	1,39
8	1,22
9	1,13
10	1,72
11	2,01
12	1,83
13	1,10
14	13,74
15	2,23
16	2,42
17	3,75
18	4,21
19	2,46
20	3,54
21	11,46
22	8,27
23	12,69
24	2,05
25	1,40
26	2,09
27	8,54
28	5,31
29	3,74
30	11,16
31	9,81
32	2,48
33	3,70
34	4,20
35	2,68
mediana	2,47
percentil 5	1,10
percentil 95	11,89

**ANEXO 8 (continuação):** Intensidade média de fluorescência (MFI) da cadeia alfa do receptor da Interleucina 2 (IL-2R $\alpha$ ) em linfócitos T periféricos de pacientes DM1A e controles

<b>Indivíduos controle</b>	<b>MFI para IL-2R<math>\alpha</math></b>
36	6,81
37	3,88
38	2,60
39	2,81
41	26,54
42	9,33
43	6,81
44	2,06
45	2,27
46	4,64
47	4,36
48	2,16
49	6,41
50	3,96
51	4,41
52	7,45
53	2,64
54	5,11
55	3,36
56	4,14
57	8,80
58	10,06
59	5,11
60	3,79
mediana	4,38
percentil 5	2,17
percentil 95	9,95
Teste de Mann-Whitney (p=)	0,0099

**ANEXO 9:** Porcentagem de células T regulatórias (CD4+CD25<sup>high</sup>) em pacientes portadores de DM1A e controles

Pacientes DM1A	Porcentagem de células TCD4CD25 <sup>high</sup>	Indivíduos controle	Porcentagem de células TCD4CD25 <sup>high</sup>
3	0,79%	49	1,11%
4	0,88%	42	1,58%
5	0,85%	52	1,20%
7	0,90%	56	1,15%
8	0,63%	60	1,14%
12	0,77%	50	1,21%
13	0,84%	54	1,04%
14	0,92%	46	1,15%
20	0,73%	38	1,35%
21	0,97%	37	1,14%
22	0,75%	44	1,03%
23	0,86%	51	1,12%
27	0,91%	41	0,93%
28	0,76%	58	1,10%
29	0,77%	57	1,08%
30	0,87%	47	0,89%
31	0,92%	53	1,26%
32	0,90%	59	1,11%
33	0,86%	43	1,21%
34	0,65%		
mediana	0,86%	mediana	1,14%
percentil 5	0,65%	percentil 5	0,93%
percentil 95	0,92%	percentil 95	1,37%
Teste de Mann Whitney (p=)	<0,0001		



**ANEXO 10:** Expressão da cadeia beta (IL-2R $\beta$ ) do receptor da Interleucina-2 em linfócitos T periféricos de pacientes portadores de DM1A e indivíduos controle obtida por citometria de fluxo (porcentagem de linfócitos T periféricos que expressam o IL-2R $\beta$ )

Pacientes DM1A	Expressão de IL2R- $\beta$ em linfócitos TCD3+ (%)	Expressão de IL2R- $\beta$ em linfócitos TCD4+ (%)	Expressão de IL2R- $\beta$ em linfócitos T CD8+ (%)
1	10,10	1,50	5,85
2	3,55	0,46	2,91
3	8,39	0,76	5,27
4	9,60	0,95	7,02
5	7,76	2,41	4,45
6	7,67	1,85	4,97
7	8,10	1,85	4,99
8	10,80	0,15	10,60
9	14,60	0,92	12,70
10	15,70	1,94	11,00
11	22,10	2,10	18,60
12	10,50	2,08	7,86
13	7,14	3,52	1,34
14	6,78	0,99	5,25
15	13,10	1,46	10,30
16	18,90	4,62	12,70
17	15,40	2,17	9,90
18	10,00	3,22	3,90
19	11,80	2,80	7,83
20	10,30	1,90	5,58
21	30,90	8,42	21,40
22	39,20	5,12	30,50
23	34,50	6,46	25,50
24	47,10	6,60	37,20
25	17,10	2,66	14,30
26	31,20	5,48	25,20
27	34,80	3,50	31,10
28	35,00	15,60	17,30
29	28,70	12,90	15,10
30	50,20	28,40	21,20
31	47,70	31,20	15,50
32	23,90	11,00	12,40
33	16,90	6,76	9,23
34	26,00	8,38	16,80
35	14,90	4,05	10,10
mediana	15,40	2,80	10,60
percentil 5	7,03	0,67	3,60
percentil 95	47,28	19,44	30,68

**ANEXO 10 (continuação):** Expressão da cadeia beta (IL-2R $\beta$ ) do receptor da Interleucina-2 em linfócitos T periféricos de pacientes portadores de DM1A e indivíduos controle obtida por citometria de fluxo (porcentagem de linfócitos T periféricos que expressam o IL-2R $\beta$ ).

Indivíduos controle	Expressão de IL2R- $\beta$ em linfócitos TCD3+ (%)	Expressão de IL2R- $\beta$ em linfócitos TCD4+ (%)	Expressão de IL2R- $\beta$ em linfócitos TCD8+ (%)
36	6,00	1,70	2,82
37	20,90	10,80	9,10
38	21,00	10,70	9,10
39	14,00	3,95	9,70
40	45,50	15,10	5,70
41	81,90	47,70	32,80
42	18,80	11,40	7,09
43	38,80	25,70	10,30
44	17,20	6,82	8,80%
45	17,40	1,60	12,30
46	32,20	18,40	11,70
47	25,30	2,59	22,40
48	10,20	1,35	6,73
49	27,30	13,50	13,50
50	19,30	6,57	11,60
51	22,10	6,35	15,60
52	28,40	15,50	11,30
53	16,30	3,10	12,60
54	23,90	16,00	7,20
55	22,20	5,85	16,40
56	22,00	10,40	11,00
57	55,70	28,70	16,30
58	59,30	26,50	17,20
59	23,70	9,67	13,20
60	20,20	9,49	8,90
mediana	22,10	10,40	11,30
percentil 5	10,96	1,62	5,91
percentil 95	58,58	28,26	21,36
Teste de Mann Whitney (p=)	0,0330	0,0009	0,6628

**ANEXO 11:** Intensidade média de fluorescência (MFI) da cadeia beta do receptor da Interleucina 2 em linfócitos T periféricos de pacientes DM1A e controles

<b>Pacientes DM1A</b>	<b>MFI para IL-2R<math>\beta</math></b>
1	2,039
2	0,739
3	2,218
4	4,585
5	1,069
7	1,666
8	0,944
9	2,675
10	3,637
11	3,239
12	1,848
13	2,366
14	0,989
15	2,760
16	4,422
17	11,218
18	5,874
19	3,676
20	8,833
21	13,717
22	22,553
23	10,867
24	22,026
25	3,451
26	7,606
27	8,405
28	7,378
29	4,140
30	8,476
31	9,781
32	7,040
33	2,967
34	4,157
35	3,596
mediana	1,413
percentil 5	1,371
percentil 95	1,472

**Anexo 11 (continuação):** Intensidade média de fluorescência (MFI) da cadeia beta do receptor da Interleucina 2 em linfócitos T periféricos de pacientes DM1A e controles

Indivíduos controle	MFI para IL-2R $\beta$
36	1,617
37	4,936
38	3,767
39	2,837
41	200,518
42	4,102
43	6,715
44	2,296
45	6,016
46	9,929
47	4,465
48	6,030
49	17,661
50	5,677
51	5,041
52	18,975
53	4,425
54	5,858
55	3,916
56	8,817
57	46,428
58	20,965
59	6,306
60	5,682
mediana	1,416
percentil 5	1,381
percentil 95	1,551
Teste de Mann Whitney (p=)	0,124

**ANEXO 12:** Expressão do receptor da Interleucina 4 (IL-4R) em linfócitos T periféricos de pacientes portadores de DM1A e indivíduos controle obtida por citometria de fluxo (porcentagem de linfócitos T periféricos que expressam o IL-4R)

Pacientes DM1A	Expressão de IL-4R em CD3	Expressão de IL-4R em CD4	Expressão de IL-4R em CD8
1	14,90	4,52	7,92
2	7,45	2,56	4,59
3	5,77	1,30	3,97
4	12,00	3,00	6,80
5	23,00	7,15	14,90
6	9,00	2,42	6,13
7	12,80	4,87	7,31
8	24,20	5,08	18,60
9	17,40	2,06	14,70
10	15,60	2,83	11,80
11	24,60	35,80	20,10
12	13,60	4,39	8,70
13	6,73	4,48	1,18
14	9,61	2,42	6,58
15	17,40	3,00	12,50
16	21,70	6,10	14,70
17	17,10	5,76	9,62
18	8,70	4,26	3,00
19	11,20	4,27	6,10
20	8,00	2,60	3,46
21	36,40	13,90	21,60
22	41,10	8,00	30,60
23	40,40	11,50	26,30
24	45,00	8,84	33,50
25	36,80	9,66	25,20
26	33,80	9,54	23,40
27	35,90	5,20	30,30
28	36,10	19,20	15,40
29	28,90	16,50	11,70
30	55,60	32,80	22,00
31	55,70	39,60	15,20
32	20,60	11,00	8,70
33	18,40	9,49	8,26
34	26,50	11,10	14,70
35	15,60	5,24	9,50
mediana	18,40	5,24	11,80
percentil 5	7,23	2,31	3,32
percentil 95	48,18	33,70	30,39

**ANEXO 12 (continuação):** Expressão do receptor da Interleucina 4 em linfócitos T periféricos de pacientes portadores de DM1A e indivíduos controle obtida por citometria de fluxo (porcentagem de linfócitos T periféricos que expressam o IL-4R)

Indivíduos controle	Expressão de IL-4R em CD3	Expressão de IL-4R em CD4	Expressão de IL-4R em CD8
36	10,90	4,86	5,25
37	21,80	11,40	9,58
38	27,80	19,70	10,80
39	15,70	4,95	10,70
40	42,90	23,30	0,49
41	83,00	50,70	30,90
42	27,80	18,20	8,35
43	43,40	29,90	10,70
44	15,80	9,00	6,37
45	16,70	2,00	13,20
46	27,60	18,90	8,51
47	29,60	5,50	23,40
48	10,90	2,90	6,91
49	28,50	15,90	12,70
50	26,50	11,00	13,70
51	25,30	10,00	15,00
52	27,90	19,70	7,89
53	17,90	5,40	12,30
54	30,00	23,10	7,55
55	22,30	6,93	15,10
56	23,60	12,50	10,70
57	53,20	31,70	13,70
58	58,80	29,00	17,00
59	23,90	13,20	10,70
60	25,40	13,70	10,60
mediana	26,50	13,20	10,70
percentil 5	11,86	3,29	5,47
percentil 95	57,68	31,34	22,12
Teste de Mann-Whitney (p=)	0,060	0,032	0,319

**ANEXO 13:** Intensidade média de fluorescência (MFI) do receptor da Interleucina 4 (IL-4R) em linfócitos T periféricos de pacientes DM1A e controles

<b>Pacientes DM1A</b>	<b>MFI para IL-4R</b>
1	4,65
2	2,72
3	1,57
4	4,47
5	11,83
7	3,03
8	6,62
9	4,01
10	9,08
11	9,09
12	6,35
13	8,64
14	3,83
15	8,84
16	15,18
17	7,85
18	11,49
19	5,87
20	6,29
21	23,69
22	32,44
23	39,30
24	76,20
25	20,91
26	24,89
27	23,82
28	22,55
29	13,02
30	43,23
31	28,07
32	32,45
33	8,53
34	14,01
35	12,0
mediana	10,29
percentil 5	2,93
percentil 95	40,68

**ANEXO 13 (continuação):** Intensidade média de fluorescência (MFI) do receptor da Interleucina 4 (IL-4R) em linfócitos T periféricos de pacientes DM1A e controles

Indivíduos controle	MFI para IL-4R
36	33,55
37	25,62
38	24,25
39	24,25
41	45,85
42	22,63
43	25,62
44	27,52
45	22,63
46	34,12
47	23,51
48	22,80
49	23,33
50	24,83
51	24,63
52	26,23
53	23,51
54	22,98
55	23,33
56	24,63
57	25,82
58	25,02
59	23,88
60	33,55
mediana	24,63
percentil 5	22,66
percentil 95	34,04
Teste de Mann-Whitney (p=)	0,002



**ANEXO 14:** Expressão do receptor da Interleucina 7 em linfócitos T periféricos de pacientes portadores de DM1A e indivíduos controle obtida por citometria de fluxo (porcentagem de linfócitos T periféricos que expressam o IL-7R)

Pacientes DM1A	Expressão de IL-7R em linfócitos TCD3+ (%)	Expressão de IL-7R em linfócitos TCD4+ (%)	Expressão de IL-7R em linfócitos TCD8+ (%)
1	76,10	39,30	25,80
2	62,20	40,70	18,90
3	51,60	27,30	18,30
4	75,60	43,80	27,60
5	80,50	54,80	22,50
6	70,40	44,00	23,60
7	74,80	40,90	30,30
8	73,50	41,50	30,00
9	58,60	31,40	25,50
10	74,10	42,40	25,90
11	76,80	45,70	28,30
12	80,30	53,60	23,90
13	71,80	48,30	19,20
14	65,50	35,20	28,00
15	68,00	30,40	29,10
16	75,20	47,10	23,00
17	77,50	47,10	24,00
18	75,10	48,90	20,00
19	75,00	54,20	17,60
20	67,00	38,10	19,50
21	89,30	56,90	28,20
22	77,40	33,20	36,80
23	89,50	49,30	33,30
24	83,90	35,50	42,80
25	82,50	42,80	33,20
26	74,60	39,60	31,80
27	77,50	35,90	36,90
28	90,20	51,10	32,40
29	81,80	47,40	31,40
30	89,10	62,40	25,70
31	92,30	57,90	33,30
32	71,50	42,70	28,00
33	79,90	47,10	29,10
34	68,50	36,70	30,50
35	75,70	32,70	37,80
mediana	75,60	42,80	28,00
percentil 5	61,12	31,10	18,72
percentil 95	89,71	57,20	37,17

**Anexo 14 (continuação):** Expressão do receptor da Interleucina 7 em linfócitos T periféricos de pacientes portadores de DM1A e indivíduos controle obtida por citometria de fluxo (porcentagem de linfócitos T periféricos que expressam o IL-7R)

Indivíduos controle	Expressão de IL-7R em linfócitos TCD3+ (%)	Expressão de IL-7R em linfócitos TCD4+ (%)	Expressão de IL-7R em linfócitos TCD8+ (%)
36	88,00	60,90	23,30
37	85,60	44,60	35,00
38	83,10	49,50	33,60
39	67,30	40,90	20,00
40	44,60	43,40	33,20
41	97,20	60,10	33,70
42	83,70	54,60	24,70
43	83,70	57,50	21,40
44	76,80	41,40	32,80
45	84,10	38,20	36,40
46	85,70	55,10	25,10
47	77,20	36,80	34,60
48	55,10	33,50	18,60
49	81,50	52,70	27,10
50	67,40	36,30	25,70
51	82,00	52,10	26,80
52	88,50	55,90	28,30
53	74,80	41,00	27,00
54	85,40	58,40	24,70
55	57,60	33,20	21,30
56	87,60	46,20	38,40
57	87,00	50,40	23,20
58	84,70	43,70	24,30
59	89,40	44,80	39,70
60	88,60	45,20	35,50
mediana	83,70	45,20	27,00
percentil 5	55,60	34,06	20,26
percentil 95	89,24	59,76	38,00
Teste de Mann-Whitney (p=)	0,030	0,130	0,618

**ANEXO 15:** Intensidade média de fluorescência (MFI) do receptor da Interleucina 7 em linfócitos T periféricos de pacientes DM1A e controles

<b>Pacientes DM1A</b>	<b>MFI para IL-7R</b>
1	85,72
2	24,85
3	11,47
4	67,78
5	270,26
7	79,89
8	280,36
9	23,74
10	113,43
11	153,51
12	601,16
13	690,47
14	30,52
15	26,79
16	157,08
17	1.583,52
18	466,35
19	176,46
20	25,52
21	2.237,30
22	157,05
23	2.186,33
24	1.286,83
25	548,11
26	72,72
27	339,00
28	587,41
29	136,61
30	1.146,72
31	387,61
32	37,47
33	396,64
34	58,78
35	139,79
mediana	157,07
percentil 5	24,46
percentil 95	1.794,50

**ANEXO 15 (continuação):** Intensidade média de fluorescência (MFI) do receptor da Interleucina 7 em linfócitos T periféricos de pacientes DM1A e controles

Indivíduos controle	MFI para IL-7R
36	1512,02
37	811,40
38	207,52
39	48,71
41	16978,78
42	535,65
43	116,06
44	113,35
45	353,43
46	1257,37
47	207,53
48	143,16
49	774,85
50	118,81
51	690,42
52	435,07
53	180,57
54	477,24
55	17,23
56	1095,06
57	574,00
58	774,82
59	1736,40
60	1776,73
mediana	506,45
percentil 5	58,41
percentil 95	1770,68
Teste de Mann-Whitney (p=)	0,03

**ANEXO 16:** Correlação entre títulos de Anticorpo anti-descarboxilase do ácido glutâmico 65 (anti-GAD65) e expressão dos receptores de interleucinas de cadeia gama comum

Pacientes DM1A	AC anti GAD (UI/ml)	Expressão de IL-21R em CD3 (%)	Expressão de IL-21R em CD4 (%)	Expressão de IL-2R $\alpha$ em CD3 (%)	Expressão de IL-2R $\alpha$ em CD4 (%)	Expressão de IL-2R $\beta$ em CD3 (%)
1	15	17,9	6,31	17,8	8,07	10,1
2	0,52	6,24	1,92	6,1	3,41	3,55
3	1,07	12,9	2,62	10,6	3,51	8,39
4	9,1	22,1	8,2	19,4	1,3	9,6
5	61,2	11,9	5,28	12,2	7,5	7,76
6	3,7	15,3	6,36	12,2	7,19	7,67
7	10,4	16,9	6,69	11,6	7,29	8,1
8	0,9	26,5	7,06	12	3,15	10,8
9	1,8	23	5,95	10,7	2,58	14,6
10	56,3	29	10,1	16	5,74	15,7
11	28,3	27,4	5,5	20,8	6,5	22,1
12	31,2	18	6,54	12,5	8,07	10,5
13	0,42	14,4	9,93	7,85	6,07	7,14
14	53,5	16,9	5,75	14,4	7,96	6,78
15	0,7	28,7	7,86	19,1	7,14	13,1
16	34,4	30,6	13,2	17,5	7,5	18,9
17	0,7	19,6	6	16,8	7,23	15,4
18	0,6	21	11	10,1	6,34	10
19	7,2	19,6	8,51	12,5	7,7	11,8
20	0,1	22,4	8,7	13,7	8,7	10,3
21	25,8	41,5	17,2	37,5	15,5	30,9
22	13,3	47,8	13,7	38,1	8,4	39,2
23	0	47,3	17,7	35,1	10,4	34,5
24	1,82	53,6	13,6	45,1	10,4	47,1
25	9,5	28,9	10,9	14,3	5,19	17,1
26	8	34,4	9,67	23	1,73	31,2
27	0,7	44,8	11,4	39	9,5	34,8
28	15,6	52,4	27,8	38,4	21,3	35
29	50,4	46,4	24,2	29,6	16,6	28,7
30	12,9	63,4	39	53,4	35,3	50,2
31	0,4	62,6	43,1	49,9	34,5	47,7
32	0,3	38,4	20,5	22,9	15,3	23,9
33	26,2	26,9	13,5	19,3	11,7	16,9
34	2,13	46,1	19,3	28,3	14,2	26
35	6,32	29,3	10,2	17,7	7,8	14,9
Correlação Spearman		0,27	-0,18	0,21	-0,22	0,04
p=		0,11	0,27	0,21	0,20	0,78

**ANEXO 16 (continuação):** Correlação entre títulos de Anticorpo anti-descarboxilase do ácido glutâmico 65 (anti-GAD65) e expressão dos receptores de interleucinas de cadeia gama comum.

Pacientes DM1A	AC anti GAD65 (UI/ml)	Expressão de IL-2R $\beta$ em CD4 (%)	Expressão de IL-4R em CD3 (%)	Expressão de IL-4R em CD4 (%)	Expressão de IL-7R em CD3 (%)	Expressão de IL-7R em CD4 (%)
1	15	1,5	14,9	4,52	76,1	39,3
2	0,52	0,46	7,45	2,56	62,2	40,7
3	1,07	0,76	5,77	1,3	51,6	27,3
4	9,1	0,95	12	3	75,6	43,8
5	61,2	2,41	23	7,15	80,5	54,8
6	3,7	1,85	9	2,42	70,4	44
7	10,4	1,85	12,8	4,87	74,8	40,9
8	0,9	0,15	24,2	5,08	73,5	41,5
9	1,8	0,92	17,4	2,06	58,6	31,4
10	56,3	1,94	15,6	2,83	74,1	42,4
11	28,3	2,1	24,6	35,8	76,8	45,7
12	31,2	2,08	13,6	4,39	80,3	53,6
13	0,42	3,52	6,73	4,48	71,8	48,3
14	53,5	0,99	9,61	2,42	65,5	35,2
15	0,7	1,46	17,4	3	68	30,4
16	34,4	4,62	21,7	6,1	75,2	47,1
17	0,7	2,17	17,1	5,76	77,5	47,1
18	0,6	3,22	8,7	4,26	75,1	48,9
19	7,2	2,8	11,2	4,27	75	54,2
20	0,1	1,9	8	2,6	67	38,1
21	25,8	8,42	36,4	13,9	89,3	56,9
22	13,3	5,12	41,1	8	77,4	33,2
23	0	6,46	40,4	11,5	89,5	49,3
24	1,82	6,6	45	8,84	83,9	35,5
25	9,5	2,66	36,8	9,66	82,5	42,8
26	8	5,48	33,8	9,54	74,6	39,6
27	0,7	3,5	35,9	5,2	77,5	35,9
28	15,6	15,6	36,1	19,2	90,2	51,1
29	50,4	12,9	28,9	16,5	81,8	47,4
30	12,9	28,4	55,6	32,8	89,1	62,4
31	0,4	31,2	55,7	39,6	92,3	57,9
32	0,3	11	20,6	11	71,5	42,7
33	26,2	6,76	18,4	9,49	79,9	47,1
34	2,13	8,38	26,5	11,1	68,5	36,7
35	6,32	4,05	15,6	5,24	75,7	32,7
correlação Spearman		0,3307	0,04512	0,08001	0,2696	0,01261
p=		0,0524	0,7969	0,6478	0,1174	0,9427

**ANEXO 17:** Correlação entre títulos de Anticorpo anti-tirosina fosfatase (anti-IA2) e expressão dos receptores de interleucinas de cadeia gama comum

pacientes DM1A	Anticorpo anti-IA2 (UI/ml)	Expressão de IL-21R em CD3 (%)	Expressão de IL-21R em CD4 (%)	Expressão de IL-2R $\alpha$ em CD3 (%)	Expressão de IL-2R $\alpha$ em CD4 (%)	Expressão de IL-2R $\beta$ em CD3 (%)
1	2.1	17,9	6,31	17,8	8,07	10,1
2	0,2	6,24	1,92	6,1	3,41	3,55
3	9,8	12,9	2,62	10,6	3,51	8,39
4	7.74	22,1	8,2	19,4	1,3	9,6
5	0.11	11,9	5,28	12,2	7,5	7,76
6	1,6	15,3	6,36	12,2	7,19	7,67
7	0,7	16,9	6,69	11,6	7,29	8,1
8	23.3	26,5	7,06	12	3,15	10,8
9	19.5	23	5,95	10,7	2,58	14,6
10	11.9	29	10,1	16	5,74	15,7
11	45.1	27,4	5,5	20,8	6,5	22,1
12	15.6	18	6,54	12,5	8,07	10,5
13	2.7	14,4	9,93	7,85	6,07	7,14
14	1.07	16,9	5,75	14,4	7,96	6,78
15	27,9	28,7	7,86	19,1	7,14	13,1
16	3,2	30,6	13,2	17,5	7,5	18,9
17	16,4	19,6	6	16,8	7,23	15,4
18	11,6	21	11	10,1	6,34	10
19	7,9	19,6	8,51	12,5	7,7	11,8
20	8,2	22,4	8,7	13,7	8,7	10,3
21	10,7	41,5	17,2	37,5	15,5	30,9
22	27,5	47,8	13,7	38,1	8,4	39,2
23	0,4	47,3	17,7	35,1	10,4	34,5
24	> 100	53,6	13,6	45,1	10,4	47,1
25	0	28,9	10,9	14,3	5,19	17,1
26	11,4	34,4	9,67	23	1,73	31,2
27	1,1	44,8	11,4	39	9,5	34,8
28	0,1	52,4	27,8	38,4	21,3	35
29	5,9	46,4	24,2	29,6	16,6	28,7
30	0	63,4	39	53,4	35,3	50,2
31	0,4	62,6	43,1	49,9	34,5	47,7
32	0,5	38,4	20,5	22,9	15,3	23,9
33	8,08	26,9	13,5	19,3	11,7	16,9
34	15,11	46,1	19,3	28,3	14,2	26
35	2,73	29,3	10,2	17,7	7,8	14,9
Correlação Spearman		-0,1247	-0,08729	-0,1457	-0,1734	-0,3162
p=		0,4754	0,6181	0,4035	0,3191	0,0642

**ANEXO 17 (continuação):** Correlação entre títulos de Anticorpo anti-tirosina fosfatase (anti-IA2) e expressão dos receptores de interleucinas de cadeia gama comum

pacientes DM1A	Anticorpo anti-IA2 (UI/ml)	Expressão de IL-2R $\beta$ em linfócitos TCD4 (%)	Expressão de IL-4R em linfócitos T CD3 (%)	Expressão de IL-4R em CD4 (%)	Expressão de IL-7R em CD3 (%)
1	2.1	1,5	14,9	4,52	76,1
2	0,2	0,46	7,45	2,56	62,2
3	9,8	0,76	5,77	1,3	51,6
4	7.74	0,95	12	3	75,6
5	0.11	2,41	23	7,15	80,5
6	1,6	1,85	9	2,42	70,4
7	0,7	1,85	12,8	4,87	74,8
8	23.3	0,15	24,2	5,08	73,5
9	19.5	0,92	17,4	2,06	58,6
10	11.9	1,94	15,6	2,83	74,1
11	45.1	2,1	24,6	35,8	76,8
12	15.6	2,08	13,6	4,39	80,3
13	2.7	3,52	6,73	4,48	71,8
14	1.07	0,99	9,61	2,42	65,5
15	27,9	1,46	17,4	3	68
16	3,2	4,62	21,7	6,1	75,2
17	16,4	2,17	17,1	5,76	77,5
18	11,6	3,22	8,7	4,26	75,1
19	7,9	2,8	11,2	4,27	75
20	8,2	1,9	8	2,6	67
21	10,7	8,42	36,4	13,9	89,3
22	27,5	5,12	41,1	8	77,4
23	0,4	6,46	40,4	11,5	89,5
24	> 100	6,6	45	8,84	83,9
25	0	2,66	36,8	9,66	82,5
26	11,4	5,48	33,8	9,54	74,6
27	1,1	3,5	35,9	5,2	77,5
28	0,1	15,6	36,1	19,2	90,2
29	5,9	12,9	28,9	16,5	81,8
30	0	28,4	55,6	32,8	89,1
31	0,4	31,2	55,7	39,6	92,3
32	0,5	11	20,6	11	71,5
33	8,08	6,76	18,4	9,49	79,9
34	15,11	8,38	26,5	11,1	68,5
35	2,73	4,05	15,6	5,24	75,7
Correlação Spearman		0,2923	-0,1656	-0,1956	-0,3308
p=		0,0884	0,3417	0,2601	0,0522



**ANEXO 18:** Expressão relativa do gene do receptor da interleucina 21 (IL-21R) por PCR em tempo real em pacientes portadores de DM1A divididos em tercís de acordo com valores de expressão de IL-21R por citometria de fluxo em linfócitos T CD3+

	<b>Expressão relativa de IL21R Tercil superior</b>	<b>Expressão relativa de IL21R Tercil médio</b>	<b>Expressão relativa de IL21R Tercil inferior</b>
	0,63	3,16	0,51
	2,55	0,99	0,66
	0,49	1,01	0,97
	0,6	2,04	0,62
	0,39	0,45	1,11
	1,06	1,51	0,68
	0,6	1,62	
média	0,90	1,47	1,18
Desvio-padrão	0,69	0,83	1,15

ANOVA p=0,4615

**ANEXO 19:** Expressão relativa do gene da cadeia alfa do receptor da interleucina 2 (IL-2R $\alpha$ ) por PCR em tempo real em pacientes portadores de DM1A divididos em tercils de acordo com valores de expressão de IL-2R $\alpha$  por citometria de fluxo em linfócitos T CD3+

	<b>Expressão relativa de IL-2R<math>\alpha</math> Tercil superior</b>	<b>Expressão relativa de IL-2R<math>\alpha</math> Tercil médio</b>	<b>Expressão relativa de IL-2R<math>\alpha</math> Tercil inferior</b>
	1,3	1	0,3
	1,3	0,69	1,16
	0,9	0,76	1,21
	0,49	0,3	0,8
	1,61	1,08	0,59
	0,3	0,48	2,1
	2	0,4	1,25
	0,63		0,48
média	1,06	0,67	0,98
Desvio Padrão	0,58	0,29	0,57

ANOVA  $p=0,32$

**ANEXO 20:** Expressão relativa do gene da cadeia beta do receptor da interleucina 2 (IL-2R $\beta$ ) por PCR em tempo real em pacientes portadores de DM1A divididos em tercils de acordo com valores de expressão de IL-2R $\beta$  por citometria de fluxo em linfócitos T CD3+

	Expressão relativa de IL-2R $\beta$ Tercil superior	Expressão relativa de IL-2R $\beta$ Tercil médio	Expressão relativa de IL-2R $\beta$ Tercil inferior
	1,81	1,36	0,85
	1,61	0,76	0,36
	0,49	1,25	3,39
	1,7	0,2	1,58
	0,3	0,48	1,16
	2	0,4	11,35
	0,63	1,36	0,86
		1,08	1,43
média	1,22	0,86	2,62
Desvio Padrão	0,71	0,46	3,64

ANOVA  $p=0,26$

## ***8 Referências***

1. Baschal EE, Eisenbarth GS. Extreme genetic risk for type 1A diabetes in the post-genome era. *J Autoimmun.* Aug 2008;31(1):1-6.
2. Kelly MA, Rayner ML, Mijovic CH, Barnett AH. Molecular aspects of type 1 diabetes. *Mol Pathol.* Feb 2003;56(1):1-10.
3. Silva ME, Mory D, Davini E. [Genetic and humoral autoimmunity markers of type 1 diabetes: from theory to practice]. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* Mar 2008;52(2):166-180.
4. Pugliese A, Eisenbarth GS. Type 1 diabetes mellitus of man: genetic susceptibility and resistance. *Adv Exp Med Biol.* 2004;552:170-203.
5. Kantarova D, Buc M. Genetic susceptibility to type 1 diabetes mellitus in humans. *Physiol Res.* 2007;56(3):255-266.
6. Undlien DE, Hamaguchi K, Kimura A, et al. IDDM susceptibility associated with polymorphisms in the insulin gene region. A study of blacks, Caucasians and orientals. *Diabetologia.* Aug 1994;37(8):745-749.
7. Eisenbarth GS. Type I diabetes mellitus. A chronic autoimmune disease. *N Engl J Med.* May 22 1986;314(21):1360-1368.
8. Mathis D, Benoist C. Back to central tolerance. *Immunity.* May 2004;20(5):509-516.
9. Liston A, Lesage S, Gray DH, et al. Generalized resistance to thymic deletion in the NOD mouse; a polygenic trait characterized by defective induction of Bim. *Immunity.* Dec 2004;21(6):817-830.
10. Dosch H, Cheung RK, Karges W, Pietropaolo M, Becker DJ. Persistent T cell anergy in human type 1 diabetes. *J Immunol.* Dec 15 1999;163(12):6933-6940.

11. Wildin RS, Smyk-Pearson S, Filipovich AH. Clinical and molecular features of the immunodysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X linked (IPEX) syndrome. *J Med Genet.* Aug 2002;39(8):537-545.
12. Liu W, Putnam AL, Xu-Yu Z, et al. CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4+ T reg cells. *J Exp Med.* Jul 10 2006;203(7):1701-1711.
13. Seddiki N, Santner-Nanan B, Martinson J, et al. Expression of interleukin (IL)-2 and IL-7 receptors discriminates between human regulatory and activated T cells. *J Exp Med.* Jul 10 2006;203(7):1693-1700.
14. Glisic-Milosavljevic S, Waukau J, Jailwala P, et al. At-risk and recent-onset type 1 diabetic subjects have increased apoptosis in the CD4+CD25+ T-cell fraction. *PLoS One.* 2007;2(1):e146.
15. Boyman O, Purton JF, Surh CD, Sprent J. Cytokines and T-cell homeostasis. *Curr Opin Immunol.* Jun 2007;19(3):320-326.
16. Seder RA, Ahmed R. Similarities and differences in CD4+ and CD8+ effector and memory T cell generation. *Nat Immunol.* Sep 2003;4(9):835-842.
17. Abbas AK, ed *cellular and molecular immunology*. 5th edition ed: saunders; 2008.
18. Harrington LE, Hatton RD, Mangan PR, et al. Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat Immunol.* Nov 2005;6(11):1123-1132.
19. Park H, Li Z, Yang XO, et al. A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nat Immunol.* Nov 2005;6(11):1133-1141.
20. Tesmer LA, Lundy SK, Sarkar S, Fox DA. Th17 cells in human disease. *Immunol Rev.* Jun 2008;223:87-113.

21. Manel N, Unutmaz D, Littman DR. The differentiation of human T(H)-17 cells requires transforming growth factor-beta and induction of the nuclear receptor ROR $\gamma$ . *Nat Immunol*. Jun 2008;9(6):641-649.
22. Nurieva R, Yang XO, Martinez G, et al. Essential autocrine regulation by IL-21 in the generation of inflammatory T cells. *Nature*. Jul 26 2007;448(7152):480-483.
23. Korn T, Bettelli E, Gao W, et al. IL-21 initiates an alternative pathway to induce proinflammatory T(H)17 cells. *Nature*. Jul 26 2007;448(7152):484-487.
24. Sonderegger I, Kisielow J, Meier R, King C, Kopf M. IL-21 and IL-21R are not required for development of Th17 cells and autoimmunity in vivo. *Eur J Immunol*. Jul 2008;38(7):1833-1838.
25. Kovanen PE, Leonard WJ. Cytokines and immunodeficiency diseases: critical roles of the gamma(c)-dependent cytokines interleukins 2, 4, 7, 9, 15, and 21, and their signaling pathways. *Immunol Rev*. Dec 2004;202:67-83.
26. Leonard WJ, Spolski R. Interleukin-21: a modulator of lymphoid proliferation, apoptosis and differentiation. *Nat Rev Immunol*. Sep 2005;5(9):688-698.
27. Rochman Y, Spolski R, Leonard WJ. New insights into the regulation of T cells by gamma(c) family cytokines. *Nat Rev Immunol*. Jul 2009;9(7):480-490.
28. Spolski R, Leonard WJ. The Yin and Yang of interleukin-21 in allergy, autoimmunity and cancer. *Curr Opin Immunol*. Jun 2008;20(3):295-301.
29. Parrish-Novak J, Dillon SR, Nelson A, et al. Interleukin 21 and its receptor are involved in NK cell expansion and regulation of lymphocyte function. *Nature*. Nov 2 2000;408(6808):57-63.

30. Zeng R, Spolski R, Finkelstein SE, et al. Synergy of IL-21 and IL-15 in regulating CD8<sup>+</sup> T cell expansion and function. *J Exp Med*. Jan 3 2005;201(1):139-148.
31. Mehta DS, Wurster AL, Grusby MJ. Biology of IL-21 and the IL-21 receptor. *Immunol Rev*. Dec 2004;202:84-95.
32. Osaki M, Takamatsu D, Tsuji N, Sekizaki T. Cloning and characterization of the gene encoding O-acetylserine lyase from *Streptococcus suis*. *Curr Microbiol*. Jan 2000;40(1):67-71.
33. Ozaki K, Spolski R, Feng CG, et al. A critical role for IL-21 in regulating immunoglobulin production. *Science*. Nov 22 2002;298(5598):1630-1634.
34. Leonard WJ, Zeng R, Spolski R. Interleukin 21: a cytokine/cytokine receptor system that has come of age. *J Leukoc Biol*. Aug 2008;84(2):348-356.
35. Herber D, Brown TP, Liang S, Young DA, Collins M, Dunussi-Joannopoulos K. IL-21 has a pathogenic role in a lupus-prone mouse model and its blockade with IL-21R.Fc reduces disease progression. *J Immunol*. Mar 15 2007;178(6):3822-3830.
36. Bubier JA, Sproule TJ, Foreman O, et al. A critical role for IL-21 receptor signaling in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus in BXSB-Yaa mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Feb 3 2009;106(5):1518-1523.
37. Sawalha AH, Kaufman KM, Kelly JA, et al. Genetic association of interleukin-21 polymorphisms with systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis*. Apr 2008;67(4):458-461.
38. Mitoma H, Horiuchi T, Kimoto Y, et al. Decreased expression of interleukin-21 receptor on peripheral B lymphocytes in systemic lupus erythematosus. *Int J Mol Med*. Oct 2005;16(4):609-615.



39. Young DA, Hegen M, Ma HL, et al. Blockade of the interleukin-21/interleukin-21 receptor pathway ameliorates disease in animal models of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* Apr 2007;56(4):1152-1163.
40. Li J, Shen W, Kong K, Liu Z. Interleukin-21 induces T-cell activation and proinflammatory cytokine secretion in rheumatoid arthritis. *Scand J Immunol.* Nov 2006;64(5):515-522.
41. Jungel A, Distler JH, Kurowska-Stolarska M, et al. Expression of interleukin-21 receptor, but not interleukin-21, in synovial fibroblasts and synovial macrophages of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* May 2004;50(5):1468-1476.
42. Piao WH, Jee YH, Liu RL, et al. IL-21 modulates CD4+ CD25+ regulatory T-cell homeostasis in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Scand J Immunol.* Jan 2008;67(1):37-46.
43. Denny P, Lord CJ, Hill NJ, et al. Mapping of the IDDM locus Idd3 to a 0.35-cM interval containing the interleukin-2 gene. *Diabetes.* Apr 1997;46(4):695-700.
44. Todd JA, Wicker LS. Genetic protection from the inflammatory disease type 1 diabetes in humans and animal models. *Immunity.* Sep 2001;15(3):387-395.
45. Yamanouchi J, Rainbow D, Serra P, et al. Interleukin-2 gene variation impairs regulatory T cell function and causes autoimmunity. *Nat Genet.* Mar 2007;39(3):329-337.
46. Ikegami H, Fujisawa T, Makino S, Ogihara T. Congenic mapping and candidate sequencing of susceptibility genes for Type 1 diabetes in the NOD mouse. *Ann N Y Acad Sci.* Nov 2003;1005:196-204.
47. Zhernakova A, Alizadeh BZ, Bevova M, et al. Novel association in chromosome 4q27 region with rheumatoid arthritis and confirmation of type 1 diabetes point to a general risk locus for autoimmune diseases. *Am J Hum Genet.* Dec 2007;81(6):1284-1288.

48. Asano K, Ikegami H, Fujisawa T, et al. Molecular scanning of interleukin-21 gene and genetic susceptibility to type 1 diabetes. *Hum Immunol*. May 2007;68(5):384-391.
49. King C, Ilic A, Koelsch K, Sarvetnick N. Homeostatic expansion of T cells during immune insufficiency generates autoimmunity. *Cell*. Apr 16 2004;117(2):265-277.
50. Spolski R, Kashyap M, Robinson C, Yu Z, Leonard WJ. IL-21 signaling is critical for the development of type I diabetes in the NOD mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Sep 16 2008;105(37):14028-14033.
51. Sutherland AP, Van Belle T, Wurster AL, et al. Interleukin-21 is required for the development of type 1 diabetes in NOD mice. *Diabetes*. May 2009;58(5):1144-1155.
52. Nelson BH, Willerford DM. Biology of the interleukin-2 receptor. *Adv Immunol*. 1998;70:1-81.
53. Burchill MA, Yang J, Vang KB, Farrar MA. Interleukin-2 receptor signaling in regulatory T cell development and homeostasis. *Immunol Lett*. Nov 30 2007;114(1):1-8.
54. Refaeli Y, Van Parijs L, London CA, Tschopp J, Abbas AK. Biochemical mechanisms of IL-2-regulated Fas-mediated T cell apoptosis. *Immunity*. May 1998;8(5):615-623.
55. Malek TR. The main function of IL-2 is to promote the development of T regulatory cells. *J Leukoc Biol*. Dec 2003;74(6):961-965.
56. Tang Q, Henriksen KJ, Bi M, et al. In vitro-expanded antigen-specific regulatory T cells suppress autoimmune diabetes. *J Exp Med*. Jun 7 2004;199(11):1455-1465.
57. Lundsgaard D, Holm TL, Hornum L, Markholst H. In vivo control of diabetogenic T-cells by regulatory CD4+CD25+ T-cells expressing Foxp3. *Diabetes*. Apr 2005;54(4):1040-1047.

58. Lindley S, Dayan CM, Bishop A, Roep BO, Peakman M, Tree TI. Defective suppressor function in CD4(+)CD25(+) T-cells from patients with type 1 diabetes. *Diabetes*. Jan 2005;54(1):92-99.
59. Putnam AL, Vendrame F, Dotta F, Gottlieb PA. CD4+CD25high regulatory T cells in human autoimmune diabetes. *J Autoimmun*. Feb 2005;24(1):55-62.
60. Long SA, Cerosaletti K, Bollyky PL, et al. Defects in IL-2R signaling contribute to diminished maintenance of FOXP3 expression in CD4(+)CD25(+) regulatory T-cells of type 1 diabetic subjects. *Diabetes*. Feb 2010;59(2):407-415.
61. Nelms K, Keegan AD, Zamorano J, Ryan JJ, Paul WE. The IL-4 receptor: signaling mechanisms and biologic functions. *Annu Rev Immunol*. 1999;17:701-738.
62. Tay SS, Plain KM, Bishop GA. Role of IL-4 and Th2 responses in allograft rejection and tolerance. *Curr Opin Organ Transplant*. Feb 2009;14(1):16-22.
63. Voehringer D, Shinkai K, Locksley RM. Type 2 immunity reflects orchestrated recruitment of cells committed to IL-4 production. *Immunity*. Mar 2004;20(3):267-277.
64. Saito A, Okazaki H, Sugawara I, Yamamoto K, Takizawa H. Potential action of IL-4 and IL-13 as fibrogenic factors on lung fibroblasts in vitro. *Int Arch Allergy Immunol*. Oct 2003;132(2):168-176.
65. Leonardi A, Cortivo R, Fregona I, Plebani M, Secchi AG, Abatangelo G. Effects of Th2 cytokines on expression of collagen, MMP-1, and TIMP-1 in conjunctival fibroblasts. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. Jan 2003;44(1):183-189.
66. Idzerda RL, March CJ, Mosley B, et al. Human interleukin 4 receptor confers biological responsiveness and defines a novel receptor superfamily. *J Exp Med*. Mar 1 1990;171(3):861-873.

67. Mirel DB, Valdes AM, Lazzeroni LC, Reynolds RL, Erlich HA, Noble JA. Association of IL4R haplotypes with type 1 diabetes. *Diabetes*. Nov 2002;51(11):3336-3341.
68. Maier LM, Chapman J, Howson JM, et al. No evidence of association or interaction between the IL4RA, IL4, and IL13 genes in type 1 diabetes. *Am J Hum Genet*. Mar 2005;76(3):517-521.
69. Qu HQ, Tessier MC, Frechette R, Bacot F, Polychronakos C. Lack of association of type 1 diabetes with the IL4R gene. *Diabetologia*. May 2006;49(5):958-961.
70. Jiang Q, Li WQ, Aiello FB, et al. Cell biology of IL-7, a key lymphotrophin. *Cytokine Growth Factor Rev*. Aug-Oct 2005;16(4-5):513-533.
71. Ku CC, Murakami M, Sakamoto A, Kappler J, Murrack P. Control of homeostasis of CD8+ memory T cells by opposing cytokines. *Science*. Apr 28 2000;288(5466):675-678.
72. Kaech SM, Tan JT, Wherry EJ, Konieczny BT, Surh CD, Ahmed R. Selective expression of the interleukin 7 receptor identifies effector CD8 T cells that give rise to long-lived memory cells. *Nat Immunol*. Dec 2003;4(12):1191-1198.
73. Mazzucchelli R, Durum SK. Interleukin-7 receptor expression: intelligent design. *Nat Rev Immunol*. Feb 2007;7(2):144-154.
74. von Freeden-Jeffry U, Vieira P, Lucian LA, McNeil T, Burdach SE, Murray R. Lymphopenia in interleukin (IL)-7 gene-deleted mice identifies IL-7 as a nonredundant cytokine. *J Exp Med*. Apr 1 1995;181(4):1519-1526.
75. Bhatia SK, Tygrett LT, Grabstein KH, Waldschmidt TJ. The effect of in vivo IL-7 deprivation on T cell maturation. *J Exp Med*. Apr 1 1995;181(4):1399-1409.

76. Kim HR, Hong MS, Dan JM, Kang I. Altered IL-7R $\alpha$  expression with aging and the potential implications of IL-7 therapy on CD8<sup>+</sup> T-cell immune responses. *Blood*. Apr 1 2006;107(7):2855-2862.
77. Rosenthal LA, Winestock KD, Finbloom DS. IL-2 and IL-7 induce heterodimerization of STAT5 isoforms in human peripheral blood T lymphoblasts. *Cell Immunol*. Nov 1 1997;181(2):172-181.
78. Bayer AL, Lee JY, de la Barrera A, Surh CD, Malek TR. A function for IL-7R for CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> T regulatory cells. *J Immunol*. Jul 1 2008;181(1):225-234.
79. Elyaman W, Bradshaw EM, Uyttenhove C, et al. IL-9 induces differentiation of TH17 cells and enhances function of FoxP3<sup>+</sup> natural regulatory T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Aug 4 2009; 106(31):12885-12890.
80. Bauer JH, Liu KD, You Y, Lai SY, Goldsmith MA. Heteromerization of the gammaC chain with the interleukin-9 receptor alpha subunit leads to STAT activation and prevention of apoptosis. *J Biol Chem*. Apr 10 1998;273(15):9255-9260.
81. Demoulin JB, Van Roost E, Stevens M, Groner B, Renauld JC. Distinct roles for STAT1, STAT3, and STAT5 in differentiation gene induction and apoptosis inhibition by interleukin-9. *J Biol Chem*. Sep 3 1999;274(36):25855-25861.
82. Overwijk WW, Schluns KS. Functions of gammaC cytokines in immune homeostasis: current and potential clinical applications. *Clin Immunol*. Aug 2009;132(2):153-165.
83. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-Delta Delta C(T)</sup> Method. *Methods*. Dec 2001;25(4):402-408.

84. Yoon JW, Jun HS. Cellular and molecular pathogenic mechanisms of insulin-dependent diabetes mellitus. *Ann N Y Acad Sci.* Apr 2001; 928:200-211.
85. Yoon JW, Jun HS. Autoimmune destruction of pancreatic beta cells. *Am J Ther.* Nov-Dec 2005;12(6):580-591.
86. Distler JH, Jungel A, Kowal-Bielecka O, et al. Expression of interleukin-21 receptor in epidermis from patients with systemic sclerosis. *Arthritis Rheum.* Mar 2005;52(3):856-864.
87. Sakaguchi S, Yamaguchi T, Nomura T, Ono M. Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell.* May 30 2008;133(5):775-787.
88. Maiti AK, Kim-Howard X, Viswanathan P, et al. Confirmation of an association between rs6822844 at the Il2-Il21 region and multiple autoimmune diseases: evidence of a general susceptibility locus. *Arthritis Rheum.* Feb 2010;62(2):323-329.
89. Bluestone JA, Abbas AK. Natural versus adaptive regulatory T cells. *Nat Rev Immunol.* Mar 2003;3(3):253-257.
90. Antov A, Yang L, Vig M, Baltimore D, Van Parijs L. Essential role for STAT5 signaling in CD25+CD4+ regulatory T cell homeostasis and the maintenance of self-tolerance. *J Immunol.* Oct 1 2003;171(7):3435-3441.
91. Jailwala P, Waukau J, Glisic S, et al. Apoptosis of CD4+ CD25(high) T cells in type 1 diabetes may be partially mediated by IL-2 deprivation. *PLoS One.* 2009;4(8):e6527.
92. Morris SC, Orekhova T, Meadows MJ, Heidorn SM, Yang J, Finkelman FD. IL-4 induces in vivo production of IFN-gamma by NK and NKT cells. *J Immunol.* May 1 2006;176(9):5299-5305.
93. Maerten P, Shen C, Bullens DM, et al. Effects of interleukin 4 on CD25+CD4+ regulatory T cell function. *J Autoimmun.* Sep 2005;25(2):112-120.

- 
94. Pace L, Pioli C, Doria G. IL-4 modulation of CD4+CD25+ T regulatory cell-mediated suppression. *J Immunol.* Jun 15 2005;174(12):7645-7653.
  95. Yates J, Rovis F, Mitchell P, et al. The maintenance of human CD4+ CD25+ regulatory T cell function: IL-2, IL-4, IL-7 and IL-15 preserve optimal suppressive potency in vitro. *Int Immunol.* Jun 2007; 19(6):785-799.
  96. Verma ND, Plain KM, Nomura M, et al. CD4+CD25+ T cells alloactivated ex vivo by IL-2 or IL-4 become potent alloantigen-specific inhibitors of rejection with different phenotypes, suggesting separate pathways of activation by Th1 and Th2 responses. *Blood.* Jan 8 2009;113(2):479-487.
  97. Skapenko A, Kalden JR, Lipsky PE, Schulze-Koops H. The IL-4 receptor alpha-chain-binding cytokines, IL-4 and IL-13, induce forkhead box P3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells from CD25-CD4+ precursors. *J Immunol.* Nov 1 2005;175(9):6107-6116.
  98. Wei J, Duramad O, Perng OA, Reiner SL, Liu YJ, Qin FX. Antagonistic nature of T helper 1/2 developmental programs in opposing peripheral induction of Foxp3+ regulatory T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Nov 13 2007;104(46):18169-18174.
-