

O papel de variações genéticas no gene *FCN1* e *FCN2* no desenvolvimento do Diabetes Mellitus Tipo 1 em Pernambuco

Natassia Javorski Rodrigues¹; Lucas André Cavalcanti Brandão²

¹Estudante do Curso de Ciências Biológicas Bacharelado - CCB – UFPE; E-mail: javorski.natassia13@gmail.com, ²Docente/pesquisador do Depto de Patologia – CCS – UFPE. E-mail: lucas.cbrandao@ufpe.br

Sumário: As ficolinas são proteínas da imunidade inata com a capacidade de ativar o sistema complemento, através do caminho das lectinas. Polimorfismos de base única (SNPs) dos genes da *FCN1* e *FCN2*, codificando a ficolina 1 e 2, tem sido relatados com um aumento da susceptibilidade a doenças autoimunes e infecciosas. Nosso estudo tem por objetivo investigar a associação entre os polimorfismos dos genes *FCN1* e *FCN2* e o desenvolvimento do diabetes *mellitus* tipo 1 (DM1). Dois SNPs na *FCN1*, rs29897272 e rs1071583 e três na *FCN2*, rs17514136, rs3124954 e rs7851696 foram estudados em 204 crianças diagnosticadas com o DM1 e 193 indivíduos controles todos do Nordeste do Brasil. Nenhuma associação direta foi encontrada com o desenvolvimento do DM1, entretanto, o genótipo T/T (rs1071583) da *FCN1* foi associado com uma idade de diagnóstico precoce quando comparados com os genótipos C/C e C/T (p-value=0.016). Estudos adicionais de réplica são necessários para que o papel desempenhado pelas ficolinas no desenvolvimento do DM1 seja elucidado.

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

INTRODUÇÃO

O Diabetes Mellitus tipo 1 (DM1) é considerada uma das 80 doenças em que apresenta como principal fator de risco a autoimunidade. A doença ocorre como consequência de uma destruição autoimune das células β pancreáticas, responsáveis pela produção de insulina. É classificada como uma doença crônica, degenerativa, que afeta principalmente crianças e adolescentes (Belle, 2011). Atualmente, no DM1, já foram identificados inúmeros genes participantes da resposta imune como possíveis candidatos a promover uma susceptibilidade aumentada ao desencadeamento dessas desordens (Duffy, 2007). A imunidade inata é a primeira linha de defesa do nosso organismo contra infecções e sua ativação estimula a resposta imunológica adaptativa, sendo caracterizada por ser uma resposta imediata e similar contra uma grande variedade de agentes patogênicos, não possuindo memória imunológica (Bártholo & Bártholo, 2009) Uma das vias efetoras da imunidade inata é o Sistema Complemento (SC), que desempenha o papel de eliminação dos patógenos através da fagocitose. Esse sistema pode ser ativado através de três vias: a clássica, alternativa e o caminho das lectinas; sendo este último ativado através do sítio ligante de manose (MBL) e das ficolinas (Rus, Cudrici & Niculescu, 2005). As ficolinas são proteínas plasmáticas estruturalmente semelhantes a colectinas, possuindo um domínio similar ao colágeno, mas em vez de um domínio de lectina tipo C, elas têm um domínio de reconhecimento de carboidratos do tipo fibrinogênio. Foi demonstrado que as ficolinas ligam diversas espécies de bactérias, opsonizando-as e ativando o complemento de uma maneira semelhante ao do MBL. Os ligantes moleculares das ficolinas incluem a N-acetilglicosamina e o componente ácido lipoteicoico das paredes celulares das bactérias gram-positivas (Abbas; Lichtman; Pillai, 2008). Nos seres humanos, foram identificados

três genes que codificam a ficolina: FCN1, FCN2 e FCN3, denominadas Ficolina-1 (sinônimo de M-ficolina), Ficolina-2 (sinônimo de L-ficolina) e Ficolina-3 (sinônimo de H-ficolina, HaKATA), respectivamente. Em relação a localização das ficolinas a FCN1 e a FCN2, encontram-se no cromossomo 9q34, enquanto a FCN3 é identificada no cromossomo 1 (1p36.11) (Matsushita, 2012). Os genes da Ficolina 1 (FCN1) e Ficolina 2 (FCN2) estão localizados um na frente do outro no cromossomo 9 (9q34), os mesmos apresentam algumas variações genéticas como os rs2989727, rs1071583 (FCN1) e rs17514136, rs3124954 e rs7851696 (FCN2) (Garret *et al.*, 2009). Desta forma, uma vez que alterações nos níveis séricos destas proteínas podem ser relacionadas com o gatilho genético para ativação do sistema imune acredita-se que, polimorfismos no promotor desses genes podem estar associados com a susceptibilidade ao DM1 e suas comorbidades.

MATERIAIS E MÉTODOS

Grupo de estudo e casuística

O grupo de estudo é formado por 250 pacientes com DM1 atendidos por demanda espontânea no serviço de referência em endocrinologia do Hospital da Clínicas (HC) da Universidade Federal de Pernambuco. O diagnóstico do DM1 foi realizado de acordo com os critérios da ADA (American Diabetes Association), mundialmente utilizados. O grupo controle é formado por 170 indivíduos saudáveis sem histórico familiar de doenças autoimunes. O DNA dos dois grupos foi previamente extraído a partir de sangue periférico anti-coagulado com EDTA usando o KIT wizard DNA purification (PROMEGA).

Genotipagem

As genotipagens serão feitas através das sondas “TaqMan®” da Applied Biosystems.

Métodos Estatísticos

As frequências alélicas e genotípicas, bem como a conformidade ao Equilíbrio de Hardy-Weinberg serão calculados com o programa SNPfastest. Outros softwares de análise de resultados também serão utilizados, tais como SNPstats.

RESULTADOS

As frequências alélicas e genotípicas dos polimorfismos no gene *FCN1* (rs2989727 e rs1071583) encontram-se no equilíbrio de Hardy-Weinberg em ambos os grupos estudados, DM1 e CT. As frequências encontradas nos SNPs do gene da *FCN2* também se encontram no equilíbrio de Hardy-Weinberg, com exceção do rs7851696 (+6424 variante G>T) localizado no éxon 8 em ambos os grupos. Nenhuma diferença estatisticamente significativa correlacionando os polimorfismos com o grupo de pacientes diabéticos e o grupo controle foi encontrada (p-value >0.05) em todos os modelos.

Apenas o rs1071583 no *FCN1* foi associado com a idade-de-diagnóstico do DM1 (p-value: 0.016; AIC 1095; dif: -2.20; 95%CI: -3.99 a -0.419; Tabela 2). Essa associação correlaciona o genótipo T/T com uma idade de diagnóstico mais precoce, ou seja, um maior risco de susceptibilidade para o desenvolvimento do DM1, quando comparado com aos genótipos C/C e C/T. Os pacientes com o genótipo T/T podem desenvolver o DM1 até 2 anos mais cedo do que os outros pacientes.

	rs1071583	N	me	se	dif	lower	up	p-value	AIC
Codominante	C/C	91	7.86	0.42	0.002	-	-		
	C/T	81	7.52	0.48	-0.34	-1.549	0.87	0.05	1097
	T/T	22	5.45	0.63	-2.37	-4.25	-0.49		
Dominante	C/C	91	7.86	0.42	0.00	-	-	0.19	1100

	C/T - T/T	103	7.09	0.41	-0.77	-1.92	0.37		
Recessivo	C/C - C/T	172	7.70	0.32	0.00	-	-	0.02	1095
	T/T	22	5.49	0.63	-2.21	-3.98	-0.42		
Sobredominante	C/C - T/T	113	7.40	0.37	0.00	-	-	0.84	1101
	C/T	81	7.52	0.48	0.12	-1.41	1.29		
Log - aditivo	0.1.2	-	-	-	-0.91	-1.75	-0.06	0.04	1097

Tabela 1. Associação entre a idade de diagnóstico no diabetes mellitus tipo 1 e o polimorfismo (rs1071583) no gene FCN1

DISCUSSÃO

O DM1 é uma doença autoimune multifatorial, causada por um ou mais fatores ambientais que interagem diretamente com o perfil genético de cada indivíduo. Na verdade, o desenvolvimento do DM1 já foi correlacionado com os fatores ambientais, e entre esses, vírus e toxinas de bactérias já foram descritos como desempenhando importantes papéis no desenvolvimento da doença (Hansen *et al.*, 2004). Neste contexto de “gatilhos” infecciosos no DM1, sabe-se que as ficolinas podem ativar o caminho das lectinas do sistema complemento, após se ligarem a diversos ligantes microbianos como por exemplo, a manose (Ohta *et al.*, 1990), ácido lipoprotéico (Lynch *et al.*, 2004), GlcNAc (Matsushita *et al.*, 1996), lipopolissacarídeos (Zhao *et al.*, 2002). Com isso, a redução/deficiência dos níveis séricos e no interstício da ficolina-1/2 em crianças e adolescentes pode ser um fator de risco para o desenvolvimento do DM1. O conhecimento da relação entre a ficolina e doenças autoimunes continua escasso, foi encontrado apenas um relato descrito na literatura de um estudo de associação com doenças autoimunes. Cruyssen, *et al.* (2007) descreveram a associação entre os polimorfismos rs2989727 e rs1071583 na *FCN1* com o desenvolvimento da artrite reumatoide. Ambos os SNPs foram incluídos neste estudo, entretanto, nenhuma associação com o DM1 foi encontrada. A lectina ligante de manose (MBL) e as proteínas ficolinas podem compartilhar a mesma função molecular, onde ambas desempenham um papel similar como proteínas sinônimas, a ausência de uma proteína pode ser suprida com presença da outra. Com isso, nós hipotetizamos que indivíduos que apresentam níveis baixos de FCN1 ou FCN2 podem apresentar níveis, normais, ou até mesmo, altos do MBL, criando assim um balanço na ativação do sistema complemento e na resolução do processo de apoptose. Apesar destas características similares entre o MBL e as ficolinas, a ficolina-1 é a única a ser liberada pelos leucócitos que infiltram o interstício durante a inflamação, com isso, nós acreditamos que a ausência da ficolina-1 no microambiente do processo inflamatório ocasionado no pâncreas, não pode ser balanceado pela presença do MBL. Um resultado que chama a atenção é crianças que possuem o genótipo T/T (rs1071583 na *FCN1*) apresentam uma idade de diagnóstico mais precoce quando comparadas com os genótipos C/C e C/T, no modelo recessivo. O rs 1071583 é um polimorfismo sinônimo encontrado no éxon 9, que modifica os códons de CAA para CAG, tendo como característica a produção de uma menor quantidade de ficolina-1. Esses achados sugerem que a *FCN1* não está correlacionando com a “gatilho” para o desenvolvimento do DM1, mas pode estar envolvida com as condições crônicas da autoimunidade no DM1.

CONCLUSÕES

Este foi o primeiro estudo de associação genética entre o papel da *FCN1* e *FCN2* no Nordeste Brasileiro e o DM1, em crianças e adolescentes portadores da doença. Apesar de não ter sido encontrada nenhuma associação estatisticamente significativa entre os SNPs estudados e o desenvolvimento do DM1 nesses pacientes, o SNP rs1071583 foi correlacionado com uma idade de diagnóstico precoce. Em adição, o SNP combinado

rs2989727 e o rs1071583 foi envolvido com uma menor susceptibilidade ao DM1. Estamos cientes das limitações do nosso estudo, com isso, réplicas genéticas e estudos imunológicos funcionais precisam ser realizados com a finalidade de aumentar o conhecimento sobre os genes *FCN* e o desenvolvimento do DM1.

AGRADECIMENTOS

Ao CNPq/Propesq pelo auxílio financeiro para a realização deste estudo, a divisão de endocrinologia do Hospital das Clínicas de Pernambuco em cujas dependências foram obtidas as amostras, ao Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami por ceder suas instalações para a realização dos experimentos, ao meu orientador Lucas André Cavalcanti Brandão.

REFERÊNCIAS

- Abbas, Abul K., Andrew HH Lichtman, and Shiv Pillai. *Basic immunology: functions and disorders of the immune system*. Elsevier Health Sciences, 2012.
- Bluestone, Jeffrey A., Kevan Herold, and George Eisenbarth. "Genetics, pathogenesis and clinical interventions in type [thinsp] 1 diabetes." *Nature* 464.7293 (2010): 1293-1300.
- Vander Cruyssen, B. E. R. T., et al. "Polymorphisms in the ficolin 1 gene (FCN1) are associated with susceptibility to the development of rheumatoid arthritis." *Rheumatology* 46.12 (2007): 1792-1795.
- Garred, Peter, et al. "The genetics of ficolins." *Journal of innate immunity* 2.1 (2009): 3-16.
- Hansen, Troels K., et al. "Association between mannose-binding lectin and vascular complications in Type 1 diabetes." *Scandinavian Journal Of Immunology* 59.6 (2004): 613-613.
- Lynch, Nicholas J., et al. "L-ficolin specifically binds to lipoteichoic acid, a cell wall constituent of Gram-positive bacteria, and activates the lectin pathway of complement." *The Journal of Immunology* 172.2 (2004): 1198-1202.
- Matsushita, Misao, et al. "A novel human serum lectin with collagen-and fibrinogen-like domains that functions as an opsonin." *Journal of Biological Chemistry* 271.5 (1996): 2448-2454.
- Matsushita, Misao. "Ficolins in complement activation." *Molecular immunology* 55.1 (2013): 22-26.
- Ohta, Masayuki, et al. "The mechanism of carbohydrate-mediated complement activation by the serum mannan-binding protein." *Journal of Biological Chemistry* 265.4 (1990): 1980-1984.
- Van Belle, Tom L., Ken T. Coppieters, and Matthias G. Von Herrath. "Type 1 diabetes: etiology, immunology, and therapeutic strategies." *Physiological reviews* 91.1 (2011): 79-118.
- Zhao, Lijuan, et al. "LPS-induced platelet response and rapid shock in mice: contribution of O-antigen region of LPS and involvement of the lectin pathway of the complement system." *Blood* 100.9 (2002): 3233-3239.