



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**ESTUDO DOS GENES DO COMPLEXO DO ANTÍGENO LEUCOCITÁRIO
HUMANO (HLA) ASSOCIADOS À SUSCEPTIBILIDADE AO DIABETES
MELLITUS TIPO 1**

HEGLAYNE PEREIRA VITAL DA SILVA

NATAL
2013

HEGLAYNE PEREIRA VITAL DA SILVA

**ESTUDO DOS GENES DO COMPLEXO DO ANTÍGENO LEUCOCITÁRIO
HUMANO (HLA) ASSOCIADOS À SUSCEPTIBILIDADE AO DIABETES
MELLITUS TIPO 1**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas (PPgCF) da Universidade Federal do Rio Grande do Norte como requisito para a obtenção do título de mestre em Ciências Farmacêuticas, na área de concentração Bioanálises.

ORIENTADORA: PROFA. DRA. ADRIANA AUGUSTO DE REZENDE

NATAL

2013

Catálogo da Publicação na Fonte
Universidade Federal do Rio Grande do Norte - UFRN

Silva, Heglaine Pereira Vital da.

Estudo dos genes do complexo do antígeno leucocitário humano hla associados à susceptibilidade ao diabetes mellitus tipo 1 / Heglaine Pereira Vital da Silva. - Natal, 2013.

82f: il.

Orientadora: Profa. Dra. Adriana Augusto de Rezende.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas (PPgCF) da Universidade Federal do Rio Grande do Norte como requisito para a obtenção do título de mestre.

1. Diabetes mellitus tipo 1 - dissertação. 2. Antígeno leucocitário humano - dissertação. 3. HLA-DR e DQ - dissertação. 4. Susceptibilidade genética - dissertação. I. Título

RN/UF/BSA01

CDU 616.379-008.64

AGRADECIMENTOS

À Deus por simplesmente tudo;

Aos meus pais José e Odete por me ensinarem o valor da educação;

Aos meus irmãos Hésojy e Hévllys pelo carinho e incentivo;

Ao meu namorado, Felipe, pelo incentivo, paciência e companheirismo;

À professora Adriana Augusto de Rezende pela orientação e convivência;

Ao professor Eduardo Donadi e a Neifi Deghaide pelo auxílio na genotipagem do HLA;

À Maria Leila Cardoso por possibilitar o acompanhamento da rotina de genotipagem do HLA
no Hemonorte Natal;

Ao professor Celso Teixeira pelo auxílio nas análises estatísticas;

A professora Janaína Crispim pelo intermédio do envio das amostras;

Às professoras Paula Machado e Débora Cornélio pelas sugestões na banca de qualificação;

Aos professores Mário Hirata, Rosário Hirata e Dulcinéia Abdalla, que possibilitaram a
aprovação do Projeto Casadinho como grupo consolidado, viabilizando financeiramente a
realização deste trabalho;

Ao professor Ricardo Fernandes Arrais e sua equipe, pela sua valorosa colaboração, através
do ambulatório de Endocrinologia do HOSPED;

À toda equipe de enfermagem do HOSPED, principalmente Riva, Jane, Marilda e Telma, que
muito nos ajudaram nas coletas;

Aos diretores e coordenadores das escolas públicas, principalmente à Maria do Socorro e
Tânia Gurgel, foram realizadas as coletas dos indivíduos normoglicêmicos;

Aos alunos de pós-graduação e iniciação científica do LABMULT/LABIOMOL,

Às companheiras de projeto, Karla, Yonara, Marcela, Melina e Thamara;

Aos funcionários do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, e do
Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da UFRN;

Ao CNPq pelo financiamento do projeto;

À CAPES pela bolsa concedida.

"O homem, como um ser histórico, inserido num permanente movimento de procura, faz e refaz o seu saber."

(Paulo Freire)

RESUMO

De todos os genes já relacionados com o desenvolvimento do Diabetes mellitus tipo 1 (DM1), a maior contribuição vem da região do genoma onde estão localizados os genes do Antígeno Leucocitário Humano (HLA), sobretudo os genes da classe II do HLA: DR e DQ. Específicas combinações de alelos DRB1, DQA1 e DQB1 formando haplótipos, e ainda, a combinação de mais de um haplótipo, formando genótipos multilocus são associados com a susceptibilidade, neutralidade e proteção ao DM1. Dessa forma, o objetivo do estudo foi verificar a associação dos polimorfismos dos genes do complexo HLA classe II com a susceptibilidade ao DM1, em pacientes do Rio Grande do Norte. Foram estudados 92 indivíduos com DM1 e 100 indivíduos normoglicêmicos (NG), com idade entre 6 e 20 anos. O DNA genômico foi obtido a partir do sangue total periférico, coletado em tubo com EDTA, utilizando o kit de extração *Illustra Triple Prep*®, GE Healthcare. Para a tipagem do HLA foi utilizado o sistema DNA *LABType* através de kits *One Lambda*, que aplica a tecnologia Luminex® ao método de tipagem por PCR-SSO reverso. Os alelos DRB1*03:01, *04:05, *04:01, *04:02; DQA1*03:01g, 05:01g; DQB1*02:01g, *03:02; os haplótipos DRB1*03:01-DQA1*05:01-DQB1*02:01, DRB1*04:05-DQA1*03:01g-DQB1*03:02, DRB1*04:02-DQA1*03:01g-DQB1*03:02, DRB1*04:01-DQA1*03:01g-DQB1*03:02 e o genótipo heterozigoto, DR3-DQ2/DR4-DQ8 foram significativamente associados com a chance de desenvolvimento do DM1. Já os alelos DRB1*11:01, *15:03, *15:01, *13:01; DQA1*01:02, *04:01g, *01:03; DQB1*06:02, *03:01g, *06:03, *04:02; os haplótipos DRB1*11:01-DQA1*05:01-DQB1*03:01, DRB1*13:01-DQA1*01:03-DQB1*06:03 e o genótipo DRX-DQX/DRX-DQX, formado por outros haplótipos que não DR3-DQ2 ou DR4-DQ8, foram significativamente associados a proteção ao DM1. Apesar da grande miscigenação racial brasileira, até em nível regional, estes resultados são semelhantes a maioria dos alelos, haplótipos e genótipos de HLA classe II relacionados à susceptibilidade ou proteção ao DM1, extensivamente descritos na literatura para a população caucasiana. Crianças com idade ao diagnóstico inferior a 5 anos de idade apresentaram significativamente maior frequência do genótipo heterozigoto DR3-DQ2/DR4-DQ8, quando comparada às crianças com idade ao diagnóstico superior a 5 anos de idade. Esses resultados demonstram também forte envolvimento do perfil genético da classe II do HLA para esta faixa etária, que estaria relacionada possivelmente com a gravidade e a rápida progressão para o início do DM1. O conhecimento dos genes HLA de classe II pode ser útil em triagens genéticas que possibilitem a predição do DM1.

Palavras-chaves: Diabetes mellitus tipo 1. Antígeno Leucocitário Humano. HLA-DR e DQ. Susceptibilidade genética.

ABSTRACT

Of all of the genes associated with the development of Diabetes mellitus type 1 (T1D), the largest contribution comes from the genes in the Human Leukocyte Antigen (HLA) region, mostly the class II DR e DQ genes. Specific combinations of alleles DRB1, DQA1 and DQB1 constituting haplotypes, and further, a combination of more than one haplotype, providing multilocus genotypes are associated with susceptibility, protection and neutrality to DM1. Thus, the aim of present study was to verified the association of polymorphisms of HLA genes class II with susceptibility to type 1 diabetes mellitus (T1D). Ninety-two patients with T1D and 100 individuals normoglycemics (NG) aged between 6 and 20 years were studied. Genomic DNA was obtained from peripheral whole blood, collected in EDTA tube, using the extraction kit Illustra Triple Prep®, GE Healthcare. For HLA typing was used DNA LABType system by One Lambda kit applying Luminex® technology to the method of PCR-SSO typing reverse. The alleles DRB1*03:01, *04:05, *04:01, *04:02, DQA1*03:01g, *05:01g, DQB1*02:01g, *03:02, the haplotypes DRB1*03:01-DQA1*05:01-DQB1*02:01, DRB1*04:05-DQA1*03:01g-DQB1*03:02, DRB1*04:02-DQA1*03:01g-DQB1*03:02, DRB1*04:01-DQA1*03:01g-DQB1*03:02 and DR3-DQ2/DR4-DQ8 genotype were significantly associated with the chance of developing T1D. The alleles DRB1*11:01, *15:03, *15:01, *13:01, DQA1*01:02, *04:01g, *01:03, DQB1*06:02, *03:01g, *06:03, *04:02, the haplotypes DRB1*11:01-DQA1*05:01-DQB1*03:01, DRB1*13:01-DQA1*01:03-DQB1*06:03 and DRX-DQX/DRX-DQX genotype, formed by other than the DR3-DQ2 or DR4-DQ8 haplotypes, were significantly associated with T1D protection. Despite the major racial Brazilian, even at the regional level, these results are similar to the majority of alleles, genotypes and haplotypes of HLA class II-related susceptibility or resistance to T1D, extensively described in the literature for Caucasian population. Children with age at diagnosis less than 5 years of age had significantly higher frequency of the heterozygous genotype DR3-DQ2/DR4-DQ8 compared to children with age at diagnosis than 5 years old. These results also demonstrate strong association of the genetic profile of the class II HLA for this age group, possibly associated with the severity and rapid progression to the onset of T1D. The knowledge of HLA class II genes may be useful in genetic screens that allow the prediction of T1D.

Keywords: Type 1 diabetes. Human Leukocyte Antigen. HLA-DR and DQ. Genetic susceptibility.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 -	Principais genes estatisticamente associados com a susceptibilidade ao DM1, desde os anos de 1970 a 2009 e suas respectivas forças de associação (Odds Ratio) (POCIOT et al., 2011).....	16
FIGURA 2 -	Representação esquemática da localização de genes da região do HLA no cromossomo 6 e composição estrutural das moléculas de superfície codificadas pelos genes HLA classe I e II.....	17
FIGURA 3 -	Conceito proposto para a associação do genótipo heterozigoto de alta susceptibilidade do HLA-DQ2/8 ou DR3-DQ2/DR4-DQ8 e o desenvolvimento do DM1.....	21
FIGURA 4 -	Interação fenda de ligação do HLA e peptídeos.....	22
FIGURA 5 -	Perfil recidivo-remitente da patogênese do DM1.....	24
FIGURA 6 -	Distribuição dos indivíduos normoglicêmicos e diabéticos de acordo com sua classe-econômica.....	36
FIGURA 7 -	Distribuição dos indivíduos normoglicêmicos e diabéticos de acordo com sua naturalidade.....	37

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 -	Polimorfismos presentes nos loci clássicos do HLA.....	18
TABELA 2 -	Principais haplótipos relacionados com a susceptibilidade e proteção ao DM1, em populações caucasianas.....	20
TABELA 3 -	Programa de PCR LABtype® SSO.....	31
TABELA 4 -	Nomenclatura dos alelos HLA-DQB1 e -DQA1 baseadas nos polimorfismos do éxon 2.....	32
TABELA 5 -	Tabela de contingência 2x2 para análises de associação dos alelos do HLA.....	34
TABELA 6 -	Características clínicas dos grupos estudados.....	35
TABELA 7 -	Parâmetros de controle glicêmico de acordo com os grupos de estudo	37
TABELA 8 -	Comparação das frequências dos alelos de HLA-DRB1 entre pacientes com DM1 e o grupo NG.....	41
TABELA 9 -	Comparação das frequências dos alelos de HLA-DQA1 entre pacientes com DM1 e o grupo NG.....	42
TABELA 10 -	Comparação das frequências dos alelos de HLA-DQB1 entre pacientes com DM1 e o grupo NG.....	42
TABELA 11 -	Comparação das frequências haplotípicas de HLA-DRB1-DQA1-DQB1 entre pacientes com DM1 e o grupo NG.....	46
TABELA 12 -	Abreviação dos haplótipos de susceptibilidade em relação ao seu grupo sorológico.....	50
TABELA 13 -	Genótipos de susceptibilidade em crianças e adolescentes com DM1 e no grupo NG.....	50
TABELA 14 -	Comparação das frequências genótípicas de HLA-DRB1-DQB1 com a idade ao diagnóstico das crianças e adolescentes com DM1.....	54
TABELA 15 -	Comparação de alelos e haplótipos de HLA associados à proteção ao DM1 com a idade ao diagnóstico.....	56

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAI. Anti-insulina

ABEP. Associação de Empresas de Pesquisas

ADA. Associação Americana de Diabetes (*American Diabetes Association*)

CDC. Centros para prevenção e controle de doenças (*Centers for Disease Control and Prevention*)

CNS. Conselho Nacional de Saúde

DCCT. Ensaio sobre controle e complicações do Diabetes (*Diabetes Control and Complications Trial*)

DL. Desequilíbrio de Ligação

DM. Diabetes Mellitus

DM1. Diabetes Mellitus tipo 1

DNA. Ácido desoxirribonucleico (*Deoxyribonucleic Acid*)

EDTA. Ácido Etilenodiamino Tetraacético

EHW. Equilíbrio de Hardy-Weinberg

GAD. Descarboxilase do Ácido Glutâmico (*Glutamic Acid Decarboxylase*)

GWAs. Estudos de associação Humana (*Genome Wide Association Studies*)

HLA. Antígeno Leucocitário Humano (*Human Leukocyte Antigen*)

HOSPED. Hospital de Pediatria Professor Eriberto Bezerra

HPLC. Cromatografia líquida de alto desempenho (*High-performance Liquid Chromatography*)

HUOL. Hospital Universitário Onofre Lopes

Hsp 70. Pproteína do choque térmico –

IA2. Anti-Tirosina Fosfatase (*Anti-Tyrosine Phosphatase*)

ICA. Anti-ilhota

IDF. Federação Internacional de Diabetes (*International Diabetes Federation*)

IGRP. Subunidade catalítica da proteína ilhota específica glicose 6-fosfato (*islet-specific glucose-6- phosphatase catalytic subunit-related protein*)

IL-1 β . Interleucina 1 beta

IL-2. Interleucina 2

IL-4. Interleucina 4

IL-6. Interleucina 6

IL-17. Interleucina 17

INF- γ . Interferon gama

MDI. Múltiplas Doses de Insulina

MHC. Complexo Principal de Histocompatibilidade (*Major Histocompatibility Complex*)

NK. *Natural Killer*

NPH. Protamina Neutra Hagedorn

OR. Razão de Chances (*Odds Ratio*)

ROS. Espécies reativas de oxigênio (*Reactive Oxygen Species*)

PBMCs. Células mononucleares do sangue periférico (*Peripheral Blood Mononuclear Cells*)

PBS. Tampão salina-fosfato (*Phosphate Buffered Saline*)

PCR. Reação da Polimerase em cadeia (*Polymerase Chain Reaction*)

SAPE. Estreptavidina conjugada a R-Ficoeritrina (*Streptavidin, R-Phycoerythrin Conjugate*)

SBD. Sociedade Brasileira de Diabetes

TBE. Tris Borato EDTA

T CD4+. Linfócito T CD4+

T CD8+. Linfócito T CD8+

TGF- β 1. Fator de crescimento tumoral beta 1

Th1. Células T Auxiliares do tipo 1

Th17. Células T Auxiliares do tipo 17

Th2. Células T Auxiliares do tipo 2

TNF- α . Fator de necrose tumoral alfa

ZNT8. Transportador de Zinco 8 (*Zinc Transporter*).

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
1.1 DIABETES MELLITUS (DM)	11
1.2 DIABETES MELLITUS TIPO 1 (DM1).....	12
1.3 O ANTÍGENO LEUCOCITÁRIO HUMANO (HLA) E DIABETES MELLITUS TIPO 1 (DM1).....	16
2 OBJETIVOS	26
2.1 OBJETIVO GERAL.....	26
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	26
3 MATERIAL E MÉTODOS	27
3.1 TIPO DE ESTUDO.....	27
3.2 ASPECTOS ÉTICOS E FINANCIAMENTO.....	27
3.3 CASUÍSTICA.....	27
3.3.1 Grupo Diabético (DM1)	27
3.3.2 Grupo Normoglicêmico (NG)	28
3.4 AMOSTRAS BIOLÓGICAS.....	29
3.5 DETERMINAÇÃO DE PARÂMETROS LABORATORIAIS.....	25
3.6 EXTRAÇÃO DO DNA GENÔMICO.....	29
3.7 GENOTIPAGEM DOS GENES DA CLASSE II DO HLA	30
3.8 ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	31
3.8.1 Análise estatística do HLA	31
3.8.1.1 Frequências alélicas.....	31
3.8.1.2 Análise do equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW).....	32
3.8.1.3 Desequilíbrio de Ligação (DL).....	33
3.8.1.4 Análise de haplótipos.....	33
3.8.1.5 Análise da associação entre o DM1 e polimorfismos do HLA.....	34
3.8.2 Análises estatísticas gerais	34
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
4.1 CARACTERIZAÇÃO DA POPULAÇÃO DE ESTUDO.....	35
4.2 AVALIAÇÃO DO CONTROLE GLICÊMICO.....	37
4.3 ASSOCIAÇÃO DE POLIMORFISMOS DO HLA COM A SUSCEPTIBILIDADE	40

AO DM1.....	
4.3.1 Frequências alélicas do HLA-DRB1, HLA-DQA1 e DQB1 em crianças e adolescentes com DM1, comparadas às do grupo NG.....	40
4.3.2 Frequências haplotípicas do HLA-DRB1, HLA-DQA1 e HLA-DQB1 em crianças e adolescentes com DM1 comparadas às do grupo NG.....	45
4.3.3 Frequências dos genótipos classe II do HLA em crianças e adolescentes com DM1, comparadas às do grupo NG.....	49
4.3.4 Associação das frequências genótípicas classe II do HLA com idade ao diagnóstico.....	53
5 CONCLUSÕES	60
REFERÊNCIAS	61
APÊNDICE A – Termo de consentimento livre e esclarecido.....	73
APÊNDICE B – Ficha para coleta de dados individuais.....	75
ANEXO 1 - Parecer consubstanciado final da avaliação do projeto pelo Comitê de Ética em Pesquisa do HUOL/UFRN.....	77
ANEXO 2 - Parecer consubstanciado da Comissão de Ética em Pesquisa do HOSPED..	78
ANEXO 3 - Parecer consubstanciado da Comissão de Ética em Pesquisa do HOSPED..	79
ANEXO 4 - Critério de classificação econômica Brasil.....	80

1 INTRODUÇÃO

1.1 DIABETES MELLITUS (DM)

O Diabetes Mellitus (DM) tem sido considerado uma das grandes epidemias mundiais do século 21, e um importante problema de saúde pública, face aos índices de morbidade e mortalidade relacionados à doença, bem como aos custos envolvidos no seu controle e no tratamento de suas complicações (NEVILLE; SIDAWY, 2012).

A Federação Internacional de Diabetes (*International Diabetes Federation – IDF*, 2011), que desde o ano de 2000 produz estimativas sobre a prevalência do DM em mais de 216 países e/ou territórios de todo o mundo, estimou que em 2011, existiam 366 milhões de adultos diabéticos no mundo, com uma projeção desse número alcançar 552 milhões no ano de 2030. A maioria dos indivíduos com DM vive em países em desenvolvimento onde a epidemia tem maior intensidade, com crescente proporção de pessoas afetadas em grupos etários mais jovens. Ainda segundo a IDF, as maiores prevalências estão localizadas em países do Oriente Médio, norte da África, América do Norte, Caribe e países banhados pelo Oceano Pacífico ocidental (Malásia, Filipinas, China, Japão, entre outros) (WHITING et al, 2011).

Nos Estados Unidos, a prevalência do DM em indivíduos com mais de 20 anos de idade, de 1999 à 2004, foi estimada em 7,8%, sendo maior na população feminina e nos indivíduos com idade entre 40 e 59 anos (ONG et al., 2008). Em estudo recente realizado pelo Centro de Controle e Prevenção de Doenças (*Centers for Disease Control and Prevention - CDC*, 2011), verificou-se a existência de 8 milhões de indivíduos com DM nos Estados Unidos, com uma prevalência de 8,3%, que aumenta para 26,9% para a faixa etária acima de 65 anos (CDC, 2011).

No Brasil, dados recentes da pesquisa Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico (VIGITEL, 2011) mostram que a prevalência do DM está crescendo. Em homens, o percentual subiu de 4,4%, em 2006, para 5,2%, em 2011. Apesar do aumento, a prevalência de homens que informam ter a doença continua sendo inferior a das mulheres (6%). O levantamento, que coletou dados nas 26 capitais e no Distrito Federal, revelou que 5,6% dos entrevistados (6.399.187 pessoas) declararam ter a doença. A capital com maior percentual de diabéticos foi Fortaleza (7,3%), seguido por Vitória (7,1%) e Porto Alegre (6,3%). Em Natal, 5,8% dos entrevistados declararam ter a doença, percentual

este próximo aos das capitais com os maiores percentuais. Os menores índices estão em Palmas (2,7%), Goiânia (4,1%) e Manaus (4,2%) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011).

A crescente prevalência do DM, tanto no Brasil como em todo mundo, está associada a fatores como envelhecimento da população, a urbanização crescente e a adoção de estilo de vida pouco saudável como sedentarismo, dieta inadequada e obesidade, além do aumento da sobrevida dos pacientes com DM (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011; SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2009).

De acordo com a Associação Americana de Diabetes (*American Diabetes Association* - ADA), o DM é definido como um grupo de desordens metabólicas caracterizada por hiperglicemia crônica resultante de defeitos na secreção e/ou ação da insulina. O DM é classificado em quatro categorias clínicas: o DM tipo 1 (DM1), usualmente associado com autoimunidade e deficiência absoluta de insulina. O DM tipo 2 (DM2), associado à deficiência progressiva na secreção de insulina e a obesidade. O diabetes gestacional, designado quando incide durante o período da gravidez. E outros tipos específicos de diabetes, resultantes de defeitos genéticos nas células beta pancreáticas, no gene da insulina e também devido à doenças do pâncreas exócrino (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2013).

1.2 DIABETES MELLITUS TIPO 1 (DM1)

O diabetes tipo 1 (DM1) representa 5 a 10% dos casos de diabetes, sendo uma das doenças crônicas mais comuns em crianças e adolescentes (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2013), e acometendo de 10 a 20 milhões de pessoas em todo o mundo (BIROS; JORDAN; BAXTER, 2005). A tendência estimada para o aumento anual do DM1, em todo o mundo, tem variado em torno de 2,5 a 3%, desde 1970 (SAVAGE et al., 2010). A previsão, alarmante, é que a incidência na Europa dobrará em crianças com idade inferior a cinco anos até 2020, (EURODIAB *Study Group*, 2009).

O projeto Diamond (*Diabetes Mondiale*), criado pela Organização Mundial da Saúde, em 1990, para abordar as implicações do DM1 na saúde pública por meio do estudo da incidência do DM1 em crianças, apontou, em um primeiro relatório, no ano 2000, um total de 43.013 casos de DM1 diagnosticados em uma população de 84 milhões de crianças de 0 e 14

anos de idade, em 57 países. Encontrando uma variação na incidência de mais de 100 vezes em todo mundo, com a menor incidência (0,1/100.000 habitantes, por ano) observada em populações da China e América do Sul (Venezuela e Peru) e a maior incidência (40,9/100.000 habitantes, por ano) relatada, principalmente, na Sardenha-Itália e Finlândia, assim como, Escócia, Suécia, Noruega, Portugal, Reino Unido, Canadá e Nova Zelândia (DIAMOND *Project Group*, 2006).

Em relação ao Brasil, o número de informações sobre a incidência do DM1 é escasso e comumente direcionado a uma cidade ou região específica. Em São Paulo, Ferreira et al. (1993), estudando 4 cidades do estado, encontraram uma incidência de 7,6/100.000 habitantes, no ano de 1993. Em São Paulo, também, Negrato et al. (2010) estudando a cidade de Bauru, entre os anos de 1986 e 2006, encontraram uma incidência geral de 10,4 casos de DM1/100.000 habitantes, variando de 2,82/100.000 habitantes em 1987 a 18,49/100.000 habitantes em 2002, representando, assim, um aumento de 6,56 vezes na incidência do DM1 nesta população. Outro estudo em Londrina-PR (CAMPOS et al., 1998) relatou 12,7/100.00 habitantes. Já uma incidência de 12/100.000 habitantes/ano foi encontrada em Passo Fundo - RS (LISBOA et al., 1998).

A incidência do DM1 também varia por faixa etária. Em geral, a taxa de incidência aumenta a partir do nascimento e apresenta picos entre as idades de 10 e 14 anos, durante a puberdade. Após a puberdade, a incidência apresenta um declínio e parece estabilizar na idade adulta jovem (15-29 anos) (DABELEA et al., 2007; DIAMOND *Project Group*, 2006; EURODIAB ACE *Study Group*, 2000).

Divergências na incidência do DM1, em relação ao sexo, têm sido reportadas por alguns estudos. Um estudo de coorte, realizado durante um período de 25 anos na Finlândia, demonstrou que o DM1 que se inicia na infância (0-15 anos de idade) é geralmente caracterizado pela relação 1:1 para o sexo feminino e masculino (HARJUTSALO; SJÖBERG; TUOMILEHTO, 2008). Já o estudo em larga escala EURODIAB, que analisou a incidência durante 15 anos em países da Europa, revelou que ocorre uma maior predominância para sexo feminino, quando a incidência situa-se entre 5 e 9 anos de idade, já quando a faixa etária aumenta para 10 a 14 anos há uma predominância do sexo masculino, principalmente em países da Europa com uma alta incidência (EURODIAB ACE *Study Group*, 2000)

O DM1 é uma doença autoimune em que as células β pancreáticas produtoras de insulina são seletivamente destruídas pelo sistema imune, resultando em uma completa dependência de insulina exógena (REGNÉLL; LERNMARK, 2012). O processo destrutivo é insidioso e pode evoluir durante vários anos, com a expressão evidente de sintomas clínicos

aparecendo, somente, quando cerca de 80% das células beta pancreáticas já foram destruídas (SKYLER, 2010).

Os sintomas clínicos característicos do DM1 são: poliúria (glicosúria e diurese osmótica), polidipsia (desidratação pela diurese osmótica), polifagia e emagrecimento (estado catabólico), podendo ou não evoluir para um quadro de cetoacidose (descompensação metabólica máxima). Esses sintomas são decorrentes da hiperglicemia subjacente, resultado da não produção da insulina (SHAHID et al., 2012).

A presença de sinais e sintomas clínicos característicos associada à glicemia plasmática casual ≥ 200 mg/dl, ou glicemia plasmática de jejum ≥ 126 mg/dl, ou, ainda, a fração A1C da hemoglobina glicada $\geq 6,5\%$, (pela metodologia de Cromatografia Líquida de Alto Desempenho, *High-performance Liquid Chromatography - HPLC*), são os critérios adotados para o diagnóstico do DM1. Marcadores de autoimunidade, como os autoanticorpos anti-insulina (AAI), anti-ilhota (ICA), anti-descarboxilase do ácido glutâmico (GAD) e anti-tirosina-fosfatase (IA2) também podem ser detectados no plasma. A dosagem do peptídeo C, um peptídeo derivado da clivagem da pró-insulina e secretado em quantidades equimolares à insulina na circulação pode ser utilizada para avaliação da secreção de insulina endógena. (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2013; SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2009).

A etiologia do DM1 envolve fatores genéticos e ambientais que atuam conjuntamente em favor do desenvolvimento da doença e o resultado do processo patológico é dependente desses múltiplos fatores inter-relacionados (BENDING; ZACCONE; COOKE, 2012).

A contribuição de fatores ambientais para a etiologia do DM1 tem sido considerada desde o final dos anos 1800, quando uma epidemia de caxumba em uma pequena aldeia da Noruega foi associada a um surto de diabetes na infância (YOON, 1990). E, adicionalmente, pela constatação da não concordância de 100% para desenvolvimento do DM1, entre gêmeos monozigóticos (HYTTINEN et al, 2003). A partir daí, buscou-se a relação de numerosos agentes virais e bacterianos, produtos alimentares, fatores antropométricos, neuronais e hormonais, bem como a combinação entre eles, para o desenvolvimento da autoimunidade e o aparecimento clínico do DM1 (TEDDY *Study Group*, 2011; REGNÉLL; LERNMARK, 2012).

Os principais vírus associados à etiologia são os enterovírus e os rotavírus, os quais possivelmente apresentariam um tropismo pancreático e conduziriam a uma lise direta ou imunomediada das células beta pancreáticas (COPPIETERS; BOETTLER; HERRATH, 2012) ou ainda, poderiam infectar o timo alterando o processo de seleção tímica de linfócitos

T (JAIDANE et al., 2012). Já entre as bactérias destacam-se estudos envolvendo a flora bacteriana intestinal, postulando-se a hipótese higiênica para esta associação, em que os padrões modernos de higiene reduziram a exposição a microrganismos, diminuindo a imunidade protetora, levando ao aumento nas respostas autoimunes e alérgicas (FORLENZA; REWERS, 2011; OKADA et al., 2010).

E entre os produtos alimentares, destacam-se os provenientes da alimentação durante a gestação, período neonatal e infância, associando-se a diminuição da amamentação no peito, a introdução precoce de leite da vaca (VIRTANEN et al., 2012), a introdução de alimentos derivados da proteína de trigo (especificamente o glúten) (HUMMEL et al., 2002) e a deficiência de vitaminas A e D na alimentação (ZIPITIS; AKOBENG, 2008), como sendo fatores ambientais precipitantes do DM1, embora a literatura exiba resultados conflitantes.

Em relação aos fatores genéticos, o DM1 possui uma herança poligênica e complexa. Com o advento dos estudos de associação humana (*Genome-Wide Association studies - GWAs*), aliada aos avanços tecnológicos de genotipagem e ao conhecimento do genoma humano, foi possível a realização de análises estatisticamente robustas e sistemáticas que permitiram identificar mais de 50 genes relacionados com o desenvolvimento do DM1 (POCIOT et al., 2010). Esses genes estão envolvidos, basicamente, em 3 categorias gerais de atuação: função imune (engloba a grande maioria dos genes), expressão da insulina e função da célula beta pancreática (NOBLE; ERLICH, 2012).

De todos os mais de 50 genes já relacionados com o desenvolvimento do DM1, a mais forte contribuição genética vem da região do genoma onde estão localizados os genes do Complexo Principal de Histocompatibilidade (do inglês, *Major Histocompatibility Complex*, ou MHC), situado no cromossomo 6p21. O MHC é a região mais importante no genoma dos vertebrados no que diz respeito à infecção e autoimunidade. No homem, ele é chamado de Antígeno Leucocitário Humano (do inglês, *Human Leukocyte Antigen* ou HLA), devido a sua descoberta ter sido feita por meio de diferenças entre leucócitos de diferentes indivíduos, em estudos de tolerância a enxertos de tecidos (NOBLE; VALDES, 2011).

Os demais genes associados à susceptibilidade ao DM1 podem ser agrupados em genes não-HLA, mas localizados na região do HLA, e genes não-HLA localizados fora da região do HLA. Entre os genes não-HLA, localizados na região do HLA, destacam-se o *TNFA* e genes codificadores das proteínas do complemento C4A e C4B. Já entre os genes não-HLA localizados fora da região do HLA, desde 1970, diversos genes tem sido significativamente associados com o DM1 (POCIOT et al., 2010). Alguns desses genes e suas forças de associação são destacados na figura 1.

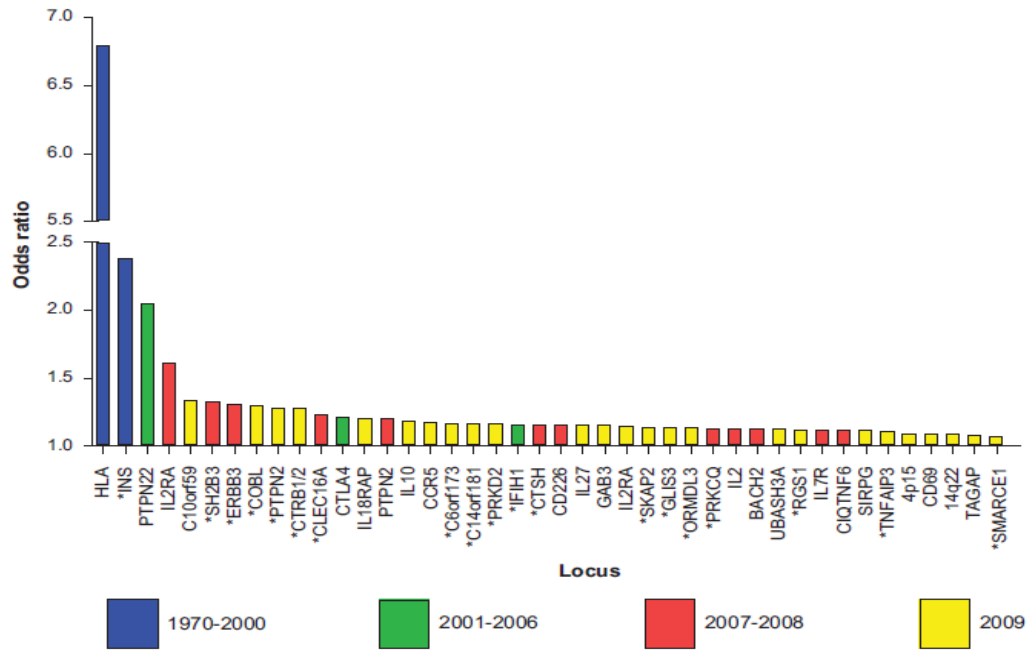


FIGURA 1 – Principais genes estatisticamente associados com a susceptibilidade ao DM1, desde os anos de 1970 a 2009 e suas respectivas forças de associação (Odds Ratio) (POCIOT et al., 2010).

1.3 O ANTÍGENO LEUCOCITÁRIO HUMANO (HLA) E DIABETES MELLITUS TIPO (DM1)

O HLA constitui um conjunto de aproximadamente 200 genes que se localizam no braço curto do cromossomo 6, estendendo-se por uma região do DNA com mais de 4.000 kilobases. Seus genes encontram-se fisicamente agrupados dentro de três regiões distintas, denominadas classe I, II e III (FIGURA 2) (NOBLE; VALDES, 2011). Os genes da classe I (porção mais telomérica) codificam as moléculas clássicas HLA-A, HLA-B e HLA-C, envolvidas com a resposta imune e por moléculas não-clássicas HLA-E, HLA-F, HLA-G, encontradas em tecidos fetais e relacionados com a tolerância materno-fetal. A classe I, ainda contém um grupo de pseudogenes, os quais não codificam proteínas funcionais (ALVES et al., 2007).

Os genes da classe II (localizada próxima ao centrômero) codificam as moléculas clássicas HLA-DP, DQ e DR, envolvidas com a resposta imune e as moléculas não-clássicas DM e DO relacionadas com a biossíntese das moléculas clássicas da classe II (GUCE et al., 2013).

Os genes de classe III, embora localizados entre genes de classe I e II, não codificam moléculas clássicas de HLA, mas sim outras moléculas de relevância imunológica (TNFs, complemento C4 e C2 e proteína do choque térmico – Hsp 70) (NOBLE; ERLICH, 2012). Uma representação esquemática da região HLA, incluindo os genes relacionados à etiologia do DM1 é mostrada na Figura 2A.

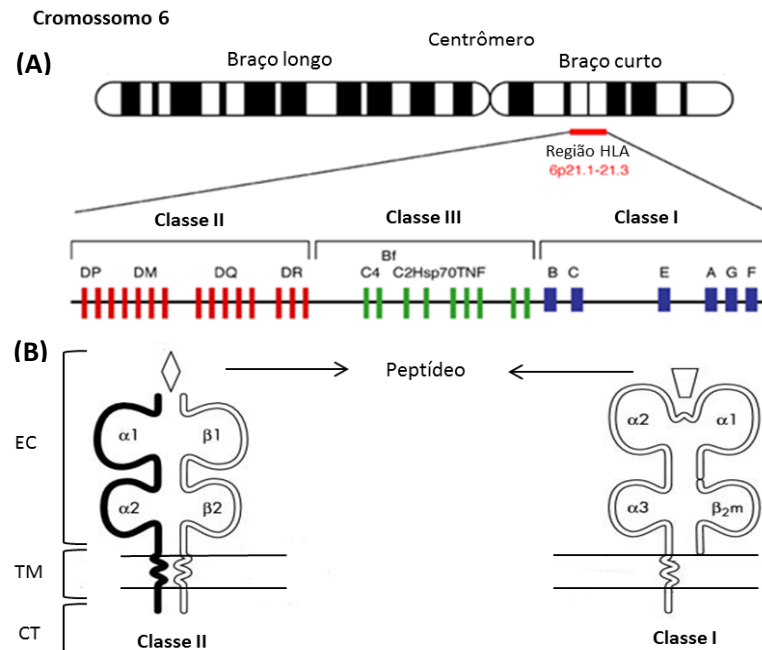


FIGURA 2 – (A) Representação esquemática da localização de genes da região do HLA no cromossomo 6. (B) Composição estrutural das moléculas de superfície codificadas pelos genes HLA classe I e II. A ligação do peptídeo à fenda de ligação é formada pelos domínios $\alpha 1$ e $\beta 1$ na classe II e domínios $\alpha 1$ e $\alpha 2$ na classe I. (Fonte: Adaptado de KELLY et al., 2003 e MEHRA; KAUR et al, 2003).

As moléculas de superfície codificadas pelos genes HLA classe I e II são estruturalmente distintas, mas homólogas. Elas são heterodímeros constituídos por 2 cadeias polipeptídicas ligadas de forma não covalente, que se estendem entre porções membranares, citoplasmáticas e extracelulares, dando origem a uma fenda, ou sulco extracelular onde ocorre a ligação de peptídeos antigênicos que serão, em seguida, apresentados aos linfócitos T CD4+ e T CD8+. Os linfócitos T CD4+ e T CD8+ são células do sistema imune responsáveis pela manutenção da tolerância ao próprio e pela indução e regulação de respostas imunes adaptativas a patógenos (BEGOVICH et al., 2001). Eles possuem receptores específicos em sua superfície que reconhecem o complexo formado pelo peptídeo ligado à molécula de HLA. (EISENBARTH, 2010).

As moléculas da classe I são formadas por uma cadeia α contendo três domínios ($\alpha 1$, $\alpha 2$ e $\alpha 3$) e uma subunidade não codificada pelo HLA, chamada de $\beta 2$ -microglobulina

(FIGURA 2B). São expressas na superfície de quase todas as células nucleadas do organismo, bem como nas plaquetas. Sua principal função é apresentar em sua superfície antígenos de origem endógena aos linfócitos T CD8+ citotóxicos. Já as moléculas de classe II são formadas por 2 cadeias designadas como α e β (FIGURA 2B), e são expressas nas superfícies de células endoteliais no timo e em células apresentadoras de antígenos (linfócitos B, macrófagos, células dendríticas e algumas células endoteliais) (JONES et al, 2006).

O HLA é considerado a região mais polimórfica observada no genoma humano (CAMPBELL; TROWSDALE, 1993), isto é, apresenta uma grande variabilidade em sua sequência de bases no DNA com frequência superior a 1% na população (SCHAFER; HAWKINS, 1998). Grande parte dos polimorfismos está localizada nas regiões codificadoras dos domínios responsáveis pela formação da fenda de ligação (domínios $\alpha 1$ e $\beta 1$, na classe II e domínios $\alpha 1$ e $\alpha 2$, na classe I). Até janeiro de 2013, 8.794 variantes (alelos) tinham sido relatadas pelo banco de dados de HLA do Instituto de Bioinformática Europeu (EMBL-EBI/IMGT-HLA). Os HLA clássicos são mostrados na tabela 1.

TABELA 1 - Polimorfismos presentes nos loci clássicos do HLA

Locus	Número de alelos
A	2132
B	2798
C	1672
DRA	7
DRB	1297
DRB1	1196
DRB2	1
DRB3	58
DRB4	15
DRB5	20
DRB6	3
DRB7	2
DRB8	1
DRB9	1
DQA1	49
DQB1	179
DPA1	36
DPB1	158
Total	9625

Fonte: <http://www.ebi.ac.uk/ipd/imgt/hla/stats.html>

Dado o grande número de polimorfismos, a manutenção de uma nomenclatura consistente dos alelos do HLA tem sido um desafio. Sucintamente, o sistema de nomenclatura inclui o nome do locus, adicionado dos nomes das cadeias α ou β , identificados com as letras A ou B respectivamente, e seguido por um asterisco e uma designação numérica para o alelo,

com no mínimo 4 dígitos (ex. DRB1*04:01). Para a maioria dos loci, os 2 primeiros dígitos referem-se a especificidade sorológica de um alelo particular (ex. DRB1*04:01 reage com o anti-soro DR4). O terceiro e o quarto dígitos, que são separados dos 2 primeiros pelo sinal de dois-pontos, representam os subtipos dentro da mesma linhagem, sendo os números dados de acordo com a ordem de descoberta. Alelos que apresentam diferenças nos 4 primeiros dígitos apresentam uma ou mais substituições nucleotídicas não-sinônimas (diferindo por aminoácidos). Quinto e sexto dígitos são utilizados para designar substituições nucleotídicas sinônimas (MARSH et al., 2010).

Os polimorfismos presentes na classe II do HLA, principalmente no HLA-DQ e HLA-DR, são reconhecidamente os maiores determinantes genéticos na etiologia do DM1 (TODD, 2010). Um mapeamento fino de 8Mb do HLA, realizados por um GWA confirmou que a maior susceptibilidade ou resistência ao DM1, de fato reside sobre a classe II do HLA (HOWSON et al, 2009; NEJENTSEV et al., 2007). Sendo que para o HLA-DR, a cadeia α é essencialmente monomórfica e todos os polimorfismos derivam dos domínios β 1 ou DRB1. Já no HLA-DQ, ambas os domínios α 1 (DQA1) e β 1 (DQB1) exibem polimorfismos (TOLLEFSEN et al, 2012).

Outra importante característica do HLA é a existência de desequilíbrios de ligação (DL) entre os genes, isto é, a ocorrência de algumas combinações de alelos, de localizações adjacentes (loci) no mesmo cromossomo, mais ou menos frequente do que seria esperado a partir de uma formação aleatória de alelos com base em suas frequências. A combinação de alelos de um ou mais loci no mesmo cromossomo constitui um haplótipo (THE INTERNATIONAL HAPMAP CONSORTIUM, 2003).

No HLA, a taxa de recombinação de alelos, com algumas exceções, é muito pequena, o que resulta em uma transmissibilidade em bloco de uma geração para outra, promovendo a formação de haplótipos com características ancestrais, ou recombinações destes, o que implica em grandes regiões do cromossomo extremamente conservadas e passíveis de serem utilizadas como marcadores eficientes no estudo da predisposição dos genes HLA para doenças complexas (BLOMHOFF et al., 2006).

Para o DM1, específicas combinações de alelos DRB1, DQA1 e DQB1 tem determinado a formação de haplótipos relacionados com a susceptibilidade, neutralidade e proteção. Inúmeros haplótipos já foram identificados e uma hierarquia estatisticamente significativa da susceptibilidade ao DM1 tem sido estabelecida (ERLICH et al., 2008; NOBLE; VALDES, 2011). Os haplótipos mais relacionados com a susceptibilidade e proteção, em populações caucasianas, são apresentados na tabela 2.

TABELA 2 - Principais haplótipos relacionados com a susceptibilidade e proteção ao DM1, em populações caucasianas

Relação	Haplótipos
Susceptibilidade	DRB1*03:01-DQA1*05:01-DQB1*02:01
	DRB1*04:01-DQA1*03:01-DQB1*03:02
	DRB1*04:02-DQA1*03:01-DQB1*03:02
	DRB1*04:04-DQA1*03:01-DQB1*03:02
	DRB1*04:05-DQA1*03:01-DQB1*03:02
Proteção	DRB1*08:01-DQB1*04:01-DQB1*04:02
	DRB1*07:01-DQA1*02:01-DQB1*03:03
	DRB1*14:01-DQA1*01:01-DQB1*05:03
	DRB1*15:01-DQA1*01:02-DQB1*06:02

Fonte: Adaptado de ERLICH et al., 2008.

Vem-se evidenciando, ainda, que os riscos genéticos associados ao HLA não são simplesmente a soma ou produto de um único haplótipo, mas sim, resultado de um efeito sinérgico proporcionado pela combinação de mais de um haplótipo de susceptibilidade, particularmente a combinação de dois haplótipos diferentes constituindo o genótipo multilocus heterozigoto (cromossomo materno e paterno). Postula-se que os genótipos heterozigotos se organizam em estruturas de transdímeros, formados pela união da cadeia α do HLA-DQA1*05:01 (HLA-DQ2) e a cadeia β do HLA-DQB1*03:02 (HLA-DQ8), ou pela cadeia α do HLA-DQA1*03:01 (HLA-DQ8) e a cadeia β do HLA-DQB1*02:01 (HLA-DQ2). A presença desses transdímeros promoveria a apresentação de uma diversidade de autoantígenos e a indução de um repertório mais amplo de células T CD4+ autoreativas, responsáveis por desencadear respostas imunes que conduzem à destruição das células beta-pancreáticas (FIGURA 3) (VAN LUMMEL et al., 2012).

HLA-DQ8trans e a susceptibilidade ao DM1

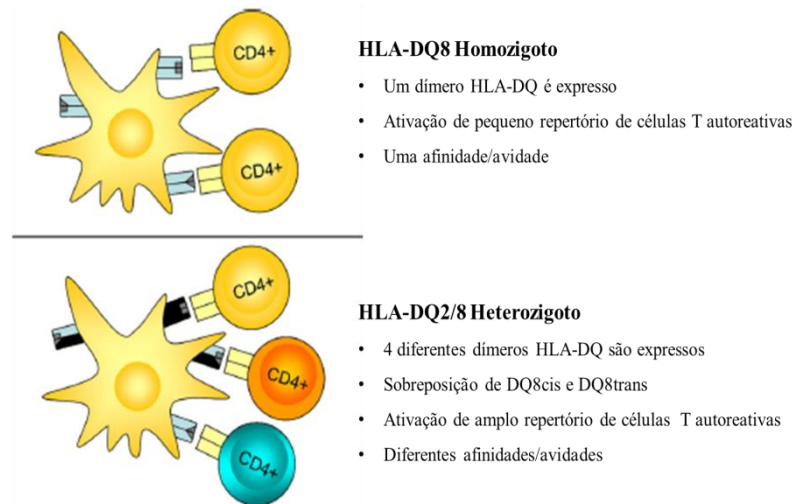


FIGURA 3 – Conceito proposto para a associação do genótipo heterozigoto de alta susceptibilidade do HLA-DQ2/8 ou DR3-DQ2/DR4-DQ8 e o desenvolvimento do DM1 (Fonte: Adaptado de VAN LUMMEL et al., 2012).

A análise da estrutura cristalina do HLA, em especial, das áreas da fenda na molécula do HLA onde ocorre a interação com o peptídeo antigênico, ou regiões âncoras de peptídeos (pois suas interações estabilizam a ligação do complexo peptídeo-HLA), enumeradas de P1 a P9, demonstram que moléculas HLA-DQ β codificadas pelos alelos DQB1*03:02 e DQB1*02:01, presentes nos genótipos heterozigotos DQ2/8 ou DR3-DQ2/DR4-DQ8, contêm o aminoácido alanina na posição 57, enquanto as codificadas pelos alelos DRB1*01:01, DQB1*03:01 e DQB1*06:02 – não associados à doença ou protetores – contêm ácido aspártico. Quando DQ β é Ala-57, a bolsa P9 tem carga positiva devido à ausência de um resíduo carregado negativamente, podendo ligar longas cadeias laterais de peptídeos antigênicos. Já as cadeias DQ β Asp-57, por serem carregadas negativamente, interagem com o resíduo de arginina (carregado positivamente) da cadeia DQ α através de uma ponte de sal, tornando a bolsa P9 eletrostaticamente neutra (FIGURA 4) (JONES et al., 2006).

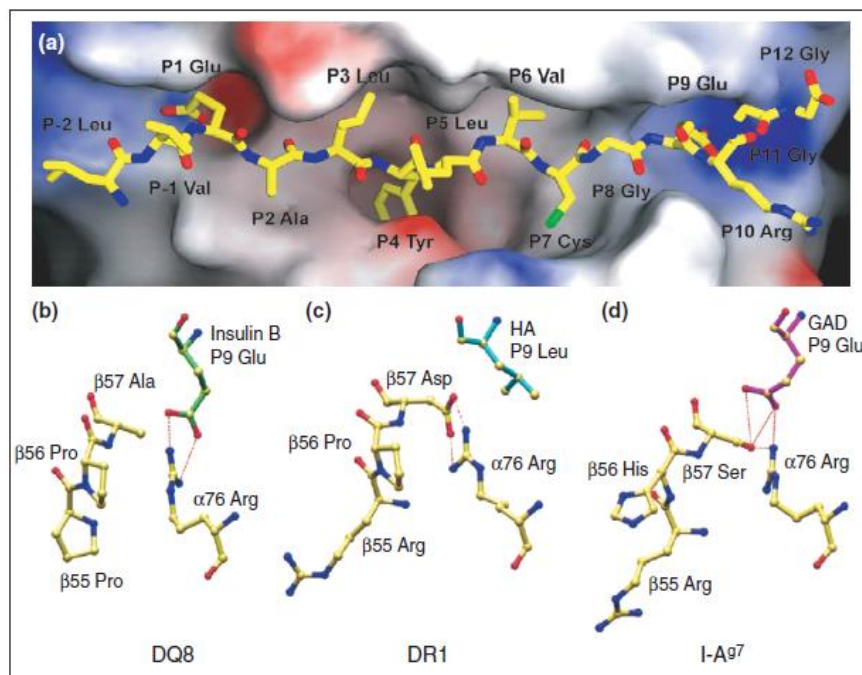


FIGURA 4 - Interação fenda de ligação do HLA e peptídeos. (a) Estrutura cristalina da cadeia α do complexo HLA-DQ 8 (DQA1*0301-DQB1*0302) ligada ao peptídeo da insulina humana. (b) Estrutura da bolsa P9 de indivíduos que apresentam o alelo DQB1*0302 (associado à doença), mostrando um resíduo de alanina na posição $\beta 57$. (c) Estrutura da bolsa P9 de indivíduos que apresentam o alelo DRB1*0101 (não associado à doença), mostrando a ponte de sal formada entre o resíduo de ácido aspártico na posição $\beta 57$ e a arginina da posição $\alpha 76$. (d) Molécula de HLA de classe II expressa em camundongos NOD ligadas ao peptídeo GAD (ácido glutâmico descaboxilase) através de pontes entre o resíduo de serina e $\beta 57$ e arginina $\alpha 76$. (Fonte: Adaptado de LEE; WUCHERPFENNIG; WILEY, 2001)

Dos diversos autoantígenos ilhotas-específicos existentes: insulina ou proinsulina, ácido glutâmico descaboxilase (GAD), proteína tipo tirosina-fosfatase (AI2), subunidade catalítica da proteína ilhota específica glicose 6-fosfato (IGRP), transportador de zinco (ZnT8), a insulina/proinsulina tem sido descrita como um fator chave no processo autoimune do DM1 em humanos e modelos animais (MOHAN; PETZOLD; UNANUE, 2011). Importantes regiões da insulina (epítomos) têm sido caracterizadas nos humanos e relacionadas à ativação de células T autoreativas, principalmente considerando os mecanismos centrais de tolerância (KENT et al., 2005).

No timo, principal órgão da tolerância central, os antígenos periféricos, como a insulina, são ectopicamente produzidos por um subconjunto de células epiteliais tímicas, com a finalidade de conferir autotolerância imunológica no início da vida, por meio da seleção negativa de linfócitos T que reconhecem os autoantígenos em alta afinidade. Quando essa expressão tímica de autoantígenos falha ocorre um escape de linfócitos T autoreativos para periferia, devido a ausência de seleção negativa e/ou falha na seleção positiva de linfócitos T regulatórios (CULINA; BREZAR; MALLONE, 2013).

Além da tolerância central, estudos demonstram que falhas na tolerância periférica, a qual é responsável pela a inativação funcional (anergia), a supressão imune por linfócitos T reguladores e a deleção (morte celular induzida por ativação) dos linfócitos T maduros que reconhecem autoantígenos na periferia, estão também relacionadas com a autoimunidade do DM1. Os linfócitos T autoreativos, provenientes do escape da tolerância central no timo, ao migrarem para os linfonodos pancreáticos são apresentados pelas moléculas de HLA das células dendríticas, a um amplo repertório de autoantígenos, que devido a falhas na tolerância periférica (causadas por mecanismos de mimetismo molecular, disseminação de epítopos, ativação de células próximas, deficiência da função ou do número de linfócitos T reguladores, principalmente relacionados a infecções virais) (LEHUEN et al., 2010), promovem a ativação e expansão clonal desses linfócitos T autoreativos, que subsequente migram para as ilhotas pancreáticas e medeiam a destruição da célula beta pancreática (JEKER; BOUR-JORDAN; BLUESTONE, 2012).

Uma vez dentro das ilhotas pancreáticas, os linfócitos T autoreativos CD4+ ativados podem dar origem a diferentes subconjuntos de linfócitos T efetores, sendo Th1, Th2 e Th17, os mais bem caracterizados. Eles são responsáveis pelo estímulo na produção de citocinas pró-inflamatórias como INF- γ , IL-2, TNF- α , IL-1 β , IL-17, IL-4 e outras, as quais, em especial o INF- γ (Th1), estimulam a apresentação de autoantígenos pelo HLA de classe I, ativando, por sua vez, linfócitos T autoreativos CD8+. Estes linfócitos promovem a destruição das células betas pancreáticas via citólise, pela liberação de perforinas e granzimas e, adicionalmente, pela indução da apoptose celular (FIGURA 5) (VAN BELLE; COPPIETER; HERRATH, 2011). Espécies reativas de oxigênio (ROS) produzidas por macrófagos e células *Natural Killer* (NK) também estão envolvidas no processo destrutivo da célula da beta pancreática (BENDING; ZACCONE; COOKE, 2012).

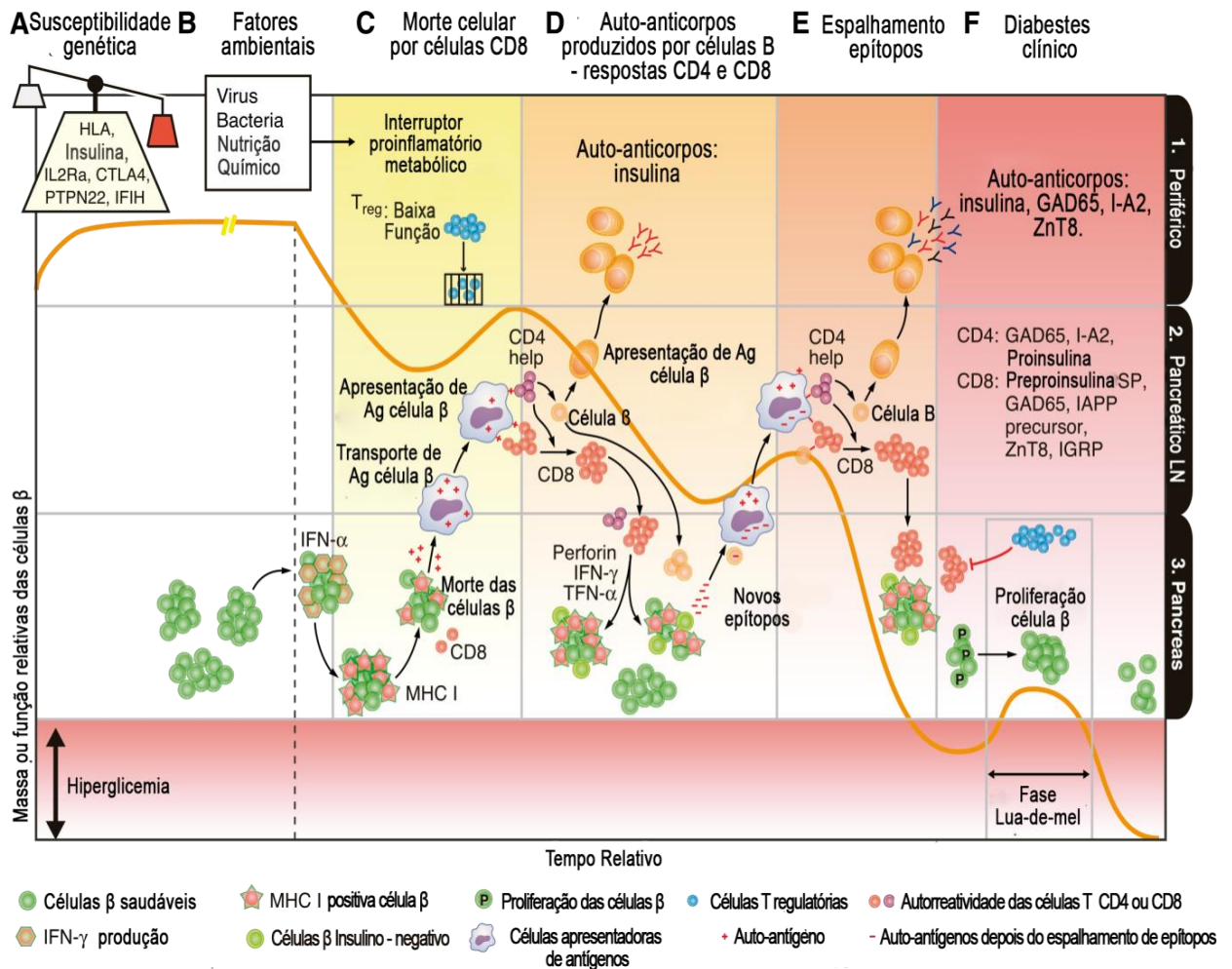


FIGURA 5 – Perfil recidivo-remittente da patogênese do DM1. Linha laranja: representação da massa celular beta pancreática em função do tempo. Colunas em ordem alfabética (A-F) no topo: demonstram as fases imunológicas envolvidas. Separadores numéricos à direita (1-3): indicam os locais anatômicos. (Fonte: Adaptado de VAN BELLE; COPPIETER; HERRATH *et al.*, 2011).

Os linfócitos TCD4+ efetores também estimulam a diferenciação de linfócitos B em plasmócitos, que são responsáveis pela produção de autoanticorpos contra os autoantígenos, e atuam auxiliando no processo de destruição da célula beta pancreática. A detecção destes anticorpos na periferia representa o principal sinal clínico de uma resposta autoimune em curso (CNOP *et al.*, 2005; FERNANDES *et al.*, 2005; GORODEZKY *et al.*, 2006; WILLCOX *et al.*, 2009).

A progressiva infiltração de células do sistema imune nas ilhotas pancreáticas, processo denominado de insulite, pode também estimular a proliferação das células beta pancreáticas. Além disso, a atividade de linfócitos T regulatórios pode, temporariamente, se sobrepôr à resposta T efetora. A alternância entre períodos de resposta autoimune destrutiva e períodos de proliferação da massa beta celular caracteriza o perfil contínuo recidivo-remittente

do período que antecede a instalação do DM1. Mas, ao final, as respostas autoimunes destrutivas tornam-se o principal processo atuante e o DM1, então se instala. Nesse momento, apenas 10-30% das células beta pancreáticas permanecem funcionais, o que resulta na não produção eficiente de insulina, levando ao quadro de hiperglicemia crônica característica do DM1 (FIGURA 5) (VAN BELLE; COPPIETER; HERRATH, 2011).

Considerando a forte contribuição genética dos genes do HLA na susceptibilidade ao DM1, e que alterações genéticas específicas, principalmente nos genes HLA de classe II DR e DQ, estão relacionadas a um aumento na chance de desenvolver o DM1 em crianças e adolescentes, o estudo teve como objetivo principal verificar a associação de polimorfismos nos genes do complexo HLA classe II com a susceptibilidade ao DM1 em crianças e adolescentes atendidos no Hospital de Pediatria Prof. Heriberto Bezerra de Natal-RN.

Este estudo contribuirá com dados importantes para o estado e região nordeste do Brasil, uma vez que não há relatos na literatura científica relacionando os polimorfismos no gene do HLA com o diabetes em pacientes do Rio Grande do Norte. O conhecimento dos genes HLA de classe II poderá ser útil em triagens genéticas que possibilitem a predição do DM1, e ainda, no desenvolvimento de estratégias terapêuticas que visem silenciar o ataque diabetogênico nos estágios iniciais de destruição das células beta pancreáticas, promovendo um tratamento mais eficaz do DM1, bem como, na prevenção da exposição a gatilhos ambientes nos indivíduos com marcadores genéticos de risco identificados.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Estudar a associação dos genes do complexo HLA classe II com susceptibilidade ao DM1.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar o grupo de crianças e adolescentes com DM1 quanto à idade ao diagnóstico e tempo de diagnóstico;
- Analisar a distribuição de crianças e adolescentes com DM1 e dos indivíduos normoglicêmicos quanto à classificação socioeconômica e naturalidade;
- Avaliar parâmetros do controle glicêmico de crianças e adolescentes com DM1, comparando-os com indivíduos normoglicêmicos;
- Identificar alelos, haplótipos e genótipos da classe II do HLA em uma amostra da população norterriograndense de crianças e adolescentes com DM1 e indivíduos normoglicêmicos;
- Determinar as frequências alélicas, haplotípicas e genotípicas dos genes HLA de classe II, DR e DQ, em crianças e adolescentes com DM1 e compará-las com as frequências observadas no grupo normoglicêmico;
- Avaliar o grau de associação destes alelos, haplótipos e genótipos da classe II do HLA com a chance de desenvolvimento do DM1;
- Associar a idade ao diagnóstico de crianças e adolescentes com DM1 com os haplótipos dos genes HLA de classe II, DR e DQ.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 TIPO DE ESTUDO

Estudo caso-controle, não-pareado, visando comparar os genes do HLA classe II em crianças e adolescentes com DM1 e normoglicêmicos (NG). Todos os indivíduos foram convidados a participar do estudo de forma aleatória.

3.2 ASPECTOS ÉTICOS E FINANCIAMENTO

O presente projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Onofre Lopes (HUOL/UFRN), obedecendo às diretrizes regulamentadas da pesquisa envolvendo seres humanos, que constam na Resolução do Conselho Nacional de Saúde (CNS) nº 196/96. A pesquisa foi aprovada sob o parecer consubstanciado de número 307/2009 (ANEXO 1).

Para que fosse possível a realização desse estudo dentro da estrutura do Hospital de Pediatria Prof. Heriberto Bezerra da UFRN (HOSPED), o estudo foi avaliado e aprovado pela direção do Hospital e pela Comissão de Pesquisa sendo cadastrado sob os pareceres consubstanciados de números 55/2009 e 09/2012 (ANEXOS 2 e 3).

Os indivíduos selecionados e seus responsáveis foram informados sobre o protocolo de estudo, e somente participaram aqueles que assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Apêndice A).

O presente trabalho recebeu financiamento através do Edital CNPq 16/2008 Casadinho, Processo 620099/2008-9, o qual recebeu prorrogação até 2011.

3.3 CASUÍSTICA

3.3.1 Grupo Diabético (DM1)

Foram estudados 92 pacientes diabéticos de ambos os sexos, com idade entre 6 e 20 anos, atendidos no Ambulatório de Endocrinologia do Hospital de Pediatria Prof. Heriberto Ferreira Bezerra (HOSPED)/CCS/Universidade Federal do Rio Grande do Norte. A grande

maioria dos pacientes era natural da região metropolitana do Rio Grande do Norte, a qual abrange Natal e cidades ao entorno (FIGURA 7). Os pacientes foram triados pelo Dr. Ricardo Fernando Arrais, médico responsável pelo Ambulatório e colaborador do presente projeto, de acordo com os critérios de inclusão e exclusão, abaixo discriminados:

Critérios de Inclusão:

- Indivíduos, de ambos os sexos, com idade entre 6 a 20 anos;
- Diagnóstico clínico de DM1.

Critérios de Exclusão:

- Etilistas;
- Fumantes;
- Grávidas;
- Portadores de desordens ósseas congênitas e/ou hereditárias;
- Indivíduos que apresentaram doença inflamatória ou infecções;
- Que não colaboraram devidamente com os pesquisadores.

Todos os pacientes responderam aos questionamentos da ficha de cadastro dos pacientes (Apêndice B), onde se investigou dados da história familiar em relação aos antecedentes patológicos e hábitos saudáveis de vida.

3.3.2 Grupo Normoglicêmico (NG)

Foram selecionados 100 indivíduos normoglicêmicos com idade entre 6 e 20 anos como grupo controle. Estes indivíduos foram aleatoriamente selecionados em escolas da rede pública de ensino da cidade de Natal/RN. Todos os indivíduos normoglicêmicos também foram submetidos a uma triagem pelos pesquisadores, sendo a glicemia de jejum ≤ 99 mg/dL e hemoglobina glicada $\geq 5,7\%$, os parâmetros de inclusão destes indivíduos (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2013). Foram excluídos no decorrer do estudo indivíduos que não obdeceram os critérios de exclusão acima mencionados para o grupo DM1. Todos indivíduos do grupo NG também responderam aos questionamentos da ficha de cadastro dos pacientes (Apêndice B).

3.4 AMOSTRAS BIOLÓGICAS

Foram coletados 15mL de sangue, após jejum de no mínimo 12 horas, de todos os participantes para a realização da extração de DNA genômico e para a determinação de parâmetros bioquímicos do perfil glicêmico (glicemia de jejum e hemoglobina glicada). O sangue foi fracionado em 2 alíquotas, sendo uma coletada sem anticoagulante (determinação da glicose sérica), e a outra coletada em um tubo contendo EDTA (extração de DNA genômico e hemoglobina glicada).

3.5 DETERMINAÇÃO DE PARÂMETROS LABORATORIAIS

As concentrações séricas dos parâmetros bioquímicos do perfil glicêmico foram determinadas utilizando kits LABTEST, (Lagoa Santa, Brasil) de acordo com a metodologia descrita pelos fabricantes. As leituras foram efetuadas no LABMAX PLENNO (Labtest, Lagoa Santa, Minas Gerais, Brasil) no Laboratório de Análises Toxicológicas e Clínicas – LIATEC / Natal / RN.

3.6 EXTRAÇÃO DO DNA GENÔMICO

O DNA genômico foi obtido a partir de células mononucleares de sangue periférico, previamente isoladas por gradiente descontínuo de Ficoll-Hipaque (Sigma-Aldrich, MO, EUA) densidade específica de 1,070g/mL, a temperatura ambiente. Ficoll-Hipaque consiste em uma mistura de polissacarídeos de alta densidade que se dissolvem prontamente em solução aquosa, e são capazes de promover a separação de diferentes componentes celulares sanguíneos com base em suas densidades.

Em um tubo de polipropileno de 15mL foram adicionados 5mL de sangue (alíquota coletada com EDTA), que foram centrifugados por 10min a 1500rpm à temperatura ambiente. O plasma isolado foi retirado e o volume inicial do tubo foi completado com solução de tampão salina fosfato (PBS). Em um novo tubo de polipropileno de 15mL foram adicionados 2,5mL de Ficoll-Hipaque e, em seguida, foram adicionados vagarosamente sobre a fase de Ficoll, 5mL de sangue + PBS. Após uma centrifugação de 1350rpm durante 30 min, ocorreu a separação de 4 camadas, distribuídas da seguinte forma: na fase superior ficou o plasma e seus constituintes solúveis, na interface as células mononucleares, em seguida o Ficoll e no fundo do tubo sedimentaram-se os eritrócitos e granulócitos.

Depois de isolada, a camada contendo as células mononucleares sofreu uma lavagem com PBS seguida de uma centrifugação a 11000g por 1min, para possibilitar a formação do pellet de mononucleares, o qual foi destinado à extração do DNA utilizando o kit *Illustra Triple Prep*® (GE Healthcare, Little Chalfont, Buckinghamshire, Reino Unido). O princípio básico da extração por kit consiste na lise celular dos leucócitos, promovida pelo tampão de lise, seguida da exposição das moléculas de DNA e a ligação destas à membrana de sílica presente nas colunas providenciadas pelo kit. Em seguida, sucessivas lavagens, com tampões de lavagens, são realizadas para remoção de contaminantes da membrana, e ao final, ocorre a eluição do DNA da membrana, pelo tampão de eluição. Em média, são extraídos de 8-12µg de DNA genômico/milhão de células. O material obtido deve ser então, armazenado no freezer - 20°C até a sua análise.

A integridade das amostras de DNA foi avaliada por separação eletroforética em gel de agarose a 0,8% em tampão TBE pH 8,0, corado com gel Red e fotodocumentadas em sistema de captura de imagem *Gel Logic 100 Imaging System* (Carestream Health Inc., Rochester, NY, EUA) utilizando o software *Molecular Imaging* (KODAK, Rochester, NY, EUA). A quantificação de DNA foi realizada por espectrofotometria a 260nm, e a pureza do DNA determinada pela relação A_{260}/A_{280} em espectrofotômetro ND-1000 (NANODROP technologies Inc, Wilmington, DE, EUA). DNA extraído deve estar na concentração padrão de 20ng/µL e deve ter parâmetros de pureza entre 1,7-1,9, obtidos da relação A_{260}/A_{280} . (SAMBROOK; RUSSEL, 2001).

3.7 GENOTIPAGEM DOS GENES DA CLASSE II DO HLA

Para a tipagem do HLA foi utilizado o sistema de tipagem DNA LABType® através de kits One Lambda (Canoga Park, EUA), que aplica a tecnologia Luminex ao método de tipagem por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) - *Sequence-Specific Oligonucleotide* (SSO) reverso, utilizando o sistema Luminex®, modelo 100™ IS (Austin, EUA). A genotipagem do HLA foi realizada em colaboração com o Prof. Tit. Eduardo Antônio Donadi da USP/Ribeirão Preto, no Laboratório de HLA da Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto-SP.

A técnica de PCR-SSO consiste na amplificação do DNA alvo utilizando um iniciador (*primer*) biotilado, desenhado para amplificar o éxon 2 da região do HLA, o qual codifica os domínios responsáveis pela formação da fenda de ligação com o peptídeo ($\alpha 1$ para a cadeia α e $\beta 1$ para a cadeia β) (FIGURA 2B). Em uma placa de 96 poços são adicionados 1µL de DNA

e 9 µl do mix contendo dNTP's, iniciadores biotinizados e a enzima Taq Polimerase. Em seguida, a placa é levada ao termociclador e iniciam-se os ciclos de desnaturação, hibridização e extensão para a formação dos produtos de PCR biotinizados (TABELA 3).

TABELA 3 – Programa de PCR LABtype® SSO

Passos	Temperatura e tempo de incubação	Número de Ciclos
Passo 1	96 ^o C 03min	1
Passo 2	96 ^o C 20seg	5
	60 ^o C 20seg	
	72 ^o C 20seg	
Passo 3	96 ^o C 20seg	30
	60 ^o C 15seg	
	72 ^o C 20seg	
Passo 4	72 ^o C 10seg	1
Passo 5	4 ^o C Até a retirada	1

Os produtos de PCR são, então, desnaturados para permitir a hibridização de sondas complementares conjugadas com microesferas (ou *beads*), nas fitas simples de DNA biotinizadas. Cada *bead* é marcada com uma determinada fluorescência e possui uma sonda de oligonucleotídeo correspondente a um alelo HLA ou a um grupo de alelos HLA. Realiza-se, ainda, o processo de neutralização com a finalidade de inibir a reconversão em DNA fita dupla, evitando um excesso de produtos de PCR não ligados.

Ao final, adiciona-se uma solução de Estreptavidina conjugada ao fluorocromo Ficoeritrina (SAPE), que permite a detecção de produtos de PCR hibridizados com as *beads*, uma vez que a estreptavidina apresenta afinidade pela biotina presente nos produtos de PCR e promove a emissão de fluorescência pela ficoeritrina excitada. O citômetro de fluxo LABScan 100 (Analisador Luminex®) reconhece as fluorescências emitidas pela *beads* e pela Ficoeritrina ligadas às sondas. Os dados gerados pelo aparelho são transmitidos ao software HLA Fusion 2.0 para a determinação da tipagem do HLA.

3.8 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

3.8.1 Análise estatística do HLA

3.8.1.1 Frequências alélicas

A frequência alélica é a frequência de um alelo particular em uma população e pode ser estimada contando o número de vezes que cada alelo é encontrado, dividindo-se pelo número total de alelos da amostra. A determinação da frequência alélica reflete a constituição genética da população, em relação aos alelos, que são transmitidos a cada geração, uma vez que novos genótipos são formados a partir da combinação dos alelos transmitidos pelos gametas dos genitores (NEI, 1987).

Dessa forma, as frequências alélicas foram obtidas por contagem direta dos alelos através da fórmula: $X(\%) = n/2N$ (onde X = frequência relativa do alelo em porcentagem, n = frequência absoluta do alelo e N = número total de indivíduos).

Embora a maioria dos alelos da classe II sejam diferenciados entre si pela genotipagem do éxon 2, existem alelos que apresentam-se idênticos no éxon 2 mas diferem em outras regiões da sequência de DNA, como no éxon 3. Para esses casos, em especial os alelos DQB1 e DQA1, adotou-se a nomenclatura baseada somente nos polimorfismos presentes no éxon 2, conforme sugerido por Cano et al. (2007) (TABELA 4).

TABELA 4 – Nomenclatura dos alelos HLA-DQB1 e -DQA1 baseadas nos polimorfismos do éxon 2

Designação	Grupos alélicos
DQA1*01:01g	DQA1*01:01, *01:04, *01:05
DQA1*03:01g	DQA1*03:01, *03:02, *03:03
DQA1*04:01g	DQA1*04:01, *04:02, *04:03, *04:04
DQA1*05:01g	DQA1*05:01, *05:03, *05:05, *05:09
DQB1*03:01g	DQB1*03:01, *03:19
DQB1*02:01g	DQB1*02:01, *02:02

Fonte: CANO et al., 2007.

3.8.1.2 Análise do equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW)

O princípio do Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) afirma que em uma população grande, que se reproduz ao acaso, onde não há fatores perturbadores como mutação, seleção ou migração, e em que todos os indivíduos são igualmente férteis e viáveis, tanto as frequências alélicas como as frequências genotípicas se mantêm constantes de geração para geração (HARDY; WEINBERG, 1908).

Para averiguar se a população de estudo obedece a esse princípio realizou-se a análise do EHW utilizando o software ARLEQUIN (v.3.5.1.2). Este é um programa de análise estatística utilizado em genética de populações, que oferece cálculos e estimativas de vários parâmetros genéticos possibilitando seu uso em estudos intra ou interpopulacional partindo de dados genotípicos ou haplotípicos (EXCOFFIER et al., 2005). Neste software, o EHW é testado utilizando a metodologia descrita por Guo e Thompson (1992). Foram considerados desvios significativos no EHW, quando se detectou um valor de 5% de desvio em pelo menos um dos locus estudados, representado pelo $p \leq 0,05$ (AHPD *project report*, 2012).

3.8.1.3 Desequilíbrio de Ligação (DL)

O cálculo do desequilíbrio de ligação entre todos os pares de loci estudados (DRB1, DQA1 e DQB1) foi realizado pelo programa Arlequin v. 3.5.1.3. O cálculo baseia-se em uma razão de probabilidades, em que a probabilidade da não associação entre os loci (equilíbrio de ligação) é comparada com a probabilidade quando a associação entre os loci é permitida, o objetivo, é avaliar se a segregação dos alelos ocorre de maneira independente ou se há uma transmissibilidade não aleatória dos alelos, apresentando frequências diferentes daquelas esperadas quando agregação é independente (EXCOFFIER; SLATKIN, 1996). O programa utiliza o teste χ^2 para avaliar a significância do DL.

3.8.1.4 Análise de haplótipos

Os haplótipos mais prováveis e as suas frequências foram estimados aplicando o método da verossimilhança que utiliza o algoritmo EM (maximização de expectativa) que faz parte do conjunto de programas disponíveis no pacote ARLEQUIN v. 3.5.1.3. O método de máxima verossimilhança consiste em estimar frequências haplotípicas aleatórias e a partir delas computar a verossimilhança de se obter as frequências genotípicas esperadas assumindo EHW a partir das frequências haplotípicas geradas. A cada passo, a verossimilhança aumenta (EXCOFFIER; SLATKIN, 1996; SCHNEIDER et al., 2000). Para aplicação do algoritmo EM, utilizou-se os parâmetros descritos por Castelli et al. (2010). Neste trabalho foram reportados apenas os haplótipos com frequências iguais ou superiores a 1%. A partir do conhecimento dos haplótipos foi possível obtenção das frequências dos genótipos formados pela combinação dos haplótipos materno e paterno.

3.8.1.5 Análise da associação entre o DM1 e polimorfismos do HLA

Para a análise de associação entre os alelos, haplótipos e genótipos da classe II do HLA (DRB1, DQA1 e DQB1) e o DM1 relacionou-se o número de pacientes diabéticos e de normoglicêmicos, portadores de cada variante alélica em tabelas de contingência 2x2, conforme mostrado na Tabela 5. A comparação das distribuições das frequências alélicas dos grupos estudados foi realizada pelo teste exato de FISHER (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA). O uso deste teste ao invés do qui-quadrado (χ^2) foi mais aconselhado principalmente devido ao encontro de casos com uma proporção inferior a cinco em um ou mais grupos estudados.

TABELA 5 – Tabela de contingência 2x2 para análises de associação dos alelos do HLA

	n^o indivíduos com alelo X	n^o indivíduos sem alelo X	Total
População 1	a	b	a+b
População 2	c	d	c+d
	a+c	b+d	N=a+b+c+d

Nos casos em que o valor de p foi significativo ($\leq 0,05$) foi calculado o *Odds Ratio* - OR (razão de probabilidades ou chances), que permite fazer uma estimativa do Risco Relativo em estudos “caso-controle” (WOOLF, 1955). O valor da OR, em análises de associação exprime quantas vezes a característica é mais frequente entre os portadores de um determinado fator, comparando-se com indivíduos sem o fator. Valores de OR acima de 1 indicam que o fator está associado a uma maior probabilidade de se desenvolver a característica em questão, e valores abaixo de 1, a uma menor probabilidade (SVEJGAARD et al., 1974).

3.8.2 Análises estatísticas gerais

Inicialmente, foi realizado o teste de Kolmogorov-Smirnov para avaliar a normalidade da distribuição. De acordo com os resultados deste teste foram realizados os testes paramétricos (teste T) ou não-paramétricos (Mann-Whitney) para as comparações entre os grupos estudados. O programa Graphpad Prism, versão 5.0 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA) foi utilizado para tais análises.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 CARACTERIZAÇÃO DA POPULAÇÃO DE ESTUDO

Foram estudados 92 pacientes com diagnóstico clínico de DM1 e 100 indivíduos normoglicêmicos na faixa etária dos 6 aos 20 anos. A Tabela 6 mostra as características clínicas da população de estudo.

TABELA 6 - Características dos grupos estudados

	DM1	NG	p valor
N	92	100	
Gênero (M/F)	34/58	42/58	0,5549
Idade (anos)	11,8 ± 4,4	11,33 ± 4,1	0,6040
Tempo de diagnóstico	4,4 ± 3,8	----	
Idade ao diagnóstico (anos)	6,9 ± 3,3	----	

Os resultados foram expressos em média ± desvio padrão. **N** (número de indivíduos); **NG** (grupo normoglicêmico); **DM1** (grupo diabético tipo 1). Realizado teste qui-quadrado para avaliar diferenças na distribuição dos gêneros entre os grupos estudados. Para demais variáveis contínuas foi aplicado Teste T.

Os grupos normoglicêmico e diabético apresentaram-se homogêneos em relação ao gênero ($p=0,5549$) e à idade ($p=0,6040$), não havendo diferenças estatisticamente significantes.

No grupo diabético houve uma predominância de indivíduos do gênero feminino. Embora o DM1 incida igualmente nos gêneros masculino e feminino (HARJUTSALO; SJÖBERG; TUOMILEHTO, 2008), nos países com alta prevalência da doença, há uma predominância do gênero feminino quando a incidência situa-se entre 5 e 9 anos de idade (EURODIAB ACE Study Group, 2000).

A média de idade de 11,8 anos para os indivíduos diabéticos assemelha-se com a média de idade relatada em outros estudos com crianças e adolescentes com DM1 (KESKIN et al., 2012; MOSAAD et al. 2012; SHAMIR et al., 2008; URURAHY et al., 2011). No tocante à idade ao diagnóstico, a média do presente estudo foi de 6,9 anos. Resultados similares foram encontrados por Faulkner e Chang (2007) estudando indivíduos com idade

média de 13 anos e em média 5,2 anos de doença. Olsen et al. (2004) encontraram um média de idade ao diagnóstico de 6,6 anos, estudando 304 pacientes com DM1, diagnosticados antes dos 12 anos de idade. Dezsofi et al. (2008) estudando 80 indivíduos com DM1 obtiveram uma mediana de idade ao diagnóstico de 6 anos.

Em relação ao tempo de diagnóstico, observa-se que em média, os indivíduos apresentam 4,4 anos de diagnóstico do DM1. O tempo de diagnóstico é um fator de risco importante para o desenvolvimento das complicações decorrentes do diabetes. De uma maneira geral, essas complicações comumente aparecem após dez anos de doença, porém estudos mais recentes têm demonstrado que alterações patológicas ocorrem logo após o diagnóstico, e que sinais clínicos precoces dessas alterações são detectáveis após 2-5 anos de duração da doença (BOGDANOVIC, 2008; CHO et al., 2011).

A maioria dos indivíduos dos grupos estudados (aproximadamente 30% do total de todos os indivíduos) pertencia à classe socioeconômica C1, seguida pelas classes C2 e D (FIGURA 6) (Associação de Empresas de Pesquisas-Abep, 2010 – ANEXO 4), demonstrando também a homogeneidade em relação ao *status* social e especialmente o econômico. É importante lembrar a forte contribuição dos fatores socioeconômicos para o sucesso no tratamento do DM1, uma vez que estão diretamente relacionados ao acesso a uma dieta adequada, a aquisição de medicamentos e aparelhos para automonitorização (essenciais para o acompanhamento das flutuações diárias de glicose e ajustes das doses de insulina) e o acesso a um acompanhamento de uma equipe multidisciplinar em saúde, especializada em diabetes.

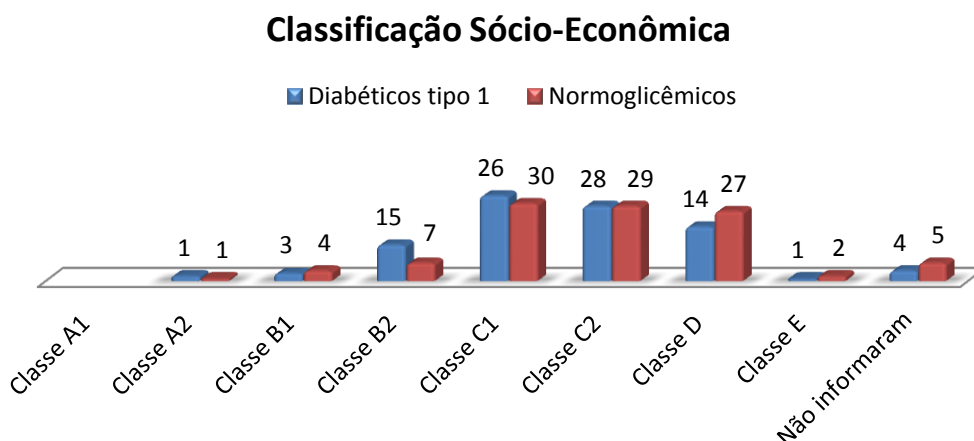


FIGURA 6- Distribuição dos indivíduos normoglicêmicos e diabéticos de acordo com sua classe socioeconômica.

Ao analisarmos a distribuição dos indivíduos estudados segundo sua naturalidade (FIGURA 7), observamos uma predominância da mesorregião Leste do Rio Grande do Norte,

aonde se encontram os municípios de Natal e região metropolitana, mostrando, também, a homogeneidade da amostra em relação ao local de origem dos pacientes. Alguns indivíduos diabéticos foram provenientes de regiões do interior do estado, o que pode ser explicado pelo fato do HOSPED ser uma unidade de referência em endocrinologia pediátrica no Rio Grande do Norte, captando a demanda de assistência especializada por parte de municípios do interior.

Distribuição dos indivíduos de acordo com sua naturalidade

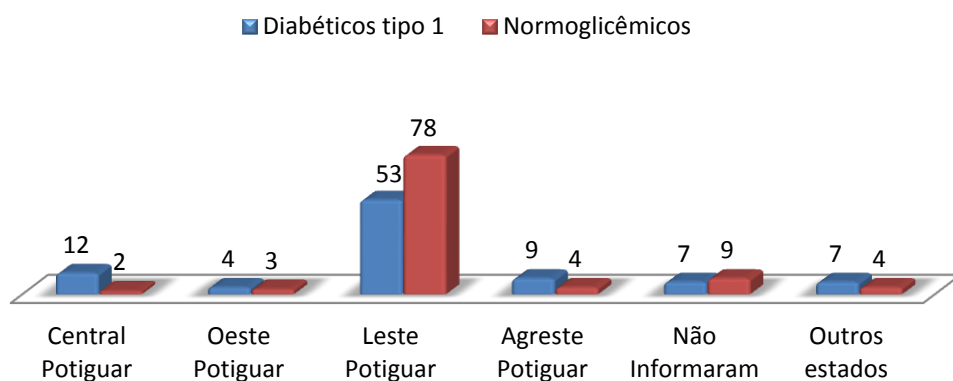


FIGURA 7- Distribuição dos indivíduos normoglicêmicos e diabéticos de acordo com sua naturalidade.

4.2 AVALIAÇÃO DO CONTROLE GLICÊMICO

As diretrizes propostas pela Associação Americana de Diabetes - ADA (2013) e pela Sociedade Brasileira de Diabetes - SBD (2009) propõem que o controle glicêmico deva ser avaliado através de dosagens periódicas da glicose de jejum e hemoglobina glicada. Os resultados para esses parâmetros nos grupos estudados são apresentados na Tabela 7.

TABELA 7 - Parâmetros de controle glicêmico de acordo com os grupos de estudo

	NG (n=100)	DM1 (n=92)	p valor
Glicose (mg/dL)	81 (48-149)	222 (59-540)	*<0,0001
Hemoglobina Glicada (%)	5,4 (3-7,5)	9,6 (4,8-17,8)	*<0,0001

Os resultados foram expressos em média \pm desvio padrão ou mediana (intervalo interquartil). Os grupos foram comparados usando teste T ou Mann-Whitney dependendo da normalidade na distribuição das variáveis. NG (grupo normoglicêmico); DM1 (grupo diabético tipo 1); *p< 0,05 em relação ao grupo NG.

No presente trabalho, foi observado um aumento estatisticamente significativo nos valores de glicose de jejum ($p < 0,0001$) nos indivíduos diabéticos em relação aos normoglicêmicos (Tabela 7). Sendo estes valores médios de glicose dos indivíduos diabéticos superiores às metas estabelecidas pela ADA como bom controle glicêmico (90-180mg/dL de acordo com a faixa etária do estudo, entre 6 a 12 anos). Resultados semelhantes também foram observados por Mahmud et al. (2008) avaliando indivíduos diabéticos tipo 1 com idade entre 12 e 18 anos e por Ceriello et al. (2010) que estudaram indivíduos com DM1 com idade entre 19 e 23 anos.

No tocante a hemoglobina glicada, os indivíduos do grupo diabético apresentaram valores significativamente elevados em relação aos indivíduos normoglicêmicos ($p < 0,0001$) (Tabela 7). Aproximadamente 70% dos indivíduos do grupo DM1 apresentaram valores de hemoglobina glicada superiores às metas preconizadas pela ADA para um bom controle glicêmico, isto é, apresentavam valores acima 8% de hemoglobina glicada (valor referente à faixa etária entre 6 a 12 anos). Resultados semelhantes em crianças e adolescentes com DM1 também foram evidenciados por Eppens et al. (2006), Falkner; Chang (2007) e Mahmud et al. (2008). Apenas 32 indivíduos do grupo DM1 (30%) apresentaram valores de hemoglobina glicada dentro das metas preconizadas pela ADA para um bom controle glicêmico ($< 8\%$).

O regime terapêutico mais utilizado foi a reposição diária do hormônio da insulina, por meio da aplicação injetável subcutânea de insulina recombinante humana, em doses subdivididas por turnos (manhã, tarde e noite), também chamado de regime de Múltiplas Doses de Insulina (MDI) ou Intensivo. O regime procura mimetizar o padrão de secreção fisiológica da insulina pancreática em resposta à ingestão alimentar através da aplicação de insulina de ação curta (regular) ou análogos de ação rápida (lispro ou aspart), antes de cada refeição, e da secreção de insulina basal através da NPH (insulina de ação intermediária), ou através dos análogos de ação longa (glargina ou detemir) (ROSSETI et al., 2003).

No mercado, existem diversos tipos de insulina e, embora apresentem diferenças quanto a produção, constituição, concentração, e solubilidade, a principal característica que distingue os diferentes tipos de insulinas disponíveis no mercado é a sua farmacocinética. A insulina do tipo NPH (Protamina Neutra Hagedorn) é uma insulina de ação intermediária, cuja ação inicia-se aproximadamente 1 a 3 horas após a injeção e dura cerca de 20 a 24 horas. Já a insulina Regular é uma insulina de ação curta e seu efeito aparece dentro de 30 minutos após a injeção, e tem duração, em geral, de 5-8 horas (KATZUNG, 2006).

O esquema terapêutico mais utilizado foi o uso de três injeções diárias de insulina de NPH mais três de regular. Sendo em média: 10U NPH + 2U Regular (manhã), 8U NPH + 6U Regular (tarde) e 6U NPH + 4U Regular (Noite).

A insulino terapia associada a um treinamento abrangente de autoadministração é terapia padrão para maioria dos pacientes com DM1, e o controle glicêmico próximo ao estado euglicêmico é capaz de retardar o início e desacelerar a progressão das complicações microvasculares e macrovasculares decorrentes do DM1 (DCCT, 1993).

Os resultados obtidos para o controle glicêmico deixam claro que, embora relatem o uso da insulina como tratamento, os pacientes desse estudo apresentam um controle glicêmico insatisfatório que pode estar relacionado tanto a fatores próprios da idade, como a dificuldade de aceitação da doença, comprometendo a adesão ao tratamento, como também a sensibilidade prejudicada à insulina devido às flutuações hormonais durante a puberdade, a incapacidade de promover o auto-cuidado, especialmente em crianças com menos de seis anos de idade, além de fatores socioeconômicos (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2013).

Corroborando esses resultados de controle glicêmico insatisfatório em nível nacional, um recente estudo multicêntrico conduzido entre dezembro de 2008 a dezembro de 2010, em 28 entidades públicas de saúde localizadas em 20 cidades das 5 regiões do Brasil (norte, nordeste, centro-oeste, sul e sudeste), totalizando 1077 indivíduos com média de 14 anos duração do DM1, encontrou que 40,2% da população estudada com DM1 apresentavam níveis de HbA1c entre 7% e 9% e 42,9% apresentavam-se acima de 9%. Com apenas 11,6% apresentando-se dentro das metas preconizadas pela ADA ($HbA1c < 7\%$). Setenta por cento da população estudada com DM1 apresentavam glicemia de jejum acima de 130mg/dl. Além disso, 31,6% apresentavam hipertensão, 70% apresentavam alterações no exame de fundo de olho, 45,9% colesterol LDL acima de 100mg/dl, entre outras alterações (GOMES et al., 2012).

Esses resultados demonstram que a situação encontrada na população do presente estudo não se diferencia do resto do Brasil. E que, como o estudo de Gomes et al. (2012), abrangeu indivíduos com, em média, 30 anos de idade e 14 anos de duração de DM1, as complicações micro e macrovasculares, as quais já estavam presentes nos indivíduos estudados, representam um indicativo futuro do quadro de complicações que poderão surgir, nos indivíduos do presente estudo, caso o controle glicêmico insatisfatório perdure.

4.3 ASSOCIAÇÃO DE POLIMORFISMOS DO HLA COM A SUSCEPTIBILIDADE AO DM1

Foram genotipados 92 indivíduos com DM1 e 100 normoglicêmicos para os genes HLA-DRB1, HLA-DQA1 e HLA-DQB1, caracterizando a classe II do HLA. Os resultados apresentados para grupo diabético foram comparados ao grupo normoglicêmico.

4.3.1 Frequências alélicas do HLA-DRB1, HLA-DQA1 e DQB1 em crianças e adolescentes com DM1, comparadas às do grupo NG

Os alelos que se apresentaram significativamente mais frequentes nos indivíduos com DM1 quando comparado ao grupo NG, em ordem decrescente de razão de chances, foram:

Para o HLA-DRB1:

- DRB1*03:01 ($p < 0,0001$; OR=8,72), DRB1*04:05 ($p < 0,0001$; OR=8,43), DRB1*04:01 ($p = 0,003$; OR=4,71) e o DRB1*04:02 ($p = 0,03$; OR=2,65).

Para o HLA-DQA1:

- DQA1*03:01g ($p < 0,0001$; OR=3,7) e DQA1*05:01g ($p = 0,02$; OR=1,7).

E para o HLA-DQB1:

- DQB1*02:01g ($p < 0,0001$; OR=3,7) e o DQB1*03:02 ($p < 0,0001$; OR=3,4).

Estes resultados demonstram a associação destes alelos com a susceptibilidade ao DM1. As frequências alélicas do HLA-DRB1, HLA-DQA1 e HLA-DQB1 são mostradas nas tabelas 8, 9 e 10, respectivamente. Os alelos significativamente associados com a susceptibilidade ao DM1 estão destacados em vermelho.

TABELA 8 - Comparação das frequências dos alelos de HLA-DRB1 entre pacientes com DM1 e o grupo NG

Alelos DRB1*	NG (2n=200)		DM1 (2n=184)		p valor	OR	IC
	n	%	n	%			
01:01	9	4,5	9	4,9	1,00		
01:02	12	6,0	7	3,8	0,09		
03:01	8	4,0	51	27,7	*<0,0001	8,72	4,0 - 19,0
03:02	3	1,5	0	0,0	#		
03:03	1	0,5	0	0,0	#		
03:05	1	0,5	0	0,0	#		
04:01	4	2,0	17	9,2	*0,003	4,71	1,6 - 14,3
04:02	7	3,5	17	9,2	*0,03	2,65	1,1 - 6,5
04:03	3	1,5	0	0,0	#		
04:04	7	3,5	10	5,4	0,46		
04:05	4	2,0	27	14,7	*<0,0001	8,43	2,9 - 24,6
04:06	1	0,5	0	0,0	#		
04:07	1	0,5	2	1,1	0,61		
04:11	4	2,0	0	0,0	#		
07:01	17	8,5	13	7,1	0,70		
07:03	1	0,5	0	0,0	#		
07:09	1	0,5	0	0,0	#		
08:01	4	2,0	3	1,6	1,00		
08:02	6	3,0	1	0,5	0,12		
08:04	6	3,0	0	0,0	#		
08:07	1	0,5	0	0,0	#		
09:01	1	0,5	4	2,2	0,20		
10:01	5	2,5	2	1,1	0,45		
11:01	15	7,5	1	0,5	*0,0005	0,07	0,01 - 0,5
11:02	5	2,5	2	1,1	0,45		
11:03	1	0,5	2	1,1	0,61		
11:04	7	3,5	1	0,5	0,07		
12:01	1	0,5	1	0,5	1,00		
13:01	16	8,0	4	2,2	*0,01	0,26	0,08 - 0,8
13:02	10	5,0	4	2,2	0,18		
13:03	1	0,5	1	0,5	1,00		
13:05	1	0,5	0	0,0	#		
14:01	4	2,0	0	0,0	#		
14:02	4	2,0	0	0,0	#		
14:04	1	0,5	0	0,0	#		
14:06	1	0,5	0	0,0	#		
15:01	10	5,0	2	1,1	*0,04	0,21	0,04 - 0,96
15:02	1	0,5	0	0,0	#		
15:03	10	5,0	1	0,5	*0,01	0,10	0,01 - 0,82
16:01	1	0,5	1	0,5	1,00		
16:02	4	2,0	1	0,5	0,37		
Total	200	100	184	100			

Os resultados foram expressos em frequência absoluta e frequência relativa em porcentagem. Foi utilizado teste exato de Fisher para avaliar diferenças entre os grupos DM1 e NG. *p<0,05. OR – Odds Ratio, IC – intervalo de confiança de 95% para o OR. Alelos destacados em vermelho representam associação significativa com a susceptibilidade ao DM1 e alelos destacados em azul representam associação significativa com a proteção ao DM1. # p valor, OR e IC não puderam ser estimados corretamente devido à ausência de indivíduos em algum dos grupos.

TABELA 9 - Comparação das frequências dos alelos de HLA-DQA1 entre pacientes com DM1 e o grupo NG

Alelos DQA1*	NG (2n=200)		DM1 (2n=184)		p valor	OR	IC
	n	%	n	%			
01:01g	32	16,0	18	9,8	0,09		
01:02	35	17,5	8	4,3	*<0,0001	0,2	0,1 - 0,5
01:03	16	8,0	3	1,6	*0,004	0,2	0,05 - 0,7
02:01	19	9,5	11	6,0	0,25		
03:01g	34	17,0	79	42,9	*<0,0001	3,7	2,3 - 5,9
04:01g	19	9,5	4	2,2	*0,002	0,2	0,07 - 0,6
05:01g	45	22,5	61	33,2	*0,02	1,7	1,1 - 2,7
Total	200	100,0	184	100,0			

Os resultados foram expressos em frequência absoluta e frequência relativa em porcentagem. Foi utilizado teste exato de Fisher para avaliar diferenças entre os grupos DM1 e NG. *p<0,05. OR – *Odds Ratio*, IC – intervalo de confiança de 95% para o OR. Alelos destacados em vermelho representam associação significativa com a susceptibilidade ao DM1 e alelos destacados em azul representam associação significativa com a proteção ao DM1. DQA1*01:01g, 03:01g, 04:01g e 05:01g – nomenclatura para o éxon 2 -DQA1*01:01/04/05, 03:01/02/03, 04:01/04 e 05:01/03/05, respectivamente.

TABELA 10 - Comparação das frequências dos alelos de HLA-DQB1 entre pacientes com DM1 e o grupo NG

Alelos DQB1*	NG (2n=200)		DM1 (2n=184)		p valor	OR	IC
	n	%	n	%			
02:01g	27	13,5	67	36,4	*<0,0001	3,7	2,2 - 6,1
03:01g	38	19,0	14	7,6	0,0009	0,3	0,18 - 0,7
03:02	29	14,5	67	36,4	*<0,0001	3,4	2,1 - 5,5
03:03	3	1,5	2	1,1	1,00		
04:02	18	9,0	5	2,7	*0,010	0,3	0,1 - 0,8
05:01	27	13,5	19	10,3	0,35		
05:02	4	2,0	1	0,5	0,37		
05:03	6	3,0	0	0,0	#		
06:01	2	1,0	0	0,0	#		
06:02	21	10,5	2	1,1	*<0,0001	0,1	0,02 - 0,4
06:03	15	7,5	3	1,6	*0,007	0,2	0,06 - 0,7
06:04	6	3,0	3	1,6	0,506		
06:09	4	2,0	1	0,5	0,374		
Total	200	100,0	184	100,0			

Os resultados foram expressos em frequência absoluta e frequência relativa em porcentagem. Foi utilizado teste exato de Fisher para avaliar diferenças entre os grupos DM1 e NG. *p<0,05. OR – *Odds Ratio*, IC – intervalo de confiança de 95% para o OR. Alelos destacados em vermelho representam associação significativa com a susceptibilidade ao DM1 e alelos destacados em azul representam associação significativa com a proteção ao DM1. # p valor, OR e IC não puderam ser estimados corretamente devido à ausência de indivíduos em algum dos grupos. DQB1*02:01g e 03:01g – nomenclatura para o éxon 2 - DQB1*02:01/02 e 03:01/19, respectivamente.

Estudos recentes envolvendo populações de origem caucasiana também observaram a associação dos alelos relacionados à susceptibilidade ao DM1 encontrados neste estudo (TABELAS 8 e 10). Manan et al. (2010), estudando 103 crianças e adolescentes árabes com DM1 e 108 indivíduos controles relataram os mesmos alelos de risco DRB1 e DQB1 presentes neste estudo: DRB1*03:01 (OR=11,1); DRB1*04:05 (OR=6,02); DRB1*04:01 (OR=5,8); DQB1*02:01 (OR=17,69) e DQB1*03:02 (OR =3,77).

Ei Wafai et al. (2011) estudando os alelos DRB1 e DQB1 de 39 libaneses com DM1 e 46 indivíduos controles, encontraram resultados semelhantes, com associação positiva para DRB1*03:01 ($p<0,0001$; OR=8,3), DQB1*02:01 ($p<0,0001$; OR=5,38) e o DM1.

Sayad et al. (2012) estudando 105 crianças iranianas e 100 indivíduos controles relataram os seguintes alelos de susceptibilidade: DRB1*04:01 ($p<0,0001$; OR=6,0), DRB1*03:01, ($p=0,0004$; OR=3,1), DQB1*03:02 ($p<0,0001$; OR=7,1) e DQB1*02:01 ($p=0,001$; OR=2,3).

Fendler et al. (2011) estudando 302 crianças polonesas com DM1 também relataram maiores frequências desses alelos em pacientes com DM1: DRB1*03:01 (22,3%), DQA1*05:01 (29,9%) e DQB1*02:01 (30,8%).

Mosaad et al. (2012) estudando 85 crianças e adolescentes egípcias com DM1 e 113 indivíduos controles encontraram, de forma semelhante, para o HLA-DQ, os alelos DQB1*02:01 ($p=0,001$; OR=2,21) e DQB1*03:02 ($p<0,001$; OR=19,2).

No Brasil, Alves et al. (2006) avaliando todos estudos publicados até 2002, sobre a associação de haplótipos HLA com DM1 em brasileiros, (somente 8 estudos e todos realizados na região sudeste) relataram também como alelos de susceptibilidade o DRB1*03:01, DRB1*04, DQB1*02:01 e o DQB1*03:02.

Os alelos que foram significativamente mais frequentes no grupo NG em relação ao DM1, em ordem crescente de razão de chances, foram:

- Para o HLA-DRB1:
 - DRB1*11:01 ($p=0,0005$; OR=0,07), DRB1*15:03 ($p=0,01$; OR=0,1), DRB1*15:01 ($p=0,04$; OR=0,21) e DRB1*13:01 ($p=0,01$; OR=0,26).
- Para o HLA-DQA1:
 - DQA1*01:02 ($p<0,0001$; OR=0,2), DQA1*04:01 ($p=0,001$; OR=0,2) e DQA1*01:03 ($p=0,004$; OR=0,2).
- E para o HLA-DQB1:
 - DQB1*06:02 ($p<0,0001$; OR=0,1), DQB1*03:01g ($p=0,0009$; OR=0,3), DQB1*06:03 ($p=0,007$; OR=0,2) e DQB1*04:02 ($p=0,01$; OR=0,3).

Estes resultados (destacados em azul nas tabelas 8, 9 e 10, respectivamente) sugerem um possível efeito protetor desses alelos na chance ao desenvolvimento do DM1.

Sayad et al. (2012) estudando 105 pacientes iranianos com DM1 e indivíduos controles também relataram a maior frequência dos alelos DRB1*15:01 ($p=0,0008$; OR=0,2), DRB1*13:01 ($p<0,0001$; OR=0,1) e DQB1*03:01 ($p<0,0001$; OR=0,3) no grupo NG quando comparados ao grupo DM1. Diferenciando-se apenas pelo encontro da associação do DQB1*06:01 ($p=0,0002$; OR=0,2), o qual não foi associado no presente estudo, mas sim os alelos DQB1*06:02 ($p<0,0001$; OR=0,1) e o DQB1*06:03 ($p=0,007$; OR=0,2).

Keskin et al. (2012) estudando 80 indivíduos com DM1 e 80 indivíduos controles da região sudeste da Turquia encontraram também os alelos DRB1*11, DRB1*13 e adicionalmente o DRB1*14, como estando mais frequentemente presentes no grupo NG em relação ao grupo DM1.

Para o grupo NG, todos os 3 loci do HLA classe II estudados (DRB1, DQA1 e DQB1) encontravam-se em equilíbrio Hardy-Weinberg (DRB1: $p=0,095$, DQA1: $p=0,560$ e DQB1: $p=0,051$). Já para o grupo DM1, apenas o locus DQB1 apresentava-se em equilíbrio (DRB1: $p=0,002$, DQA1: $p=0,032$ e DQB1: $p=0,16$). Segundo Chen et al. (1999), o desvio da proporção de Hardy-Weinberg pode estar relacionado a forças naturais, como a vantagem seletiva ou recente mistura racial, ou pode refletir erros de genotipagem.

Já Wittke-Thompson, Pluzhnikov e Cox (2005), afirmam que devido a proporção de indivíduos afetados por uma doença em uma população, ser pequena, o grau de desvio do EHW, em estudos caso-controle, deve ser mais forte nos casos do que em controles para que se possa encontrar uma associação genética. Dado que se ambas as populações estão em perfeito EHW, a presença de associações genéticas evidencia que há diferenças nas frequências genóticas entre casos e controles, implicando que nem casos e nem controles podem estar em EHW.

Como indicador de qualidade da genotipagem, em estudos caso-controle, sugere-se a necessidade de investigar a compatibilidade com EHW apenas no grupo controle (ZIEGLER; STEEN; WELLEK, 2011). Dessa forma, no presente estudo a população NG, ou controle, apresentou-se em equilíbrio, demonstrando então um indicativo de controle de qualidade da genotipagem e também da possibilidade de encontrar associações genéticas coerentes.

O desequilíbrio de ligação (DL) entre os pares de loci analisados foi significativo em ambos os grupos estudados, obtendo um $p=0,00000$ tanto para DRB1 e DQA1, como para DRB1 e DQB1 e também para DQA1 e DQB1. Confirmando que os diferentes alelos dos loci de HLA não segregam independentemente e são frequentemente herdados juntos de maneira

conservativa, constituindo um haplótipo. Esses haplótipos podem ser evolutivamente conservados e são referidos como haplótipos ancestrais que são importantes marcadores genéticos relacionados ao DM1 (BLOMHOFF et al., 2006). A seguir, então, realizou-se então a análise dos haplótipos formados pelos alelos DRB1, DQA1 e DQB1.

4.3.2 Frequências haplotípicas do HLA-DRB1, HLA-DQA1 e HLA-DQB1 em crianças e adolescentes com DM1 comparadas às do grupo NG.

Após a reconstrução haplotípica, formaram-se 34 haplótipos no grupo DM1 e 61 no grupo NG. O principal haplótipo associado com a susceptibilidade ao DM1 foi o DRB1*03:01-DQA1*05:01-DQB1*02:01 ($p < 0,0001$; OR=10,6), seguido do haplótipo DRB1*04:05-DQA1*03:01g-DQB1*03:02 ($p < 0,0001$; OR=7,7). Os haplótipos DRB1*04:02-DQA1*03:01g-DQB1*03:02 ($p = 0,02$; OR=4,6) e DRB1*04:01-DQA1*03:01g-DQB1*03:02 ($p = 0,03$; OR=2,8) também mostraram-se significativamente mais frequentes no grupo DM1.

Os resultados das frequências haplotípicas do HLA-DR-DQ encontradas neste estudo são mostrados na tabela 11. Os haplótipos significativamente associados com a susceptibilidade ao DM1 estão destacados em vermelho.

TABELA 11 - Comparação das frequências haplotípicas de HLA-DRB1-DQA1-DQB1 entre pacientes com DM1 e o grupo NG

Haplótipos DRB1-DQA1-DQB1	NG (2n=200)		DM1 (2n=184)		p valor	OR	IC
	n	%	n	%			
01:01 01:01 05:01	9	4,5	6	3,3	0,60		
01:02 01:01 05:01	11	5,5	10	5,4	1,00		
03:01 05:01 02:01	7	3,5	51	27,7	*<0,0001	10,6	4,7 - 24,0
03:02 04:01 04:02	3	1,5	0	0,0	#		
04:01 03:01 03:02	3	1,5	12	6,5	*0,02	4,6	1,3 - 16,5
04:02 03:01 03:02	7	3,5	17	9,2	*0,03	2,8	1,1 - 6,9
04:03 03:01 03:02	3	1,5	0	0,0	#		
04:04 03:01 03:02	7	3,5	9	4,9	0,61		
04:05 03:01 02:01	0	0,0	2	1,1	0,23		
04:05 03:01 03:02	4	2,0	26	14,1	*<0,0001	7,7	2,6 - 22,6
04:07 03:01 03:02	0	0,0	2	1,1	#		
04:11 03:01 03:02	4	2,0	0	0,0	#		
07:01 02:01 02:01	14	7,0	10	5,4	0,67		
07:01 02:01 03:03	2	1,0	1	0,5	1,00		
07:01 03:01 02:01	1	0,5	3	1,6	0,35		
08:01 04:01 04:02	4	2,0	3	1,6	0,71		
08:02 04:01 04:02	6	3,0	1	0,5	0,12		
09:01 03:01 02:01	1	0,5	2	1,1	0,61		
10:01 01:01 05:01	5	2,5	2	1,1	0,45		
11:01 01:02 06:02	2	1,0	0	0,0	#		
11:01 05:01 03:01	12	6,0	1	0,5	*0,003	0,09	0,01 - 0,67
11:02 05:01 03:01	5	2,5	2	1,1	0,45		
11:04 05:01 03:01	5	2,5	1	0,5	0,22		
13:01 01:03 06:03	12	6,0	3	1,6	*0,03	0,3	0,1 - 0,9
13:01 05:01 03:01	3	1,5	0	0,0	#		
13:02 01:02 06:04	6	3,0	3	1,6	0,08		
13:02 01:02 06:09	4	2,0	1	0,5	0,37		
13:03 05:01 03:01	0	0,0	2	1,1	#		
14:01 01:01 05:03	4	2,0	0	0,0	#		
14:02 05:01 03:01	2	1,0	0	0,0	#		
15:01 01:02 06:02	8	4,0	2	1,1	0,11		
15:03 01:02 06:02	9	4,5	0	0,0	#		
16:02 05:01 03:01	2	1,0	1	0,5	1,00		
Total	165	82,5	173	93,6			

Os resultados foram expressos em frequência absoluta e frequência relativa em porcentagem. Foi utilizado teste exato de Fisher para avaliar diferenças entre os grupos DM1 e NG. *p<0,05. OR – Odds Ratio, IC – intervalo de confiança de 95% para o OR. Haplótipos destacados em vermelho representam associação significativa com a susceptibilidade ao DM1 e haplótipos destacados em azul representam associação significativa com a proteção ao DM1. Foram reportados apenas os haplótipos com frequências iguais ou superiores a 1% em pelo menos um dos grupos. # p valor, OR e IC não puderam ser estimados corretamente devido à ausência de indivíduos em algum dos grupos.

Embora alelos individualmente possam ser predisponentes, neutros ou protetores para o DM1, combinações específicas de alelos dos genes da classe II do HLA (haplótipos) parecem ser mais informativas em determinar a extensão do risco para o desenvolvimento do DM1, uma vez que representam uma região cromossômica mais extensa e relacionam-se à codificação de cadeias de HLA em conformações específicas que promovem a apresentação mais efetiva de epítopos diabetogênicos às células T (VAN LUMMEL et al., 2012).

Erlich et al. (2008) realizando uma análise por meio de um consórcio mundial que compila dados genéticos de famílias com DM1 em várias populações (*The Type 1 Diabetes Genetics Consortium*) constataram que em grupo de estudo constituído de 607 famílias caucasianas (recrutadas da Europa, América do Norte e Austrália) e 38 famílias asiáticas (Filipinas) os haplótipos de susceptibilidade para o DM1, em semelhança com o presente estudo, foram: DRB1*03:01-DQA1*05:01-DQB1*02:01 (OR=3,64), DRB1*04:05-DQA1*03:01-DQB1*03:02 (OR=11,37), DRB1*04:01-DQA1*03:01-DQB1*03:02 (OR=8,39) e DRB1*04:02-DQA1*03:01-DQB1*03:02 (OR=3,63).

Cifuentes et al. (2011), em um estudo de meta-análise combinada de associação e de base familiar com o DM1 em publicações latino-americanas, realizadas até junho de 2010, envolvendo 215 famílias e 1304 casos de DM1 comparados com 1969 controles, encontraram, da mesma forma, os haplótipos DRB1*03:01-DQA1*05:01-DQB1*02:01 (p=0,0028; OR=7,51), DRB1*04:05-DQA1*03-DQB1*03:02 (p=0,0002; OR=11,64) e o DRB1*04:01-DQA1*03-DQB1*03:02 (p<0,0001; OR=5,9), significativamente associados com a susceptibilidade ao DM1.

Thomson et al. (2007) em uma análise de 38 estudos realizados em 30 países de diversas regiões do mundo (Europa, norte da África, África subsaariana, Ásia, América do Norte, Oceania, entre outras), identificaram uma hierarquia consistente entre os haplótipos DR4-DQB1*03:02 mais comumente associados com a susceptibilidade. Apresentando-se na seguinte ordem de associação: DRB1*04:05=*04:01=*04:02> *04:04>*04:03-DQB1*03:02. Com o haplótipo DRB1*03:01-DQA1*05:01-DQB1*02:01 aparecendo abaixo da predisposição do DRB1*04:02 e acima do DRB1*04:04-DQB1*03:02. No presente estudo, entretanto, não se observou a mesma hierarquia sendo o DRB1*03:01-DQA1*05:01-DQB1*02:01 (p<0,0001; OR=10,6), o haplótipo com maior associação com a susceptibilidade ao DM1 seguido do DRB1*04:05-DQA1*03:01g-DQB1*03:02 (p<0,0001; OR=7,7), do DRB1*04:02-DQA1*03:01g-DQB1*03:02 (p=0,02; OR=4,6) e por último o DRB1*04:01-DQA1*03:01g-DQB1*03:02 (p=0,03; OR=2,8).

Contrariamente, estudos em populações asiáticas não caucasianas (Ásia-oriental), como o *JAPANESE Study Group (JSGIT)* (2012), estudando 497 crianças e adolescentes japonesas com DM1, constataram a presença do haplótipo DRB1*09:01-DQA1*03:01-DQB1*03:03 como mais o frequentemente associado com DM1. A grande maioria dos estudos em populações japonesas relata a presença de haplótipos diferentes dos mais comumente associados ao DM1 em populações caucasianas. Esse resultado está também relacionado à baixa incidência do DM1 nessas populações do extremo oriente. Já Hu Cy et al. (1993), estudando pacientes com DM1 de Taiwan encontrou associação tanto com haplótipos de susceptibilidade comumente encontrados em caucasianos, mas também de haplótipos japoneses específicos, como o citado acima.

No Brasil, Fernandes et al. (2002) analisando 64 pacientes com DM1 e 181 indivíduos controles, selecionados de forma randomizada entre doadores de sangue da região de São Paulo relataram o haplótipo DRB1*03:01-DQA1*05:01-DQB1*02:01 ($p=0,0007$; $OR=2,1$), como significativamente associado com a susceptibilidade ao DM1, sendo encontrado em 38% dos pacientes e em 11% dos indivíduos controles. O estudo relatou ainda, o haplótipo DRB1*04:05-DQA1*03:01-DQB1*03:02, embora sem significância estatística.

Um estudo recente de Alves et al. (2012) envolvendo 178 pacientes com DM1 e seus 546 parentes de primeiro grau, no estado de São Paulo, demonstrou que 88,9% dos irmãos dos pacientes com DM1 que possuíam uma ou duas cópias dos haplótipos DRB1*03:01-DQA1*05:01-DQB1*02:01 e DRB1*04-DQA1*03:01-DQB1*03:02, apresentavam um aumento no risco para o desenvolvimento de autoanticorpos contra as ilhotas pancreáticas.

Os haplótipos relacionados à proteção ao DM1, os quais se apresentaram mais frequentemente no grupo NG, quando comparados ao grupo DM1 foram o DRB1*11:01-DQA1*05:01g-DQB1*03:01 ($p=0,003$; $OR=0,09$) e o DRB1*13:01-DQA1*01:03-DQB1*06:03 ($p=0,03$; $OR=0,3$). Estes resultados (destacados em azul na tabela 9) sugerem um possível efeito protetor dos haplótipos na chance ao desenvolvimento do DM1.

Saruhan-Direskeneli et al. (2000) estudando 80 indivíduos com DM1 e 80 indivíduos controles da região sudeste da Turquia reportaram além dos haplótipos de proteção encontrados no presente estudo: DRB1*13:01-DQA1*01:03-DQB1*06:03 ($p=0,004$; $OR=0,2$) e o DRB1*11:01-DQA1*05:01-DQB1*03:01 ($p<0,0001$; $OR=0,2$), os seguintes haplótipos: DRB1*13:03-DQA1*05:01-DQB1*03:01, DRB1*15:02-DQA1*01:03-DQB1*06:01, DRB1*07:01-DQA1*02:01-DQB1*02:02, DRB1*11:04-DQA1*05:01-DQB1*03:01 e DRB1*15:01-DQA1*01:02-DQB1*06:02.

Stayoussef et al. (2009), estudando 88 indivíduos com DM1 e 112 indivíduos controles da Tunísia Central, encontraram, em semelhança ao presente trabalho, apenas o DRB1*11:01-DQA1*05:01-DQB1*03:01 ($p=0,036$; $OR=0,21$), e adicionalmente o DRB1*07:01-DQA1*02:01-DQB1*02:02 ($p=0,015$; $OR=0,34$), como relacionados à proteção ao DM1.

O haplótipo DRB1*15:01-DQA1*01:02-DQB1*06:02 tem se destacado como um dos haplótipos mais comumente relacionados à proteção ao desenvolvimento do DM1, em populações caucasianas (NOBLE; VALDES, 2011). No presente estudo, entretanto, o mesmo não se apresentou de maneira significativamente associada à proteção ao DM1. No entanto, quando se associa o haplótipo do grupo DR15, isto é, DRB1*15-DQA1*01:02-DQB1*06:02, ele aparece significativamente associado à proteção ($p=0,0001$; $OR=0,06$).

Segundo Borchers, Uibo e Gershwin (2010), de uma forma geral, alguns haplótipos conferem susceptibilidade ou proteção em essencialmente todas as populações estudadas, mas a força de associação difere. Há uma concordância de que os haplótipos DR3: DRB1*03:01-DQA1*05:01-DQB1*02:01 e certos subtipos do DR4: DRB1*04:01, 04:02, 04:04 e 04:05 com DQA1*03:01-DQB1*03:02 conferem uma maior susceptibilidade para o DM1. Em contraste, DRB1*15, *13 com o DQB1*06 e DRB1*14 com o DQB1*05, provém maior proteção. Nota-se, entretanto, que esse risco não reflete que os mesmos haplótipos conferem risco em todas as populações, às vezes, podem ser completamente ausentes em algumas populações, ou sua incidência pode ser tão baixa que faz sua contribuição mínima, ou ainda, podem ser neutros e até protetores em outras populações (BORCHERS; UIBO; GERSHWIN, 2010).

4.3.3 Frequências dos genótipos classe II do HLA em crianças e adolescentes com DM1, comparadas às do grupo NG

Com base na classificação sorológica para cada especificidade alélica os haplótipos de susceptibilidade podem ser abreviados, nas seguintes nomenclaturas: o DRB1*03:01-DQA1*05:01-DQB1*02:01 pode ser denominado DR3-DQ2 e os haplótipos que são DRB1*04(01/02/03/04/05/07/11)-DQA1*03:01g-DQB1*03:02, podem ser agrupados no haplótipo DR4-DQ8 (TABELA 12) (MARSH et al., 2010).

TABELA 12- Abreviação dos haplótipos de susceptibilidade em relação ao seu grupo sorológico

Haplótipos de susceptibilidade	Abreviação
1. DRB1*03:01-DQA1*05:01-DQB1*02:01	DR3-DQ2
2. DRB1*04-DQA1*03:01g-DQB1*03:02	DR4-DQ8

Fonte: Adaptado de Marsh et al. (2010).

O genótipo heterozigoto DR3-DQ2/DR4-DQ8, formado pela união dos principais haplótipos de susceptibilidade, é o genótipo mais fortemente associado com a susceptibilidade ao DM1. Já os genótipos homozigóticos DR3-DQ2/DR3-DQ2 e DR4-DQ8/DR4-DQ8 e os genótipos formados por apenas um dos haplótipos de susceptibilidade DR3-DQ2/ DRX-DQX, DR4-DQ8/DRX-DQX, apresentam um risco moderado na chance ao desenvolvimento do DM1. Os genótipos que não são formados por nenhum destes haplótipos (DRX-DQX/DRX-DQX) parecem apresentar um baixo efeito na susceptibilidade ao DM1 (AWA et al., 2010). A tabela 13 mostra as frequências dos genótipos de susceptibilidade entre pacientes com DM1 e o grupo NG do presente estudo.

TABELA 13 – Genótipos de susceptibilidade em crianças e adolescentes com DM1 e no grupo NG

Genótipos DR-DQ / DR-DQ	NG (n=100)		DM1 (n=92)		p valor	OR	IC
	n	%	n	%			
	Alto risco	DR3-DQ2 / DR4-DQ8	1	1,0			
	DR3-DQ2 / DR3-DQ2	0	0,0	7	7,6	#	
Risco moderado	DR3-DQ2 / DRX-DQX	6	6,0	10	10,9	0,30	1,9 0,7 - 5,5
	DR4-DQ8 / DR4-DQ8	0	0,0	6	6,5	#	
	DR4-DQ8 / DRX-DQX	27	27,0	27	29,3	0,75	1,1 0,6 - 2,1
Baixo Risco	DRX-DQX / DRX-DQX	66	66,0	15	16,3	*<0,0001	0,1 0,1 - 0,2
Total		100	100,0	92	100,0		

Os resultados foram expressos em frequência absoluta e frequência relativa em porcentagem. Foi utilizado teste exato de Fisher para avaliar diferenças entre os grupos DM1 e NG. DRX-DQX refere-se a outros haplótipos que não DR3-DQ2 ou DR4-DQ8. *p<0,05. OR – Odds Ratio, IC – intervalo de confiança de 95% para o OR. # p valor, OR e IC não puderam ser estimados corretamente devido à ausência de indivíduos no grupo NG.

Os resultados encontrados demonstram que o genótipo heterozigoto DR3-DQ2/DR4-DQ8 estava significativamente mais frequente ($\approx 30\%$ do grupo DM1) no grupo DM1 quando comparado ao grupo NG ($p<0,0001$; OR=41,1) destacando-se a existência de apenas um indivíduo com este genótipo no grupo NG, todos os outros pertenciam ao grupo DM1. Esse

resultado evidencia que a combinação destes haplótipos em heterozigose proporciona uma chance para o desenvolvimento do DM1 superior aos haplótipos em homozigose ou com apenas um dos haplótipos de susceptibilidade.

Os haplótipos em homozigose, DR3-DQ2/DR3-DQ2 e DR4-DQ8/DR4-DQ8, foram encontrados apenas no grupo DM1 e significativamente associados à susceptibilidade, embora os respectivos OR e IC não possam ser estimados corretamente devido à ausência de indivíduos no grupo NG.

Dezsofi et al. (2008) estudando 80 crianças com DM1 e 2080 indivíduos controles, húngaros e brancos, também encontraram o genótipo heterozigoto DR3-DQ2/DR4-DQ8 como o mais frequentemente associado a susceptibilidade ao DM1, com resultados de associação semelhantes aos encontrados nesse estudo (frequência 36,3%; $p > 0,0001$; OR= 41,67).

Guerin et al. (2007) estudando 124 crianças e adolescentes com DM1, de origem francesa nativa, com ancestralidade caucasiana, e francesa com ancestralidade africana, encontraram o genótipo heterozigoto DR3-DQ2/DR4-DQ8 bem mais frequentemente observado no grupo de franceses nativos do que nos franceses com ancestralidade africana. Demonstrando a forte influência desse genótipo para a população caucasiana e a sua relação com DM1.

Aly et al. (2006), em um estudo prospectivo, *The Diabetes Autoimmunity Study of the Young* (DAISY), em que foram acompanhados mais de 33.000 recém-nascidos, entre eles, irmãos de pacientes com DM1 na cidade de Colorado – Estados Unidos da América, identificaram o genótipo de alto risco em 2,4% dos recém-nascidos e em mais de 20% das crianças afetadas por DM1. A presença desse genótipo marcou um risco de 55% para o desenvolvimento do DM1, declarada aos 12 anos. O estudo evidenciou, ainda, que irmãos de indivíduos diabéticos que são HLA idênticos para o genótipo de alto risco apresentaram 80% de chance para uma produção persistente de autoanticorpos anti-ilhotas pancreáticas e 60% para a progressão do DM1 aos 15 anos de idade.

Na região nordeste do Brasil, um único estudo, realizado por Brandao et al. (2010), em Recife – PE, envolvendo 184 crianças e adolescentes com DM1 e 184 indivíduos saudáveis, demonstrou que o genótipo de alto risco (DR3-DQ2/DR4-DQ8), apresentou-se com um frequência significativamente superior no grupo DM1 quando comparada ao grupo NG ($p < 0,0001$; OR=8,72) e representou o genótipo presente na maioria (23%) dos indivíduos do grupo DM1. Embora o genótipo homozigoto (DR3-DQ2/DR3-DQ2) tenha se destacado como o mais fortemente associado a susceptibilidade ao DM1 (OR=19,74).

Como explicação para intensa força predisponente do genótipo heterozigoto, postula-se que a cadeia α codificada por DQA1 (DQA1*05:01 ou 03:01) de um haplótipo combina-se com a cadeia β codificada por DQB1 (DQB1*02:01 ou 03:02) de outro haplótipo formando um híbrido molecular, denominado de heterodímero DQ, em uma conformação estrutural trans, a qual parece estar implicado na apresentação de um repertório único de autoantígenos, desencadeando a geração e/ou ativação de células T auto-reativas responsáveis pela destruição das células beta pancreáticas (BRANDAO et al., 2010; VAN LUMMEL et al., 2012).

Para o grupo NG, a combinação de outros haplótipos que não aqueles relacionados com a susceptibilidade ao DM1, formando genótipos considerados de baixo risco ou, neste caso, denominados de DRX-DQX/DRX-DQX, apresentaram frequência significativamente mais elevada neste grupo (66%), quando comparada ao grupo DM1 ($p < 0,0001$; OR=0,1), indicando que a presença de outros genótipos estaria caracterizando um efeito protetor contra a chance de desenvolvimento do DM1. Embora aproximadamente 30% do grupo NG também apresentasse o haplótipo de susceptibilidade DR4-DQ8/DRX-DQX.

Alguns estudos afirmam que há uma diminuição da frequência do genótipo heterozigoto de alto risco (DR3-DQ2/DR4-DQ8) e um aumento dos genótipos de baixo risco DRX-DQX/DRX-DQX nos indivíduos recém-diagnosticados para o DM1 das últimas décadas (1985-2006), em relação às décadas anteriores (1965-1984) (STECK et al., 2011). Apesar do presente estudo não ter investigado a linha do tempo de diagnósticos dos indivíduos estudados, pode-se afirmar que para este grupo de pacientes com DM1, essa inversão das frequências dos genótipos não foi observada.

Em suma, nesta população de estudo encontraram-se os principais alelos, haplótipos e combinações de haplótipos de susceptibilidade e/ou proteção para o desenvolvimento do DM1, extensivamente descritos na literatura para a população caucasiana, com frequências e níveis de associação comparáveis a diversos lugares do mundo onde há uma alta incidência do DM1 (Sardenha – Itália, Marrocos – África) (IZAABEL et al., 1998; LAMPIS et al., 2000).

E apesar da população brasileira ser resultado de uma grande miscigenação étnica e racial, até em nível regional, os resultados deste trabalho mostram a possível ascendência caucasiana nesta população de estudo. Fato este sendo reiterado pela extensa influência de portugueses, franceses e holandeses na colonização do Rio Grande do Norte (TRINDADE, 2010). E pelo estudo de Lins et al. (2010), que demonstraram que a população brasileira é predominantemente composta por Europeus (ascendência caucasiana: 0,77), seguido por Africanos (0,143) e Ameríndios (Nativos da América do Sul: 0,085). Dessa forma, esses

resultados vêm se somar aos estudos realizados no Brasil, na América Latina, bem como em outras populações do mundo sobre a susceptibilidade do DM1.

O objetivo da identificação de alelos e haplótipos de HLA é auxiliar na predição e prevenção do DM1, bem como aprimorar a habilidade de determinar a influência tanto de fatores genéticos, como também de ambientais. Em países onde a incidência do DM1 é altíssima, como a Finlândia, sendo um foco de intenso estudo, e onde os principais fatores de riscos genéticos são bem conhecidos, foi implantado um programa de predição de riscos com base nos haplótipos de alto risco para o DM1 em recém-nascidos. A partir daí seria possível um acompanhamento profissional adequado, bem como, uma avaliação dos principais fatores ambientais que poderiam estar envolvidos no desenvolvimento do DM1 (BORCHERS; UIBO; GERSHWIN, 2010).

4.3.4 Associação das frequências genótípicas classe II do HLA com idade ao diagnóstico

O grupo DM1 foi subdividido em 2 grupos de acordo com a idade ao diagnóstico dos indivíduos estudados (\leq ou \geq a 5 anos de idade ao diagnóstico). Este valor foi selecionado com base na proximidade da média da idade ao diagnóstico de 6,9 anos e estudos prévios na literatura (GILLESPIE et al., 2004; HATHOUT et al., 2003; OKRUSZKO et al., 2012). As frequências dos genótipos de susceptibilidade foram, então, obtidas em relação aos subgrupos de idade ao diagnóstico.

No presente estudo, observou-se que o genótipo de alto risco DR3-DQ2/DR4-DQ8, formado pela combinação dos haplótipos de susceptibilidade, em heterozigose, DRB1*03-DQA1*05:01-DQB1*02:01/DRB1*04-DQA1*03:01g-DQB1*03:02), apresentou-se significativamente mais frequente no grupo de crianças com idade ao diagnóstico inferior a 5 anos do que no grupo de crianças com idade ao diagnóstico superior a 5 anos ($p=0,038$; $OR=3,05$). As crianças que possuíam o genótipo de alto risco apresentaram três vezes mais chances em desenvolver o DM1 antes dos 5 anos de idade do que aquelas com idade superior a 5 anos.

Já no grupo de crianças com idade ao diagnóstico superior a 5 anos de idade ocorreu uma maior frequência dos genótipos de risco moderado, em que estão incluídos os genótipos homozigotos e os genótipos com apenas um dos haplótipos de risco (frequência dos genótipos de risco moderado no grupo superior a 5 anos 65,5% vs. 43,2% do grupo inferior a 5 anos), destacando-se o genótipo DR4-DQ8/DRX-DQX, ou seja, da combinação do haplótipo HLA-DRB1*04*-DQA1*03:01-DQB1*03:02 associado a outros alelos que não DR3-DQ2 ou DR4-

DQ8, embora sem significância estatística. Os resultados da associação com a idade ao diagnóstico dos pacientes diabéticos deste estudo são mostrados na tabela 14.

TABELA 14 - Comparação das frequências genótípicas de HLA-DRB1-DQB1 com a idade ao diagnóstico das crianças e adolescentes com DM1

	Genótipos DRB1-DQB1 / DRB1-DQB1	Idade ao diagnóstico ≥ 5 anos (n=55)		Idade ao diagnóstico ≤ 5anos (n=37)		p valor	OR	IC
		n	%	n	%			
		Alto risco	DR3-DQ2 / DR4-DQ8	11	20,0			
Risco moderado	DR3-DQ2 / DR3-DQ2	5	9,1	2	5,4	0,70	0,57	0,10 – 3,12
	DR3-DQ2 / DRX-DQX	9	16,4	1	2,7	0,15	0,14	0,02 – 1,17
	DR4-DQ8 / DR4-DQ8	3	5,5	3	8,1	0,70	1,53	0,29 – 8,03
	DR4-DQ8 / DRX-DQX	19	34,5	10	27,0	0,50	0,70	0,28 – 1,75
Baixo risco	DRX-DQX / DRX-DQX	8	14,5	5	13,5	1,00	0,92	0,28 – 3,06
Total		55	100,0	37	99,9			

Os resultados foram expressos em frequência absoluta e frequência relativa em porcentagem. Foi utilizado teste exato de Fisher para avaliar diferenças entre os grupos DM1 e NG. DRX-DQX refere-se a outros haplótipos que não DR3-DQ2 ou DR4-DQ8. *p<0,05. OR – Odds Ratio, IC – intervalo de confiança de 95% para o OR.

Embora a idade ao diagnóstico do DM1 seja frequente entre 8 a 12 anos (KANTÁROVÁ; BUC, 2007), na última década observou-se um intenso aumento na incidência de DM1 em crianças com idade inferior a 5 anos, e com uma previsão alarmante que essa incidência dobrará até 2020, na Europa (PATTERSON et al., 2009). Fazendo-se deste, portanto, um grupo especial de estudo, uma vez que pouco se conhece sobre o plano de fundo genético bem como o *status* clínico e autoimune (HATHOUT et al., 2003).

Apesar do pequeno número de crianças com idade ao diagnóstico inferior a 5 anos de idade em relação ao total de crianças diagnosticadas, diferenças clínicas e autoimunes entre estas crianças e aquelas com idade ao diagnóstico superior os 5 anos de idade tem sido evidenciadas (HATHOUT et al., 2003). Constatou-se uma maior frequência dos haplótipos de susceptibilidade para o DM1 em crianças com idade ao diagnóstico inferior a 5 anos, já para as crianças com idade ao diagnóstico superior a 5 anos de idade, os haplótipos de susceptibilidade mais comuns apresentam uma frequência diminuída quando comparada ao grupo de menor idade ao diagnóstico, bem como apresentam uma frequência elevada de outros haplótipos não comumente relacionados com o risco ao DM1.

Komulainen et al. (1999) estudando um grupo de 35 crianças com idade ao diagnóstico inferior a 2 anos, outro grupo com 146 crianças entre 2 e 4,9 anos e outro com 620 crianças entre 5,0 e 14,9 anos de idade ao diagnóstico, por meio de um estudo nacional

sobre o diabetes na infância da Finlândia (*Childhood Diabetes in Finland – DiMe*) encontraram o que genótipo de alto risco, DR3-DQ2/DR4-DQ8, estava mais frequente nos grupos de crianças com idade inferior a 5 anos de diagnóstico, enquanto que, as crianças que apresentavam os genótipos carregando alelos protetores, possuíam idade ao diagnóstico igual ou superior a 5 anos.

Gillespie et al. (2002) em um estudo com 1.299 famílias na Inglaterra demonstraram que das crianças diagnosticadas com DM1 antes dos 5 anos, 52% eram heterozigotas (DR3-DQ2/DQ8), já as crianças com idade ao diagnóstico entre 5 e 9 anos e 10 a 14 anos apresentaram 32% e 33% respectivamente de heterozigose. Resultados semelhantes foram obtidos neste trabalho com uma porcentagem aproximada de 43% de heterozigose para as crianças com idade ao diagnóstico inferior a 5 anos e 20% de heterozigose para as crianças com idade ao diagnóstico superior a 5 anos (TABELA 14).

Lambert et al. (2004), em um estudo prospectivo com 753 famílias do Reino Unido, demonstraram que uma combinação de 6 genótipos de alto risco (entre eles DR3-DQ2/DR4-DQ8) aumentava a sensibilidade para diagnóstico do diabetes antes dos 5 anos de idade, enquanto que 11 genótipos foram necessários para obter a mesma sensibilidade para o diagnóstico nas idades entre 10 e 14 anos.

Hathout et al. (2003), estudando 40 crianças com início precoce de DM1 (2,6 anos em média) mostraram significantes diferenças nas frequências de alelos e haplótipos HLA de alto risco entre os grupos de crianças com início precoce e as com início tardio. Além disso, nenhum dos indivíduos do grupo precoce apresentou os alelos protetores DRB1*15:01 e DQB1*06:02.

Awa et al. (2010) estudando 1445 crianças e adolescentes alemãs e austríacas com DM1, demonstraram que os pacientes com o genótipo heterozigoto DR3-DQ2/DR4-DQ8 apresentaram uma média de idade significativamente mais baixa ($6,8 \pm 0,3$ anos) do que aqueles com o genótipo DRX-DQX/DRX-DQX ($8,19 \pm 0,37$ anos).

Valdes et al. (2012) estudando, em diferentes populações, a influência dos genótipos de risco para o início precoce ou tardio do DM1, demonstraram que as associações dos genótipos de HLA com a idade ao diagnósticos foram consistentes, principalmente em populações de origem caucasiana, e que o genótipo heterozigoto estava significativamente mais presente no grupo com idade ao diagnóstico inferior a 5 anos, quando comparado ao grupo com idade ao diagnóstico superior a 5 anos (Europa: $p=0,0085$; OR=1,15, América do Norte: $p=0,001$; OR=1,18, entre outras populações).

Okruszko et al. (2012) estudando 26 crianças com idade ao diagnóstico entre 0 - 5 anos, 100 crianças com 6 - 15 anos e 49 crianças com 15 - 25, observaram, da mesma forma que no presente estudo, um decréscimo da frequência do genótipo de alto risco DR3-DQ2/DR4-DQ8 com o aumento da idade ao diagnóstico. Sendo o grupo das crianças com idade ao diagnóstico entre 0 e 5 anos com a maior frequência deste genótipo (80,8%), seguido pelos demais grupos (63% e 25% respectivamente). Além disso, constatou-se a presença de alelos protetores DQB1*06:02 apenas nos grupos idade ao diagnóstico superior a 5 anos.

Ao analisar a presença de alelos e haplótipos protetores nos grupos de idade ao diagnóstico do presente estudo evidenciou-se que os alelos protetores DRB1*11:01, DRB1*13:01, DRB1*15:03 e o DQB1*06:03 estiveram presentes com maior frequência no grupo com idade ao diagnóstico superior a 5 anos de idade. Em relação aos haplótipos, dos 2 haplótipos encontrados no grupo DM1 como significativamente associados com a proteção ao DM1 (Tabela 10), todos estavam presentes em maior número no grupo com idade ao diagnóstico superior a 5 anos de idade (Tabela 15). Estudos em pacientes com DM1 diagnosticados após os 30 anos de idade (LADA), vem sugerindo que a presença desses alelos protetores teria um papel predominante em “atrasar” o início da autoimunidade do DM1 (ANDERSEN et al., 2010).

TABELA 15 - Comparação de alelos e haplótipos de HLA associados à proteção ao DM1 com a idade ao diagnóstico

Alelos e haplótipos relacionados à proteção ao DM1	Idade ao diagnóstico ≥ 5 anos (2n=110)		Idade ao diagnóstico ≤ 5anos (2n=74)	
	n	%	n	%
DRB1*11:01	1	0,9	0	0,0
DRB1*13:01	3	2,7	1	1,6
DRB1*15:03	1	0,9	0	0,0
DQB1*06:03	2	1,8	1	1,6
DRB1*11:01-DQA1*05:01g-DQB1*03:01	1	0,9	0	0,0
DRB1*13:01-DQA1*01:03-DQB1*06:03	2	1,8	1	1,6

Os resultados foram expressos em frequência absoluta e frequência relativa em porcentagem. Foi utilizado teste exato de Fisher para avaliar diferenças entre os grupos DM1 e NG. *p>0,05. OR – Odds Ratio, IC – intervalo de confiança de 95% para o OR.

Estudos mais recentes, como o de Dang, Buzzetti e Pozzilli (2013), propõem mecanismos epigenéticos como os possíveis responsáveis pela diminuição de genótipos de alto risco em indivíduos diagnosticados mais tardiamente. Os mecanismos (como a metilação de DNA proveniente, por exemplo, da nutrição) seriam meios pelos quais os fatores ambientais atuariam em favor da susceptibilidade ao DM1, com uma contribuição muito mais

influyente do que os fatores genéticos. Outros estudos apontam, além da maior influência de fatores ambientais nesses indivíduos, a atuação de outros loci genéticos, não-HLA na susceptibilidade ao DM1 (BORCHERS; UIBO; GERSHWIN, 2010). De maneira inversa, os indivíduos diagnosticados precocemente apresentam uma susceptibilidade ao DM1 decorrente em grande parte dos marcadores genéticos, como HLA (DANG; BUZZETTI E; POZZILLI, 2013).

Dessa forma, embora os haplótipos de susceptibilidade e proteção para o DM1 já estejam bem estabelecidos para qualquer faixa etária, os estudos em crianças com início de doença inferior a 5 anos de idade são de extrema importância, pois evidenciam a forte contribuição genética na determinação da susceptibilidade ao DM1, principalmente do genótipo heterozigoto da classe II do HLA.

Favoravelmente a esse fato, estudos demonstram que no início clínico do DM1 em crianças muito novas ocorre uma descompensação metabólica severa e as células beta pancreáticas residuais exibem uma pobre funcionalidade (HATHOUT et al.; 2003; KOMULAINEN et al., 1999).

Apoiando essa constatação, tem-se o fato de que a fase de remissão transitória no quadro hiperglicêmico que ocorre em até 60% de pacientes com DM1, após o início do tratamento com insulina, também chamada de *Honeymoon* (ou fase de Lua de mel), parece ocorrer mais frequentemente com o aumento da idade ao diagnóstico, podendo durar de 3 a 6 meses ou se estender até 2 anos (ABDUL-RASOUL et al., 2006; MUHAMMAD et al., 1999). Neste período as doses de insulina podem ser drasticamente reduzidas ou até retiradas. E, embora os mecanismos que regem esse aumento na funcionalidade das células beta pancreáticas residuais ainda sejam mal compreendidos, postula-se que o início do tratamento com insulina parece aliviar o estresse promovido pelo o constante *status* hiperglicêmico (BELLE; COPPIETERS; HERRATH, 2011), fato este, que parece não acontecer nos indivíduos com idade ao diagnóstico precoce.

Estudos relacionam o início precoce do DM1 com a rápida progressão da autoimunidade em algumas crianças (VAN AUTREVE et al., 2004; ZIEGLER et al., 2011). Há uma associação deste fato à presença, em particular, do genótipo heterozigoto DR3-DQ2/DR4-DQ8, que atuaria como um desencadeador genético da progressão da doença, devido ao estímulo superior tanto na progressão do quadro hiperglicêmico e conseqüentemente no inflamatório, como na alta produção de autoanticorpos decorrente desse processo (DECOCHEZ et al., 2002).

Ziegler e Bonifácio (2012), em um estudo longitudinal sobre a história natural da autoimunidade à ilhota pancreática e o DM1, por meio de um acompanhamento 1650 recém-nascidos de mãe ou pai com DM1 na Alemanha, demonstraram que das 156 crianças que desenvolveram os autoanticorpos (IAA, GADA, IA-2A ou ZnT8), as que apresentaram o genótipo de alto risco DR3-DQ2/DR4-DQ8 possuíam uma incidência significativamente mais elevada de autoanticorpos contra as ilhotas (soroconversão) entre as idades de 9 meses a 5 anos do que as crianças sem esse genótipo ($p < 0,0001$ para 9 meses, $p < 0,0001$ para 2 anos, $p = 0,0006$ para 5 anos).

As abordagens atuais para predição do DM1 visam principalmente triagens genéticas que permitam a identificação de marcadores fortemente associados à susceptibilidade ao DM1, com destaque para a genotipagem da classe II do HLA (DR-DQ), para a detecção de autoanticorpos ilhota-específicos e também para detecção de metabólitos provenientes da primeira fase da produção de insulina (peptídeo C). A partir dessa triagem, propõe-se que seja possível tanto silenciar o ataque diabetogênico por meio de intervenções terapêuticas nos estágios iniciais de destruição das células beta pancreáticas, promovendo um tratamento mais eficaz do DM1, como também, que seja possível a prevenção da exposição a gatilhos ambientes nos indivíduos com marcadores genéticos de risco identificados (BELLE; COPPIETERS; HERRATH, 2011; NÄNTÖ-SALONEN et al., 2008).

A identificação de diferenças genéticas entre crianças diagnosticadas antes dos 5 anos e após os 5 anos de idade poderá auxiliar no direcionamento das triagens e no emprego das terapias imunes. Enquanto a triagem para o genótipo de alto risco heterozigoto possivelmente poderá identificar indivíduos com rápida progressão e maior gravidade do DM1, sendo necessária uma intervenção imune direcionada e específica para esse padrão, a identificação de indivíduos com genótipos moderados e baixos poderá estar relacionada com um padrão responsivo melhor às terapias imunes, com elevados níveis de sucesso no tratamento, embora, exista uma maior contribuição de fatores ambientais e de outros genes não-HLA nesses indivíduos (NOBLE; VALDES, 2011).

Apesar do DM1 não possuir uma herança genética completa e da dificuldade em se determinar o início da destruição das células beta pancreáticas, o sucesso da prevenção depende, em primeiro lugar, de uma boa predição/identificação de indivíduos de risco e em segundo lugar, de intervenções seguras que não causem danos naqueles indivíduos que não desenvolverão o DM1 (BELLE; COPPIETERS; HERRATH, 2011). Nesse sentido, o presente estudo possibilitou um primeiro passo na predição futura do DM1 em crianças e adolescentes do RN, e, ainda que a triagem genética de HLA se apresente com elevado custo

para o emprego na rotina clínica no país, sua importância vem-se destacando, uma vez que estima-se que a incidência do DM1 dobrará em crianças com idade inferior a cinco anos até 2020 em todo o mundo (EURODIAB *Study Group*, 2009).

5 CONCLUSÕES

- Os alelos DRB1*03:01, *04:05, *04:01, *04:02; DQA1*03:01g, 05:01g; DQB1*02:01g, *03:02; os haplótipos DRB1*03:01-DQA1*05:01-DQB1*02:01, DRB1*04:05-DQA1*03:01g-DQB1*03:02, DRB1*04:02-DQA1*03:01g-DQB1*03:02, DRB1*04:01-DQA1*03:01g-DQB1*03:02 e o genótipo heterozigoto DR3-DQ2/DR4-DQ8 foram significativamente associados com a chance de desenvolvimento do DM1;
- Já os alelos DRB1*11:01, *15:03, *15:01, *13:01; DQA1*01:02, *04:01g; *01:03; DQB1*06:02, *03:01g, *06:03, *04:02; os haplótipos DRB1*11:01-DQA1*05:01-DQB1*03:01, DRB1*13:01-DQA1*01:03-DQB1*06:03 e o genótipo DRX-DQX/DRX-DQX, formado por outros haplótipos que não DR3-DQ2 ou DR4-DQ8 foram significativamente associados a proteção ao desenvolvimento do DM1;
- Estes resultados confirmam a forte contribuição genética da classe II do HLA (DR-DQ) para a susceptibilidade ao DM1 em uma população norterriograndense de crianças e adolescentes;
- Apesar da grande miscigenação racial brasileira, até em nível regional, estes resultados são semelhantes a maioria dos alelos, haplótipos e genótipos de HLA classe II relacionados à susceptibilidade ou proteção ao DM1, extensivamente descritos na literatura para a população caucasiana;
- Crianças com idade ao diagnóstico inferior a 5 anos de idade apresentaram significativamente maior frequência do genótipo heterozigoto DR3-DQ2/DR4-DQ8, formado pela combinação dos haplótipos de susceptibilidade HLA-DRB1*03-DQA1*05:01g-DQB1*02:01/DRB1*04-DQA1*03:01g-DQB1*03:02, quando comparada às crianças com idade ao diagnóstico superior a 5 anos de idade. A presença deste genótipo conferiu três vezes mais chances em desenvolver o DM1 antes dos 5 anos de idade do que aquelas com idade superior a 5 anos;
- Esses resultados demonstram também forte envolvimento do perfil genético da classe II do HLA para esta faixa etária, que estaria relacionada possivelmente com a gravidade e a rápida progressão para o início do DM1. Podendo ser empregado em triagens genéticas quer possibilitem a predição do DM1.

REFERÊNCIAS

- ABDUL-RASOUL, M.; HABIB, H.; AL-KHOULY, M. The honeymoon phase in children with type 1 diabetes mellitus: frequency, duration, and influential factors. **Pediatric Diabetes**, v. 7, n. 2, p.101-7, 2006.
- AHPD Project Report. 16th IHIW: Analysis of HLA Population Data, with updated results for 1996 to 2012 workshop data. **Int. J. Immunogenet.**, v. 40, n.1, p.21-30, 2013.
- ALVES, C.; SOUZA, T.; VEIGA, S.; ALVES, C.; TORALLES, M.B.; LEMAIRE, D. Importância do sistema de histocompatibilidade humano (HLA) em Pediatria. **Pediatria**, v.27, n.4, p.274-86, 2005.
- ALVES, C.; MEYER, I.; VIEIRA, N.; TORALLES, M. B. P.; LEMAIRE, D. Distribuição e frequência de alelos e haplótipos HLA em brasileiros com diabetes melito tipo 1. **Arq. Bras. Endocrinol. Metabol.**, v. 50, n. 3, p. 436-444, 2006.
- ALVES, C.; VEIGA, S.; TORALLES, M. B. P.; LOPES, A. C. V.O papel do complexo principal de histocompatibilidade na fisiologia da gravidez e na patogênese de complicações obstétricas. **Rev. Bras. Saude Mater. Infant.**, v. 7, n. 4, p. 357-63, 2007.
- ALVES, L. I.; DAVINI, E.; CORREIA, M. R.; FUKUI, R. T.; SANTOS, R. F.; CUNHA, M. R.; ROCHA, D. M.; VOLPINI, W. M. G.; SILVA, M. E. R. Autoantibodies and High-Risk HLA Susceptibility Markers in First-Degree Relatives of Brazilian Patients with Type 1 Diabetes Mellitus: A Progression to Disease Based Study. **J. Clin. Immunol.** v. 32, n. 4, p.778-85, 2012.
- ALY, T.A.; IDE, A.; JAHROMI, M.M.; BARKER, J.M.; FERNANDO, M.S.; BABU, S.R.; YU, L.; MIAO, D.; ERLICH, H.A.; FAIN, P.R.; BARRIGA, K.J.; NORRIS, J.M.; REWERS, M.J.; EISENBARTH, G.S. Extreme genetic risk for type 1A diabetes. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 103, n. 38, p. 14074-14079, 2006.
- AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Standards of Medical Care in Diabetes-2013. **Diabetes Care**, v. 36, s. 1, p. S11-S66, 2013.
- ANDERSEN, M. K.; LUNDGREN, V.; TURUNEN, J. A.; FORSBLOM, C.; ISOMAA, B.; GROOP, P. H.; GROOP, L.; TUOMI, T. Latent autoimmune diabetes in adults differs genetically from classical type 1 diabetes diagnosed after the age of 35 years. **Diabetes Care**, v. 33, n. 9, p. 2062-4, 2010.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE EMPRESAS DE PESQUISA (ABEP). **Critério de Classificação Econômica Brasil**. Disponível em <<http://www.abep.org/novo/Content.aspx?ContentID=301&SectionCode=TUDO>>. Acesso em: 01. maio. 2011.
- AWA, W. L.; BOEHM, B. O.; KAPPELLEN, T.; RAMI, B.; RUPPRATH, P.; MARG, W.; BECKER, M.; HOLL, R. W.; DPV-WISS Study Group and the German Competence

Network Diabetes Mellitus. HLA-DR genotypes influence age at disease onset in children and juveniles with type 1 diabetes mellitus. **Eur. J. Endocrinol.**, v. 163, n. 1, p. 97-104, 2010.

BEGOVICH, A. B.; MOONSAMY, P. V.; MACK, S. J.; BARCELLOS, L. F.; STEINER, L. L.; GRAMS, S.; SURAJ-BAKER, V.; HOLLENBACH, J.; TRACHTENBERG, E.; LOUIE, L.; ZIMMERMAN, P.; HILL, A. V.; STONEKING, M.; SASAZUKI, T.; KONENKOV, V. I.; SARTAKOVA, M. L.; TITANJI, V. P.; RICKARDS, O.; KLITZ, W. Genetic variability and linkage disequilibrium within the HLA-DP region: analysis of 15 different populations. **Tissue Antigens**, v. 57, n. 5, p. 424-39, maio. 2001. Erratum in: **Tissue Antigens**, v. 58, n. 6, p. 431, 2001.

BENDING, D.; ZACCONE, P.; COOKE, A. Inflammation and type one diabetes. **Int. Immunol.**, v. 24, n. 6, p. 339-46, 2012.

BIROS, E.; JORDAN, M. A.; BAXTER, A. G. Genes Mediating Environment Interactions in Type 1 Diabetes. **Rev. Diabet. Stud.**, v.2, n.4, p.192-207. 2005.

BLOMHOFF, A.; OLSSON, M.; JOHANSSON, S.; AKSELSEN, H. E.; POCIOT, F.; NERUP, J.; KOCKUM, I. Linkage disequilibrium and haplotype blocks in the MHC vary in an HLA haplotype specific manner assessed mainly by DRB1 * 03 and DRB1 * 04 haplotypes. **Genes Immun.**, v.7, n. 2, p.130-140, 2006.

BORCHERS, A. T; UIBO, R.; GERSHWIN, M.E. The geoepidemiology of type 1 diabetes. **Autoimmun. Rev.**, v. 9, p. A355–A365. 2010.

BOGNANOVIC, R. Diabetic nephropathy in children and adolescents, **Pediatr. Nephrol.**, v. 23, p. 507-525, 2008.

BRANDAO, L. C. A.; VATTA, S.; GUIMARAES, R.; SEGAT, L.; ARAUJO, J.; LIMA FILHO, J. L.; ARRAES, L. C.; E, A, NOT, T.; CROVELLA, S. Rapid genetic screening for major human leukocyte antigen risk haplotypes in patients with type 1 diabetes from Northeastern Brazil. **Hum. Immunology**, v. 71, p. 277–280, 2010.

CAMPBELL, R. D.; TROWSDALE, J. Map of the human MHC. **Immunol. Today**, v. 14, n. 7, p. 349-52, 1993.

CAMPOS, J. J. B.; ALMEIDA, H. G.; IOCHIDA, L.C.; FRANCO, L. J. Incidência de Diabetes Mellitus Insulino-Dependente (Tipo 1) na cidade de Londrina, PR, Brasil. **Arq. Bras. Endocrinol. Metabol.**, v. 42, n. 1, p. 36-44, 1998.

CASTELLI, E. C.; MENDES-JUNIOR, C. T.; VEIGA-CASTELLI, L. C.; PEREIRA, N. F.; PETZL-ERLER, M. L.; DONADI, E. A. Evaluation of computational methods for the reconstruction of HLA haplotypes. **Tissue Antigens**, v. 76, n. 6, p. 59-66, 2010.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). National diabetes fact sheet: national estimates and general information on diabetes and prediabetes in the United States, 2011. Department of Health and Human Services, Atlanta, U.S, 2011.

CERIELLO, A. et al. Effect of acute hyperglycaemia, long-term glycaemic control and insulin on endothelial dysfunction and inflammation in Type 1 diabetic patients with different characteristics, **Diabetic Medicine**, v. 27, p. 911-917, 2010.

CHEN, J. J.; THOMSON, G. The variance for the disequilibrium coefficient in the individual Hardy-Weinberg test. **Biometrics**, v. 55, n. 4, p. 1269-72, 1999.

CHO, Y. H. et al. Microvascular complications assessment in adolescents with 2-to 5-yr duration of type 1 diabetes from 1990 to 2006, **Pediatric Diabetes**, v. 12, p. 682-689, 2011.

CIFUENTES, R. A.; ROJAS-VILLARRAGA, A.; ANAYA, J. Human leukocyte antigen class II and type 1 diabetes in Latin America: A combined meta-analysis of association and family-based studies. **Hum. Immunology**, v. 72, p. 581-586, 2011.

CNOP, M.; WELSH, N.; JONAS, J.; JÖRNS, A.; LENZEN, S.; EIZIRIK, D. L. Mechanisms of pancreatic β -cell death in type 1 and type 2 diabetes. **Diabetes**, v. 54, n. 2, p. 97-107, 2005.

CANO, P.; KLITZ, W.; MACK, S. J.; MAIERS, M.; MARSH, S. G.; NOREEN, H.; REED, E. F.; SENITZER, D.; SETTERHOLM, M.; SMITH, A.; FERNÁNDEZ-VIÑA, M. Common and well-documented HLA alleles: report of the Ad-Hoc committee of the American Society for Histocompatibility and Immunogenetics. **Hum. Immunol.**, v. 68, n. 5, p. 392-417, 2007.

COPPIETERS, K.T.; BOETTLER, T.; VON HERRATH, M. Virus infections in type 1 diabetes. **Cold Spring Harb. Perspect. Med.**, v. 2, n. 1, p. 1-14, 2012.

CULINA, S.; BREZAR, V.; MALLONE, R. Mechanisms in endocrinology: Insulin and type 1 diabetes: immune connections. **Eur. J. Endocrinol.**, v. 168, n. 2, p. R19-31, 2013.

DANG, M. N.; BUZZETTI, R.; POZZILLI, P. Epigenetics in autoimmune diseases with focus on type 1 diabetes. **Diabetes Metab. Res. Rev.**, v. 29, n. 1, p. 8-18, 2013.

DABELEA, D.; BELL, R. A.; D'AGOSTINO, R. B. JR.; IMPERATORE, G.; JOHANSEN, J.M.; LINDER, B.; LIU, L.L.; LOOTS, B.; MARCOVINA, S.; MAYER-DAVIS E.J.; PETTITT, D.J.; WAITZFELDER, B. Incidence of diabetes in youth in the United States. **JAMA**, v. 297, p. 2716-24, 2007.

DCCT Research Group. Effect of intensive diabetes treatment on the development and progression of long-term complications in adolescents with insulin-dependent diabetes mellitus: Diabetes control and complications trial, **N. Engl. J. Med.**, v. 329, p. 977-986, 1993.

DECOCHEZ, K.; DE LEEUW, I. H.; KEYMEULEN, B.; MATHIEU, C.; ROTTIERS, R.; WEETS, I.; VANDEMEULEBROUCKE, E.; TRUYEN, I.; KAUFMAN, L.; SCHUIT, F. C.; PIPELEERS, D. G.; GORUS, F. K. IA-2 autoantibodies predict impending type I diabetes in siblings of patients. **Diabetologia**, v. 45, n. 12, p. 1658-66, 2002.

DEZSOFI, A.; SZEBENI, B.; HERMANN, C. S.; KAPITÁNY, A.; VERES, G.; SIPKA, S.; KÖRNER, A.; MADÁCSY, L.; KORPONAY-SZABÓ, I.; RAJCZY, K.; ARATÓ, A. Frequencies of genetic polymorphisms of TLR4 and CD14 and of HLA-DQ genotypes in children with celiac disease, type 1 diabetes mellitus, or both. **J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.**, v. 47, n. 3, p. 283-7, 2008.

DIAMOND Project Group. Incidence and trends of childhood Type 1 diabetes worldwide 1990–1999. **Diabetic Medicine**, v. 23, n. 8, p. 857–866, 2006.

EI WAFAI, R. J.; CHMAISSE, H. N.; MAKKI, R. F.; FAKHOURY, H. Association of HLA class II alleles and CTLA-4 polymorphism with type 1 diabetes. **Saudi J. Kidney Dis. Transpl.**, v. 22, n. 2, p.273-81, 2011.

EISENBARTH. Banting Lecture 2009: An Unfinished Journey: Molecular Pathogenesis to Prevention of Type 1A Diabetes. **Diabetes**, v.59, n. 4, p.759-74.

EPPENS, M. C.; CRAIG, M. E.; CUSUMANO, J.; HING, S.; CHAN, A. K. F.; HOWARD, N. J.; SILINK, M.; DONAGHUE, K. C. Prevalence of diabetes complications in adolescents with type 2 compared with type 1 diabetes. **Diabetes Care**, v. 29, n.6, p. 1300-6, 2006.

ERLICH, H.; VALDES, A. M.; NOBLE, J.; CARLSON, J. A.; VARNEY, M. CONCANNON, P. HLA DR-DQ haplotypes and genotypes and type 1 diabetes risk: Analysis of the type 1 diabetes genetics consortium families. **Diabetes**, v. 57, p. 1084–92, 2008.

EURODIAB ACE Study Group. Variation and trends in incidence of childhood diabetes in Europe. **Lancet**, v. 355, n. 9207, p. 873-6, 2011.

EXCOFFIER, L. G. L.; SCHNEIDER, S. Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. **Evolutionary Bioinformatics Online**, v.1; p. 47-50, 2005.

EXCOFFIER, L.; SLATKIN, M. Maximum-likelihood estimation of molecular haplotype frequencies in a diploid population. **Mol. Biol. Evol.**, v.12, n. 5, p. 921-7, 1995.

SLATKIN, M.; EXCOFFIER, L. Testing for linkage disequilibrium in genotypic data using the Expectation-Maximization algorithm. **Heredity** (Edinb), v. 76, Pt 4, p. 377-83, 1996.

FAULKNER, M. S.; CHANG, L. Family influence in self-care, quality of life, and metabolic control in school-age children and adolescents with type 1 diabetes. **J. Pediatr. Nurs.**, v. 22, n. 1, p. 59-68, 2007.

FENDLER, W.; KLICH, I.; CIEŚLIK-HEINRICH, A.; WYKA, K.; SZADKOWSKA, A.; MŁYNARSKI, W. Increased risk of type 1 diabetes in Polish children - association with INS-IGF2 5'VNTR and lack of association with HLA haplotype. **Endokrynol. Pol.**, v. 62, n. 5, p. 436-42, 2011.

FERNANDES, A. P. M.; LOUZADA, J. R. P.; FOSS, M.C.; DONADI, E.A. HLA-DRB1, -DQB1, and -DQA1 allele profile in Brazilian patients with type 1 diabetes mellitus. **Ann. NY Acad. Sci.**, v. 958, p. 305-8, 2002.

FERNANDES, A. P. M.; PACE, A. E.; ZANETTI, M. L.; FOSS, M. C.; DONADI, E. A. Fatores imunogenéticos associados ao Diabetes mellitus do tipo 1. **Rev. Latino-Am. Enfermagem**, Ribeirão Preto, v. 13, n. 5, p. 743-749, 2005.

FERREIRA, S. R.; FRANCO, L. J.; VIVOLO, M. A.; NEGRATO, C. A.; SIMOES, A. C.; VENTURELI, C. R. Population-based incidence of IDDM in the state of São Paulo, Brazil. **Diabetes Care**, v.16. p. 701-704, 1993.

FORLENZA, G. P.; REWERS, M. The epidemic of type 1 diabetes: what is it telling us?. **Cur. Opin. in Endoc. Diab. and Obes.**, v.18, n. 4., p. 248-51, 2011.

GILLESPIE, K. M.; GALE, E. A.; BINGLEY, P. J. High familial risk and genetic susceptibility in early onset childhood diabetes. **Diabetes**, v. 51, n.1, p. 210-4, 2002.

GILLESPIE, K. M.; BAIN, S. C.; BARNETT, A. H.; BINGLEY, P. J.; CHRISTIE, M. R.; GILL, G. V.; GALE, E. A. M. The rising incidence of childhood type 1 diabetes and reduced contribution of high-risk HLA haplotypes. **Lancet**, v.364, n.9446, p. 1699-700, 2004.

GOMES, M. B.; CORAL, M.; COBAS, R. A. DIB, S. A; CANANI, L. H.; NERY, M.; FREITAS, M. C. F.; FARIA, M.; FELICIO, J. S.; SILVA S. C.; PEDROSA, H.; FORTI, AC.; REA, R. R.; PIRES, A. C.; MONTENEGRO JUNIOR, R.; OLIVEIRA, J. E.; RASSI, N.; NEGRATO, C.A. Prevalence of adults with type 1 diabetes who meet the goals of care in daily clinical practice: A nationwide multicenter study in Brazil. **Diabetes Research and Clinical Practice**. In Press, 2012.

GORODEZKY, C.; ALAEZ, C.; MURGUÍA, A.; RODRÍGUEZ, A.; BALLADARES, S.; VAZQUEZ, M.; FLORES, H.; ROBLES, C. HLA and autoimmune diseases: type 1 diabetes (T1D) as an example. **Autoimmun. Rev.**, v. 5, p. 187-194, 2006.

GUCE, A. I.; MORTIMER, S. E.; YOON, T.; PAINTER, C. A.; JIANG, W.; MELLINS, E. D.; STERN, L. J. HLA-DO acts as a substrate mimic to inhibit HLA-DM by a competitive mechanism. **Nat. Struct. Mol. Biol.**, v.20, n.1, p. 90-8, 2013.

GUÉRIN, V.; LÉNIAUD, L.; PÉDRON, B.; GUILMIN-CRÉPON, S.; TUBIANA-RUFI, N.; STERKERS, G. HLA-associated genetic resistance and susceptibility to type I diabetes in French North Africans and French natives. **Tissue antigens**, v.70, n.3, p.214-8, 2007.

GUO, S.W.; THOMPSON, E.A. Performing the exact test of hardy-weinberg proportion for multiple alleles. **Biometrics**, v. 48, p. 361-372, 1992.

HARDY, G. H. Mendelian proportions in a mixed population. **Science**, v. 28, n. 706, p. 49–50, 1908.

HARJUTSALO, V.; SJÖBERG, L.; TUOMILEHTO, J. Time trends in the incidence of type 1 diabetes in Finnish children: a cohort study. **Lancet**, v. 371, n. 9626, p. 1777-82, 2008.

HATHOUT, E. H.; HARTWICK, N.; FAGOAGA, O. R.; COLACINO, A. R.; SHARKEY, J.; RACINE, M.; NELSEN-CANNARELLA, S.; MACE, J. W. Clinical, autoimmune, and HLA characteristics of children diagnosed with type 1 diabetes before 5 years of age. **Pediatrics**, v.111, n. 4, p. 860-3, 2003.

HOWSON, J. M.; WALKER, N. M.; SMYTH, D. J.; TODD, J. A. Type I Diabetes Genetics Consortium. Analysis of 19 genes for association with type I diabetes in the Type I Diabetes Genetics Consortium families. **Genes Immun.**, v. 10, s.1, p. S74-84, 2009.

HU, CY; ALLEN, M.; CHUANG, L. M.; LIN, B. J.; GYLLENSTEN, U. Association of insulin-dependent diabetes mellitus in Taiwan with HLA class II DQB1 and DRB1 alleles. **Hum Immunol.**, v. 38, n.2, p. 105-14, 1993.

HUMMEL, M.; BONIFACIO, E.; NASERKE, H. E.; ZIEGLER, A. G. Elimination of dietary gluten does not reduce titers of type 1 diabetes-associated autoantibodies in high-risk subjects. **Diabetes Care**, v. 25, n. 7, p.1111-6, 2002.

HYTTINEN, V.; KAPRIO, J.; KINNUNEN, L.; KOSKENVUO, M.; TUOMILEHTO, J. Genetic liability of type 1 diabetes and the onset age among 22,650 young Finnish twin pairs: a nationwide follow-up study. **Diabetes**, v. 52, n. 4, p.1052-5, 2003.

IMGT/HLA Database. Disponível em < <http://www.ebi.ac.uk/ipd/imgt/hla/stats.html> > Acesso em: jan. 2013.

IZAABEL, H.; GARCHON, H. J.; CAILLAT-ZUCMAN, S.; BEURAIN, G.; AKHAYAT, O.; BACH, J. F.; SANCHEZ-MAZAS, A. HLA class II DNA polymorphism in a Moroccan population from the Souss, Agadir area. **Tissue Antigens**, v.51, n.1, p. 106-10, 1998.

JAÏDANE, H.; SANÉ, F.; HIAR, R.; GOFFARD, A.; GHARBI, J.; GEENEN, V.; HOBER, D. Immunology in the clinic review series; focus on type 1 diabetes and viruses: enterovirus, thymus and type 1 diabetes pathogenesis. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 168, n. 1, p. 39-46, 2012.

JAPANESE Study Group of Insulin Therapy for Childhood and Adolescent Diabetes (JSGIT). HLA-class II and class I genotypes among Japanese children with Type 1A diabetes and their families. **Pediatr. Diabetes**, v.13, n. 1, p. 33-44, 2012.

JEKER, L.T.; BOUR-JORDAN, H.; BLUESTONE, J. A. Breakdown in peripheral tolerance in type 1 diabetes in mice and humans. **Cold Spring Harb. Perspect. Med.**, v. 2, n. 3, p.1-20, 2012.

JONES, E. Y.; FUGGER, L.; STROMINGER, J. L.; SIEBOLD, C. MHC class II proteins and disease: a structural perspective. **Nat. Rev. Immunol.**, v.6, p. 271-282, 2006.

KANTÁROVÁ, D.;BUC, M. Genetic Susceptibility to Type 1 Diabetes Mellitus in Humans. **Physiol. Res.**, v.56, p. 255-266, 2007.

KATZUNG, B. G. **Farmacologia básica e clínica**. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 579-597. 2005.

KELLY, M. A.; RAYNER, M. L.; MIJOVIC, C. H.; BARNETT, A. H. Molecular aspects of type 1 diabetes. **Mol. Pathol.**, v. 56, n. 1, p. 1-10, 2003.

KENT, S. C.; CHEN, Y.; BREGOLI, L.; CLEMMINGS, S. M. ; KENYON, N. S.; RICORDI, C.; HERING, B. J.; HAFLER, D. A. Expanded T cells from pancreatic lymph nodes of type 1 diabetic subjects recognize an insulin epitope. **Nature.**, v. 435, n. 7039, p. 224-8, 2005.

KESKIN, M.; AYGÜN, A.; PEHLIVAN, S.; KESKIN, Ö.; KOR, Y.; BALAT, A.; COŞKUN, Y. Trends in the Frequency of HLA DR-DQ Haplotypes Among Children and Adolescents

with Type 1 Diabetes Mellitus in the Southeast Region of Turkey. **J. Clin. Res. Pediatr. Endocrinol.**, v.4, n. 4, p. 189–192, 2012.

KOMULAINEN, J.; KULMALA, P.; SAVOLA, K.; LOUNAMAA, R.; ILONEN, J.; REIJONEN, H.; KNIP, M.; AKERBLUM, H. K. Clinical, autoimmune, and genetic characteristics of very young children with type 1 diabetes. Childhood Diabetes in Finland (DiMe) Study Group. **Diabetes Care**, v. 22, n. 12, p. 1950-5, 1999.

LAMBERT, A. P.; GILLESPIE, K. M.; THOMSON, G.; CORDELL, H. J.; TODD, J. A.; GALE, E. A.; BINGLEY, P. J. Absolute risk of childhood onset type 1 diabetes defined by human leukocyte antigen class II genotype: a population–base in the United Kingdom. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 89, n 8, p. 4037-43, 2004.

LAMPIS, R.; MORELLI, L.; CONGIA, M.; MACIS, M. D.; MULARGIA, A.; LODDO, M.; DE VIRGILIIS, S.; MARROSU, M. G.; TODD, J. A.; CUCCA, F. The inter regional distribution of HLA class II haplotypes indicates the suitability of the Sardinian population for case-control association studies in complex diseases. **Hum. Mol. Genet.**, v. 9, n. 20, p. 2959-65, 2000.

LEE, K. H.; WUCHERPFENNIG, K. W.; WILEY, D. C. Structure of a human insulin peptide – HLA-DQ8 complex and susceptibility to type 1 diabetes. **Nature immunology**, v. 2, n. 6, p. 501–507, 2001.

LEHUEN, A.; DIANA, J.; ZACCONE, P.; COOKE, A. Immune cell crosstalk in type 1 diabetes. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 10, n. 7, p. 501-13, 2010.

LINS, T. C.; VIEIRA, R. G.; ABREU, B. S.; GRATTAPAGLIA, D.; PEREIRA, R. W. Genetic composition of Brazilian population samples based on a set of twenty-eight ancestry informative SNPs. **Am. J. Hum. Biol.**, v. 22, n. 2, p. 187–92, maio/abr. 2010.

LISBOA, H. R.; GRAEBIN, R.; BUTZKE, L.; RODRIGUES, C. S. Incidence of diabetes type 1 in Passo Fundo, RS, Brazil. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 31, n. 12, p. 1553-6, 1998.

MAHMUD, F. H.; VAN UUM, S. V.; KANJI, N.; THIESSEN-PHILBROOK, H.; CLARSON, C. L. Impaired endothelial function in adolescents with type 1 diabetes mellitus. **J. Pediatr.**, v. 152, p. 557-562, 2008.

MANAN, H.; ANGHAM, A. M.; SITELBANAT, A. Genetic and diabetic auto-antibody markers in Saudi children with type 1 diabetes. **Hum. Immunol.**, v. 71, n. 12, p. 1238-42, 2010.

MARSH, S.G. E.; ALBERT, E. D.; BODMER, W. F.; BONTROP, R. E.; DUPONT, B.; ERLICH, H. A.; FERNÁNDEZ-VINA, M.; GERAGHTY, D. E.; HOLDSWORTH, R.; HURLEY, C. K.; LAU, M.; LEE, K. W.; MACH, B.; MAYR, W. R.; MAIERS, M.; MÜLLER, C. R.; PARHAM, P.; PETERSDORF, E. W.; SASAZUKI, T.; STROMINGER, J. L.; SVEJGAARD, A.; TERASAKI, P. I.; TIERCY, J. M.; TROWSDALE, J. Nomenclature for Factors of the HLA System, 2010. **Tissue Antigens**, v. 75, p. 291-455, 2010.

MEHRA, N. K.; KAUR, G. K. MHC-based vaccination approaches: progress and perspectives. **Expert. Ver. Mol. Med.**, v. 5, n.7, p.1-17, 2003.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico. Brasília, disponível em <
http://portalsaude.saude.gov.br/portalsaude/arquivos/pdf/2012/Mai/09/Vigitel_2011_diabetes_final.pdf> Acesso em: 29 de maio de 2012.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Cadernos de Atenção Básica. Diabetes mellitus. Normas e Manuais Técnicos. Brasília, v. 16, p. 64, 2006.

MOHAN, J. F.; PETZOLD, S. J.; UNANUE, E. R. Register shifting of an insulin peptide–MHC complex allows diabetogenic T cells to escape thymic deletion. **J. Exp. Med.**, v. 208, n. 12, p. 2375–2383, 2011.

MOSAAD, Y. M.; AUF, F. A.; METWALLY, S. S.; ELSHARKAWY, A. A.; EL-HAWARY, A. K.; HASSAN, R.; TAWHID, Z.; EL-CHENNAWI, F. A. HLA-DQB1* alleles and genetic susceptibility to type 1 diabetes mellitus. **World. J. Diabetes.**, v. 3, n. 8, p. 149–155, 2012.

MUHAMMAD, B.J.; SWIFT, P.G.; RAYMOND, N.T.; BOTHA, J.L. Partial remission phase of diabetes in children younger than age 10 years. **Arch. Dis. Child.**, v. 80, n.4, p. 367-9, 1999.

NÄNTÖ-SALONEN, K.; KUPILA, A.; SIMELL, S. et al. Nasal insulin to prevent type 1 diabetes in children with HLA genotypes and autoantibodies conferring increased risk of disease: a double-blind, randomised controlled trial. **Lancet**, v. 372, p. 1746–55, 2008.

NEGRATO, C.A.; DIAS, J.P.; TEIXEIRA, M. F.; DIAS, A.; SALGADO, M. H.; LAURIS, J. R.; MONTENEGRO, R. M. JR.; GOMES, M. B.; JOVANOVIC, L. Temporal trends in incidence of type 1 diabetes between 1986 and 2006 in Brazil. **J. Endocrinol. Invest.**, v. 33, p. 373–7, 2010.

NEI, M. Molecular evolutionary genetics. Columbia University Press, New York. 1987.

NEJENTSEV, S.; SMINK, L. J.; SMYTH, D.; BAILEY, R.; LOWE, C. E.; PAYNE, F.; MASTERS, J.; L. GODFREY, LAM, A.; BURREN, O.; STEVENS, H.; NUTLAND, S.; WALKER, N. M.; SMITH, A.; TWELLS, R.; BARRATT, B. J.; WRIGHT, C.; FRENCH, L.; CHEN, Y.; DELOUKAS, P.; ROGERS, J.; DUNHAM, I.; TODD, J. A. Sequencing and association analysis of the type 1 diabetes – linked region on chromosome 10p12-q11. **BMC Genet.**, v, 8, n. 24. 2007.

NEVILLE, R. F; SIDAWY, A. N. Diabetes mellitus presents one of the most serious health problems in the United States and around the world. Introduction. **Semin. Vasc. Surg.**, v.25, n. 2, p.59-60, 2012.

NOBLE, J. A.; ERLICH, H. A. Genetics of type 1 diabetes. **Cold Spring Harb. Perspect. Med.**, v. 2, n. 1, p.a007732, 2012.

NOBLE, J. A.; VALDES, A. M. Genetics of the HLA Region in the Prediction of Type 1 Diabetes. **Curr. Diab. Rep.**, v. 11, n. 6, p.533–542, 2011.

OKADA, H.; KUHN, C.; FEILLET, H.; BACH, J. F. The 'hygiene hypothesis' for autoimmune and allergic diseases: an update. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 160, n.1, p. 1–9, 2010.

OKRUSZKO, A.; SZEPIETOWSKA, B.; WAWRUSIEWICZ-KURYLONEK, N.; GÓRSKA, M.; KRĘTOWSKI, A.; SZELACHOWSKA, M. HLA-DR, HLA-DQB1 and PTPN22 gene polymorphism: association with age at onset for autoimmune diabetes. **Arch. Med. Sci.**, v. 8, n. 5, p. 874-8, 2012.

OLSEN, B. S.; SJOLE, A. K.; HOUGAARD, P.; JOHANNESSEN, J.; MARINELLI, K.; JACOBSEN, B. B.; MORTENSEN H. B. The significance of the puberal diabetes duration for the development of retinopathy and nephropathy in patients with type 1 diabetes. **J. Diabetes Complications**, v.18, p. 160-164, 2004.

ONG, K. L., CHEUNG B. M., WONG L. Y., WAT N. M., TAN K. C., LAM, K. S. Prevalence, treatment, and control of diagnosed diabetes in the US. National Health and Nutrition Examination Survey 1999-2004. **Ann. Epidemiol.**, v. 18, n. 3, p. 222-9, 2008.

PATTERSON, C.C.; DAHLQUIST, G.G.; GYURUS, E.; GREEN, A.; SOLTESZ, G; EURODIAB Study Group. Incidence trends for childhood type 1 diabetes in Europe during 1989-2003 and predicted new cases 2005-20: A multicentre prospective registration study. **Lancet**, v.373, p. 2027–2033, 2009.

PIHOKER, C.; GILLIAM, L. K.; HAMPE, C. S.; LERNMARK, A. Autoantibodies in diabetes. **Diabetes**, v.54, s. 2, p.52-61,2005.

POCIOT, F.; AKOLKAR, B.; CONCANNON, P.; ERLICH, H. A.; JULIER, C.; MORAHAN, G.; NIERRAS, C. R.; TODD, J. A.; RICH, S. S.; NERUP, J. Genetics of Type 1 Diabetes: What's Next? **Diabetes Journals**, v.59, n.7, p.1561-1571, 2010.

REGNÉLL, S. E.; LERNMARK, A. The environment and the origins of islet Autoimmunity and Type 1 diabetes. **Diabet. Med.**, v. 30, n. 2, p. 155-60, 2012.

ROSSETTI, P.; PAMPANELLI, S.; FANELLI, C.; PORCELLATI, F.; COSTA, E.; TORLONE, E.; SCIONTI, L.; BOLLI, G. B. Intensive replacement of basal insulin in patients with type 1 diabetes given rapid-acting insulin analog at mealtime. **Diabetes Care**, v.26, n. 5, p.1490-6, 2003.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D.W. In: **Molecular Cloning: A laboratory manual**. 3. ed. New York: ColdSpring Harbor Laboratory Press, 2001.

SARUHAN-DIRESKENELI, G.; UYAR, F. A.; BAS, F.; GÜNÖZ, H.; BUNDAK, R.; SAKA, N.; DARENDELILER, F. HLA-DR and -DQ associations with insulin-dependent diabetes mellitus in a population of Turkey. **Hum. Immunol.**, v. 61, n. 3, p. 296-302, 2000.

SAVAGE, E.; FARRELL, D.; McMANUS, V.; GREY, M. The science of intervention development for type 1 diabetes in childhood: systematic review. **J. Adv. Nurs.**, v. 66, n.12, p. 2604-19, 2010.

SAYAD, A.; AKBARI, M. T.; PAJOUHI, M.; MOSTAFAVI, F.; ZAMANI, M. The influence of the HLA-DRB, HLA-DQB and polymorphic positions of the HLA-DRβ1 and

- HLA-DQ β 1 molecules on risk of Iranian type 1 diabetes mellitus patients. **Int. J. Immunogenet.**, v. 39, n. 5, p. 429-36, 2012.
- SCHAFER, A. J.; HAWKINS, J. R. DNA variation and the future of human genetics. **Nat. Biotechnol.**, v.16, n. 1, p. 33-9, 1998.
- SCHNEIDER, S.; ROESSLI, D.; EXCOFFIER, L. Arlequin ver. 2.000: A software for population genetics data analysis. Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva: Geneva, Switzerland, 2000.
- SHAHID, S. M; NAWAB, S. N; SHAIKH, R; MAHBOOB, T. Glycemic control, dyslipidemia and endothelial dysfunction in coexisted diabetes, hypertension and nephropathy. **Pak. J. Pharm. Sci.**, v. 25, n. 1, p. 123-9, 2012
- SHAMIR, R.; KASSIS, H.; KAPLAN, M.; NAVEH, T.; SHEHADEH. N. Glycemic control in adolescents with type 1 diabetes mellitus improves lipid serum levels and oxidative stress, **Pediatric Diabetes**, v. 9, n. 2, p. 104-9, 2008.
- SKYLER, J. S. Immunomodulation for type 1 diabetes mellitus. **Int. J. Clin. Pract.**, v. 64, s.166, p.59-63, 2010.
- SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. **Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes**. Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes, 2009.
- STAYOUSSEF, M.; BENMANSOUR, J.; AL-IRHAYIM, A.; SAID, H. B.; RAYANA, C. B.; MAHJOUR, T.; ALMAWI, W. Y. Autoimmune Type 1 Diabetes Genetic Susceptibility Encoded by Human Leukocyte Antigen DRB1 and DQB1 Genes in Tunisia. **Clin. Vaccine Immunol.**, v.16, n.8, p. 1146–1150, 2009.
- STECK, A.K.; WONG, R.; WAGNER, B.; JOHNSON, K.; LIU, E.; ROMANOS, J.; WIJMEGA, C.; NORRIS, J. M.; EISENBARTH, G. S.; REWERS, M. J. Effects of non-HLA gene polymorphisms on development of islet autoimmunity and type 1 diabetes in a population with high-risk HLA-DR, DQ genotypes. **Diabetes**, v. 61, n. 3, p. 753-8, 2012.
- SVEJGAARD, A.; JERSILD, L.; STAUB-NIELSEN, L.; BODMER, W. F. HLA antigens and disease: statistical and genetical considerations. **Tissue Antigens**, v.4, p. 95–105, 1974.
- TEDDY Study Group. The Environmental Determinants of Diabetes in the Young (TEDDY): genetic criteria and international diabetes risk screening of 421 000 infants. **Pediatr. Diabetes**, v. 12, n. 8, p. 733-43, 2011.
- THE INTERNATIONAL HAPMAP PROJECT. INTERNATIONAL HAPMAP CONSORTIUM. **Nature**, v.426, n. 6968, p. 789-96, 2003.
- THOMSON, G.; VALDES, A. M.; NOBLE, J. A.; KOCKUM, I.; GROTE, M. N.; NAJMAN, J.; ERLICH, H. A.; CUCCA, F.; PUGLIESE, A.; STEENKISTE, A.; DORMAN, J. S.; CAILLAT-ZUCMAN, S.; HERMANN, R.; ILONEN, J.; LAMBERT, A. P.; BINGLEY, P. J.; GILLESPIE, K. M.; LERNMARK, A.; SANJEEVI, C. B.; RØNNINGEN, K. S.; UNDLIEN, D. E.; THORSBY, E.; PETRONE, A.; BUZZETTI, R.; KOELEMAN, B. P.; ROEP, B. O.; SARUHAN-DIRESKENELI, G.; UYAR, F. A.; GÜNOZ,

H.; GORODEZKY, C.; ALAEZ, C.; BOEHM, B. O.; MLYNARSKI, W.; IKEGAMI, H.; BERRINO, M.; FASANO, M. E.; DAMETTO, E.; ISRAEL, S.; BRAUTBAR, C.; SANTIAGO-CORTES, A.; FRAZER DE LLADO, T.; SHE, J. X.; BUGAWAN, T. L.; ROTTER, J. I.; RAFFEL, L.; ZEIDLER, A.; LEYVA-COBIAN, F.; HAWKINS, B. R.; CHAN, S. H.; CASTANO, L.; POCIOT, F.; NERUP, J. Relative predispositional effects of HLA class II DRB1-DQB1 haplotypes and genotypes on type 1 diabetes: ameta-analysis. **Tissue Antigens**, v. 70, n. 2, p. 110-27, 2007.

TODD, J. A. Etiology of Type 1 Diabetes. **Immunity**, v. 32, p.457- 467, 2010.

TOLLEFSEN S, HOTTA K, CHEN X, SIMONSEN B, SWAMINATHAN K, MATHEWS II, SOLLID LM, KIM CY. Structural and functional studies of trans-encoded HLA-DQ2.3 (DQA1*03:01/DQB1*02:01) protein molecule. **J. Biol. Chem.**, v. 287, n. 17, p. 13611-9, 2012.

TRINDADE, S. L. B. In: História do Rio Grande do Norte. Natal: Editora do IFRN, 2010. 281 p.

URURAHY, M. A. G.; LOUREIRO, M. B.; FREIRE-NETO, F. P.; SOUZA, K. S. C.; ZUHL, I.; BRANDÃO-NETO, J.; HIRATA, R. D. C.; DOI, S. Q.; ARRAIS, R. F.; HIRATA, M. H.; ALMEIDA, M. G.; REZENDE, A. A. Increased TLR2 expression in patients with type 1 diabetes: evidenced risk of microalbuminuria. **Pediatric Diabetes**, 2011. In press.

VALDES, A. M.; ERLICH, H. A.; CARLSON, J.; VARNEY, M.; MOONSAMY, P. V.; NOBLE, J. A. Use of class I and class II HLA loci for predicting age at onset of type 1 diabetes in multiple populations. **Diabetologia**, v. 55, n. 9, p. 2394-401, 2012.

VAN BELLE, T. L.; COPPIETERS, K. T.; VON HERRATH, M. G. Type 1 diabetes: etiology, immunology, and therapeutic strategies. **Physiol. Rev.**, v. 91, n.1, p. 79-118, 2011.

VIRTANEN, S. M.; NEVALAINEN, J.; KRONBERG-KIPPILÄ, C.; AHONEN, S.; TAPANAINEN, H.; UUSITALO, L.; TAKKINEN, H. M.; NIINISTÖ, S.; OVASKAINEN M. L.; KENWARD, M. G.; VEIJOLA, R.; IILONEN, J.; SIMELL, O.; KNIP, M. Food consumption and advanced β cell autoimmunity in young children with HLA-conferred susceptibility to type 1 diabetes: a nested case-control design. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 95, n. 2, p. 471-8, 2012.

VAN AUTREVE, J.E; WEETS, I.; GULBIS, B.; VERTONGEN, F.; GORUS, F. K.; VAN DER AUWERA, B. J. The rare HLA-DQA1*03-DQB1*02 haplotype confers susceptibility to type 1 diabetes in whites and is preferentially associated with early clinical disease onset in male subjects. **Hum. Immunology**, v. 65, n. 7, p. 729-36, 2004.

VAN LUMMEL, M.; VAN VEELLEN, P. A.; ZALDUMBIDE, A.; DE RU, A.; JANSSEN, G. M.; MOUSTAKAS, A. K.; PAPADOPOULOS, G. K.; DRIJFHOUT, J. W.; ROEP, B. O.; KONING, F. Type 1 diabetes-associated HLA-DQ8 transdimer accommodates a unique peptide repertoire. **J. Biol. Chem.**, p. 287, n. 12, p. 9514-24, 2012.

WITTKKE-THOMPSON, J. K.; PLUZHNIKOV, A.; COX, N. J. Rational inferences about

departures from Hardy-Weinberg equilibrium. **Am. J. Hum. Genet.**, v. 76, n.6, p. 967-86, 2005.

WHITING, D. R; GUARIGUATA, L; WEIL, C; SHAW, J. IDF diabetes atlas: global estimates of the prevalence of diabetes for 2011 and 2030. **Diabetes Res. Clin. Pract.**, v. 94, n. 3, p. 311-21, 2011.

WILLCOX, A.; RICHARDSON, S.J.; BONE, A.J.; FOULIS, A.K.; MORGAN, N.G. Analysis of islet inflammation in human type 1 diabetes. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 155, p.173–181, 2009.

WOOLF, B. On estimating the relation between blood group and disease. **Annals of Human Genetics**, London, v.19, n.4, p.251-253, 1955.

YOON, J. W. The role of viruses and environmental factors in the induction of diabetes. **Curr. Top. Microbiol. Immunol.**, v. 164, p. 95–123, 1990;

ZIEGLER A.G.; BONIFACIO, E.; BABYDIAB-BABYDIET STUDY GROUP. Age-related islet autoantibody incidence in offspring of patients with type 1 diabetes. **Diabetologia.**, v. 55, p. 7, n. 1937-43, 2012.

ZIEGLER, A.G.; PFLUEGER, M.; WINKLER, C.; ACHENBACH, P.; AKOLKAR, B.; KRISCHER, J.P.; BONIFACIO, E. Accelerated progression from islet autoimmunity to diabetes is causing the escalating incidence of type 1 diabetes in young children. **J Autoimmun.**, v. 31, n.1, p. 3-7, 2011.

ZIEGLER, A.; VAN STEEN, K.; WELLEK, S. Investigating Hardy-Weinberg equilibrium in case-control or cohort studies or meta-analysis. **Breast Cancer Res. Treat.**, v. 128, n. 1, p. 197-201, 2011.

ZIPITIS, C. S.; AKOBENG, A. K. Vitamin D supplementation in early childhood and risk of type 1 diabetes: a systematic review and meta-analysis. **Arch. Dis. Child.**, v. 93, n. 6, p. 512– 527, 2008.



APÊNDICE A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE - UFRN
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Projeto de pesquisa: Estudo da associação dos genes HLA, TLR2, TLR4, MyD88 e de citocinas pró-inflamatórias com o diabetes tipo 1 e a nefropatia diabética.

Meu nome é Adriana Augusto de Rezende, sou professora da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN) e estou convidando seu filho (a) para participar do projeto de pesquisa que estou desenvolvendo com a equipe de Hospital de Pediatria Professor Heriberto Bezerra (HOSPED). A pesquisa está sendo realizada em colaboração com pesquisadores da Faculdade Ciências Farmacêuticas/USP. Esta pesquisa tem como objetivo avaliar as alterações bioquímicas e moleculares (DNA, RNA e proteínas) no sangue e na urina de pacientes com diabetes tipo 1 e indivíduos saudáveis. O DNA é uma substância que está dentro da célula e que herdamos de nossos pais e transmitimos aos nossos filhos. Estudaremos determinados “pedacinhos” desse DNA (cientificamente são chamados de genes), que podem estar relacionados com o surgimento do Diabetes tipo 1 e suas complicações. Determinaremos também, através do estudo do RNA e de proteínas (substâncias produzidas a partir da molécula de DNA), a expressão destes genes (ou seja, avaliaremos os compostos produzidos por estes pedacinhos de DNA). Caso você, responsável legal, e também a própria criança/adolescente aceitem que ela participe desta pesquisa, vamos coletar uma amostra de sangue (19 mL) e a amostra da primeira urina da manhã dessa criança/adolescente para realização dos testes genéticos e de dosagens bioquímicas. Além de seu filho (a), outras cento e noventa e nove crianças/adolescentes também participarão da pesquisa. Também será necessário que você, responsável legal, responda algumas perguntas sobre doenças existentes nos seus familiares, medicamentos que a criança/adolescente está tomando e outras informações relacionadas com a pesquisa.

O material biológico (DNA, RNA, proteína, soro e urina) obtido será armazenado no Laboratório de Biologia Molecular da Faculdade de Farmácia da UFRN sob a minha responsabilidade e para isto pedimos sua autorização. As amostras de DNA e RNA serão enviadas para São Paulo para realização das análises sob a responsabilidade do Professor Mario Hiroyuki Hirata. Após os testes, o paciente poderá ter acesso aos resultados através dos pesquisadores envolvidos.

Caso haja interesse de realizarmos futuras pesquisas entraremos em contato com você, e somente com sua autorização e a de seu filho (a), e a aprovação dos novos projetos no Comitê de Ética em Pesquisa realizaremos os estudos.

Serão assegurados:

Confidencialidade do estudo: Os registros da participação no estudo serão mantidos confidenciais. Eles serão guardados e somente os pesquisadores do Projeto terão acesso. Cada

pessoa participante receberá um número para ser utilizado na pesquisa. Se qualquer relatório ou artigo resultar deste trabalho, a identificação não será revelada.

Dano decorrente da pesquisa: Em qualquer momento, se o paciente tiver algum problema de saúde decorrente da pesquisa, será garantido atendimento médico na instituição.

Riscos inerentes da coleta: O risco a saúde será mínimo, por causa da coleta de sangue que pode formar uma mancha roxa (hematoma) no local da picada da agulha. Riscos esses que serão minimizados através de procedimentos de coleta cuidadosos.

Ressarcimento de despesas: O pesquisador será responsável pelo ressarcimento de eventuais despesas decorrentes da pesquisa.

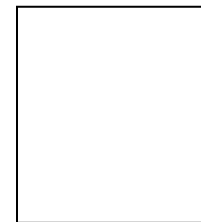
A participação neste estudo é totalmente voluntária, podendo recusar-se fazer parte do mesmo ou interromper se julgar conveniente, sem prejuízo para o andamento do trabalho de pesquisa. Caso você tenha alguma dúvida em relação à pesquisa pode entrar em contato com a **Profa. Dra. Adriana Augusto de Rezende** ou com o Dr. Ricardo Fernando Arrais, dentro da estrutura médico-hospitalar da HOSPED/UFRN a qualquer hora do dia (telefone:3215-4377).

Este projeto foi avaliado pelo Comitê de ética em pesquisa do HUOL/UFRN. Informações adicionais podem ser obtidas pelo telefone 3202-3719 ramal 276.

Consentimento para participação

Estou de acordo com a participação do estudo descrito acima. Fui devidamente esclarecido (a) quanto aos objetivos da pesquisa, aos procedimentos aos quais meu filho (a) será submetido (a). Foram garantidos esclarecimentos que eu venha a solicitar durante o curso da pesquisa e o direito de desistir a qualquer momento, sem que a desistência implique em qualquer prejuízo ao meu filho (a) ou à minha família. A participação na pesquisa não implicará em custos ou prejuízos adicionais, sejam eles de caráter econômico, social, psicológico ou moral. Foi garantido o anonimato, o sigilo dos dados referentes a identificação e o compromisso de que serei contactado (a) para avaliação de estudo futuro usando as amostras biológicas obtidas nesse instante.

Natal, ____ de _____ de 20 ____.



Responsável Legal do Participante

(Polegar Direito)

Pesquisador Responsável

Assinatura

APÊNDICE B – FICHA PARA COLETA DE DADOS INDIVIDUAIS

➤ Dados do paciente

Paciente N°:

Nome completo:

Registro ambulatorial N°:

Documento de identidade N°:

Sexo:

Data de nascimento:

Endereço:

N°

Bairro:

Cidade:

CEP:

Telefone:

Descendência:

Há quanto tempo é diabético?

Naturalidade

1) Possui alguma doença além do Diabetes mellitus tipo 1?

Paciente:

1. Sim () Qual: _____ 2. Não ()

Pai:

Mãe:

2) Toma medicamentos? Quais?

1. Sim () 2. Não ()

3) Pratica exercício aeróbico?

1. Sim () 2. Não ()

Qual frequência?

1. Mínima () 2. Leve () 3. Moderada () 4. Intensa ()

➤ Histórico familiar

1) Possui algum parente com:

1. Diabetes mellitus () 2. Obesidade () 3. Hipertensão ()

4. Doença cardiovascular () 5. Hipercolesterolemia () 6. Tireóide ()

7. Doença Óssea () 8. Não tem () 9. Não sabe ()

2) Quem? _____

➤ **Exames físicos**

Peso (Kg):

Altura (m):

IMC:

Pressão arterial (mmHg):

Dosagem de insulina:

Classificação de Tanner:

➤ **Classificação Econômica**

Posse de itens	Não tem	TEM (quantidade)			
		1	2	3	4
Televisores em cores	0	1	2	3	4
Videocassete/DVD	0	2	2	2	2
Rádios	0	1	2	3	4
Banheiros	0	4	5	6	7
Automóveis	0	4	7	9	9
Empregadas mensalistas	0	3	4	4	4
Máquinas de lavar	0	2	2	2	2
Geladeira	0	4	4	4	4
Freezer (*)	0	2	2	2	2

(*) Independente ou a 2ª porta da geladeira

Grau de Instrução do chefe da família

Nomenclatura antiga	Pontos	Nomenclatura atual
Analfabeto/Primário incompleto	0	Analfabeto/até 3ª série fundamental
Primário completo	1	4ª série fundamental
Ginasial completo	2	Fundamental completo
Colegial completo	4	Médio completo
Superior completo	8	Superior completo

Pontuação: _____

Classificação: _____

ANEXO 1 - PARECER CONSUBSTANCIADO FINAL DA AVALIAÇÃO DO PROJETO PELO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA UFRN



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DO HOSPITAL UNIVERSITÁRIO ONOFRE LOPES
(CEP-HUOL)

CERTIFICADO

O Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Onofre Lopes (CEP-HUOL), devidamente reconhecido pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP/MS), analisou o projeto:

Título: Estudo das associações dos genes HLA, TLR2, TLR4, MyD88 e de citocinas pró-inflamatórias com o diabetes tipo 1 e a nefropatia diabética.

Protocolo – 307/09.

Pesquisador Responsável: Adriana Augusto de Rezende.

Este projeto foi aprovado em seus aspectos éticos e metodológicos, incluindo o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido de acordo com as diretrizes da Resolução 196/96 e complementares do Conselho Nacional de Saúde, Ad Referendum. Toda e qualquer alteração no projeto/protocolo de pesquisa, assim como eventos adversos que venham a ocorrer deverão ser comunicados oficialmente e imediatamente ao CEP-HUOL. O relatório final do projeto ou a cópia de sua publicação deverá ser encaminhado ao CEP/HUOL após o término do estudo, conforme cronograma, com a respectiva cópia da folha de rosto.

Natal, 1 de Julho de 2009.

Dra. Maria Sanali Moura de O. Paiva
Coordenadora do CEP/HUOL

Maria Sanali M. de Oliveira Paiva
Coordenadora do CEP-HUOL

ANEXO 2 - PARECER CONSUBSTANCIADO DA COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA DO HOSPED



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE
HOSPITAL DE PEDIATRIA PROF. HERIBERTO BEZERRA
DEPARTAMENTO DE PEDIATRIA

Natal, 25 de maio de 2008.

PARECER

CP-HPHFB-PROJETO Nº. 55/2009

O Projeto de Pesquisa intitulado "Estudo das Associações dos genes HLA, TLR2, TLR4, MyD88 e de citocinas pró-inflamatórias com o diabetes tipo 1 e a nefropatia diabética", orientado pela Profª. Drª. Adriana Augusto de Rezende foi avaliado e cadastrado para execução dentro de estrutura do Hospital de Pediatria Prof. Heriberto Ferreira Bezerra sem restrições.

Análise do relator:

Projeto de grande importância para a caracterização genética de nossa população-alvo, e com possível benefício prático na condução da doença em nível individual. A colaboração de professores de renome nacional e internacional dá ampla sustentação à estrutura e desenvolvimento do estudo, que tem financiamento já garantido e certamente dará origem a material científico de qualidade para publicação em revistas de alto impacto, projetando o serviço e seus colaboradores, e qualificando ainda mais nossa estrutura como produtora de conhecimento acadêmico de ponta. Não visualizo pontos negativos no projeto.

O pesquisador deverá reportar-se ao Chefe do setor da enfermagem/ambulatório, que deverá ser previamente notificado sobre as atividades. Recomendamos que os acadêmicos envolvidos na realização do mesmo devam estar identificados por jaleco e crachá, bem como se apresentar ao chefe/plantonista do setor no dia em que forem realizar a pesquisa.

Solicitamos aos Responsáveis pela pesquisa que apresentem parecer da comissão de ética e informem à comissão o término, se possível com resultados e conclusão da mesma.

Atenciosamente,

Ricardo Fernando Arrais
Endocrinologia Pediátrica
CRM-RN 3737
175.838,00
Ricardo Fernando Arrais
Coordenador da Comissão

ANEXO 3 - PARECER CONSUBSTANCIADO DA COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA DO HOSPED



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE
HOSPITAL DE PEDIATRIA PROF. HERIBERTO BEZERRA
DEPARTAMENTO DE PEDIATRIA

Natal, 27 de março de 2012.

PARECER

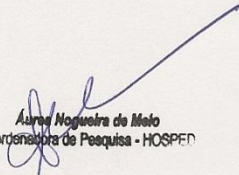
CP-HPHFB-PROJETO Nº 09/2012

O Projeto de Pesquisa intitulado “Estudo dos genes do complexo HLA associados à susceptibilidade ao DM1 e suas complicações”, coordenado pela Professora Adriana Rezende, foi avaliado e cadastrado para execução dentro de estrutura do Hospital de Pediatria Prof. Heriberto Ferreira Bezerra sem restrições, desde que aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa/UFRN.

O projeto apresentado está bem elaborado e abordará um tema relevante, não há pontos negativos a serem considerados, e apenas vantagens para a instituição e para os profissionais do setor.

Conclusão da Comissão: Favorável à execução do projeto.

Atenciosamente,


Áurea Nogueira de Melo
Coordenadora de Pesquisa - HOSPED

Áurea Nogueira de Melo
Coordenadora da Comissão de Pesquisa

ANEXO 4 - CRITÉRIO DE CLASSIFICAÇÃO ECONÔMICA BRASIL

Classe	Pontos	Renda média familiar
		Valor bruto em R\$ Ano base 2010
A1	42 - 46	12.926
A2	35 - 41	8.418
B1	29 - 34	4.418
B2	23 - 28	2.565
C1	18 - 22	1.541
C2	14 - 17	1.024
D	8 - 13	714
E	0 - 7	477

Fonte: ABEP - Associação Brasileira de Empresas de Pesquisa – 2012 – www.abep.org – abep@abep.org. Dados com base no Levantamento Sócio Econômico 2010 - IBOPE