

ASSOCIAÇÃO DOS ANTÍGENOS LEUCOCITÁRIOS HUMANOS COM O DIABETES MELLITUS TIPO 1

Cintia Semzezem

Graduada em Ciências Biológicas pelo Centro Universitário de Maringá - CESUMAR. E-mail: ci86_bio@hotmail.com

Alessandra Valéria de Oliveira

Docente Doutora do Curso de Ciências Biológicas do Centro Universitário de Maringá - CESUMAR. E-mail: alessoli@cesumar.br

RESUMO: O Diabetes Mellitus tipo 1 é uma doença autoimune, que tem como principal característica a deficiência de insulina, devido à destruição autoimune das células beta pancreáticas. Para desencadear o Diabetes Mellitus tipo 1 é necessário ter a predisposição genética e sofrer influências do meio ambiente. Essa predisposição genética está associada a diversos genes. Dentre eles, o sistema de histocompatibilidade humano (sistema de antígenos leucocitários humanos - HLA) de classe II merece destaque especial. Os genes do sistema HLA são importantes em transfusões sanguíneas e na genética de populações, no qual tem sido cada vez mais associado como um marcador genético envolvido na susceptibilidade de várias doenças. A associação do Diabetes Mellitus tipo 1 com o sistema HLA permite avaliar o risco que uma pessoa portadora de um antígeno ou alelo tem de desenvolver a doença, já que a patologia em questão tem se mostrado cada vez mais acentuada em países emergentes, causando impactos negativos e promovendo o ciclo vicioso da pobreza. Os antígenos e alelos que dão susceptibilidade para esta doença são detectados por métodos sorológicos e biologia molecular. Portanto, o objetivo deste trabalho foi indicar quais os genes candidatos que conferem predisposição para o Diabetes Mellitus tipo 1, além de mostrar a associação do sistema HLA com esta endocrinopatia e seus fatores ambientais.

PALAVRAS-CHAVE: Diabetes Mellitus; Doenças Autoimunes; Sistema HLA

HUMAN LEUKOCYTE ANTIGEN AND TYPE 1 DIABETES MELLITUS

ABSTRACT: The type 1 diabetes is an autoimmune disease, which main feature is the insulin deficiency due to auto-immune destruction of pancreatic beta cells. Type 1 diabetes is triggered by genetic predisposition and environmental influences. This genetic predisposition is associated with several genes. The human histocompatibility system (HLA) class II is among them, and deserves special attention. HLA system genes are important in blood transfusions and in genetics of populations, in which have been increasingly involved as a genetic marker involved in susceptibility to various diseases. The association of type 1 diabetes with the HLA System allows to assess the risk that a person carrying an antigen or allele has to develop the disease, since this pathology has been increasing in emerging countries, causing negative impacts and promoting the vicious cycle of poverty. The antigens and alleles that offer susceptibility for this disease are detected by serological methods and molecular biology. Therefore, the goal of this study was to indicate which genes show predisposition to type 1 diabetes mellitus, besides presenting the association of HLA system to this endocrinopathy and its environmental factors.

KEYWORDS: Diabetes Mellitus; Auto-Immune Diseases; Human Histocompatibility System (HLA).

INTRODUÇÃO

O Diabetes Mellitus tipo 1 é uma doença metabólica crônica que tem como principal característica a deficiência de insulina, causada pela destruição das células produtoras de insulina do pâncreas. Este processo, mediado pelo sistema imunológico, proporciona uma permanente hiperglicemia, sendo característico da patologia, havendo necessidade do portador administrar insulina artificial (BALDA; PACHECO-SILVA, 1999).

Conforme Ellis e Ballingall (1999), a predisposição genética ao Diabetes Mellitus tipo 1 é associada a múltiplos genes, dentre eles, o sistema de histocompatibilidade humano (HLA) de classe II, que merece destaque especial. Os genes de histocompatibilidade são denominados desta forma porque quando descobertos eram os genes principais que estavam relacionados com a rápida rejeição de tecidos transplantados entre animais de experimentação, particularmente os camundongos, cujo sistema chamado de H-2 encontra-se no *Major Histocompatibility Complex* (MHC).

O MHC humano representa o conjunto de mais de 200 genes, o qual inclui os genes responsáveis por codificar as moléculas de histocompatibilidade, sendo chamado de sistema de Antígenos Leucocitários Humanos (HLA). O sistema HLA localiza-se no braço curto do cromossomo 6, na posição 6p21.3 e, de acordo com sua estrutura molecular, função biológica e distribuição tecidual, eles podem ser reunidos em dois grupos de genes clássicos, denominados classe I (HLA-A, HLA-B e HLA-C) e II (HLA-DP, HLA-DQ e HLA-DR) (FERNANDES et al., 2003).

A região de classe I codifica as moléculas presentes praticamente em todas as células nucleadas e em plaquetas. Essas moléculas apresentam os peptídeos para os Linfócitos T CD8+ e interagem com as células Natural Killer na inibição da resposta imune. A região de classe II codifica moléculas presentes, principalmente na superfície de células imunocompetentes, incluindo macrófagos, células dendríticas, monócitos, linfócitos T ativados e linfócitos B, que realizam a função de apresentação de peptídeos para os linfócitos T CD4+. A região de classe III do MHC, não HLA, possui genes que codificam componentes do complemento (ALVES et al., 2005b).

Os locos do sistema HLA são altamente polimórficos por apresentarem uma ampla distribuição nas frequências alélicas, no qual o alelo mais comum possui uma frequência inferior a 99% (DONADI, 2000). Existem centenas de alelos em cada loco e as combinações ao acaso permitem uma acentuada variabilidade genotípica (polialelismo). Uma das possíveis explicações é de que o acentuado polimorfismo existe para garantir a sobrevivência das espécies (TURNER, 2004). Essa diversidade e polimorfismo dos genes do sistema HLA e sua participação na resposta imune fazem com que ele desempenhe um papel importante na patogenia de várias doenças autoimunes (KLEIN; SATO, 2000).

Estudos feitos por membros da Sociedade Brasileira de Diabetes indicam que essa doença tem aumentado nas últimas décadas com proporções epidêmicas. Porém, no Brasil, a última pesquisa ocorreu em 1988 e indicava uma prevalência média de 7,6% na população urbana entre 30 e 69 anos, e

mais 7,8% nessa mesma faixa etária com tolerância diminuída a glicose, ou seja, pré-diabetes.

É uma das doenças crônicas mais comuns entre crianças e adultos jovens. O Diabetes Mellitus tipo 1 pode se desenvolver em qualquer faixa etária, sendo mais frequente antes dos vinte anos de idade. A predisposição para o desenvolvimento desse tipo de diabetes em humanos e sua prevenção em modelos animais já é uma realidade. Assim, a detecção de determinados alelos HLA, principais marcadores imunogenéticos associados com a susceptibilidade ao Diabetes Mellitus tipo 1, pode ser realizada para avaliar o risco de desenvolvimento desta patologia, principalmente em indivíduos que apresentam história familiar da doença (FERNANDES et al., 2005).

Para a detecção dos antígenos e alelos do sistema HLA existem dois métodos: sorológico e/ou biologia molecular. O método sorológico clássico é a microlinfocitotoxicidade, proposto por Terasaki, que detecta os antígenos leucocitários através de citotoxicidade mediada por anticorpo e dependente do complemento. Outro método, que foi bastante utilizado na década de 80, é a cultura mista de linfócitos, que utiliza células com fenótipo conhecido para definir as especificidades do sistema HLA. Já as técnicas de biologia molecular são mais frequentes e atuais, por serem mais reprodutivas e específicas, sendo as mais empregadas: a *Sequence Specific Primers* (SSP) e *Sequence Specific Oligonucleotides Probes* (SSOP). Nestes casos, o DNA é amplificado pela reação em cadeia da polimerase (PCR) (ALVES et al., 2006).

Dessa forma, o objetivo do trabalho foi discutir a susceptibilidade genética da doença endócrina autoimune Diabetes Mellitus tipo 1, indicando quais os genes candidatos que conferem predisposição para o desenvolvimento desta patologia.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 DIABETES MELLITUS

O Diabetes Mellitus é um grupo de doenças metabólicas provenientes da falta ou incapacidade da insulina desempenhar sua função adequadamente, ocasionando alterações nos níveis glicêmicos e manifestando, assim, uma hiperglicemia. Os sintomas decorrentes de hiperglicemia acentuada incluem perda inexplicável de peso, polifagia, poliúria, polidipsia e infecções. Se a hiperglicemia já estiver na fase crônica pode haver danos, disfunções e falência de diversos órgãos (GROSS et al., 2002).

O diagnóstico do Diabetes é realizado mais comumente pelo exame "Glicemia de Jejum", que mede o nível de glicose em jejum. Este teste é realizado através do sangue venoso, e o resultado é considerado normal quando a taxa de glicose varia de 70 até 110mg/dl. Se o resultado ficar em torno de 110 a 125mg/dl, o indivíduo possui glicemia de jejum inapropriada. Assim, é importante fazer um novo exame, conhecido por "Teste Oral de Tolerância à Glicose". Para a confirmação de um caso positivo para o Diabetes Mellitus, o resultado deve ser igual ou acima de 126 mg/dl em pelo menos dois exames consecutivos, ou ainda, se a glicemia for superior a 140 mg/dl, sendo recolhida em qualquer hora do dia, já se confirma o

diagnóstico para a doença (FERRAZ, 2008).

Há 70 anos, um antropólogo de Nova York (EUA), Dupertius, empregou pela primeira vez os termos *Diabetes Mellitus* tipo 1 e *Diabetes Mellitus* tipo 2, a partir dos fenótipos que os pacientes apresentavam. Os primeiros eram bem mais magros e mais jovens do que os integrantes do tipo 2 (DIB; TSCHIEDEL; NERY, 2008). A Associação Americana de Diabetes relatou que existem cerca de 57 classificações etiológicas diferentes para o *Diabetes Mellitus*, no entanto, os mais frequentes são o *Diabetes Mellitus* tipo 1 e o *Diabetes Mellitus* tipo 2. No primeiro ocorre a destruição das células beta pancreáticas, e no segundo ocorrem distúrbios na secreção ou na ação da insulina.

Esse grupo de doenças tem forte relevância nos pontos de vista social e econômico, devido às altas taxas de morbidade, mortalidade e incapacidade para o trabalho (BALDA; PACHECO-SILVA, 1999). No Brasil, a população portadora de diabetes pode alcançar 10 milhões em 2010. Um indicador macroeconômico a ser considerado é que essa doença cresce mais rapidamente em países pobres e em desenvolvimento. Isso causa um impacto muito negativo, pois contribui para o ciclo vicioso da pobreza e da exclusão social. Para os portadores, há uma redução considerável na expectativa e na qualidade de vida (BRASIL, 2006).

Em decorrência do aumento progressivo dos pacientes diabéticos, a patologia tem se tornado um problema de saúde pública. Ela é considerada uma das doenças crônicas que afetam a população contemporânea devido à alta taxa de urbanização, industrialização, dietas hipercalóricas, sedentarismo, obesidade, estresse e mudanças no estilo de vida. O ideal seria manter um comportamento saudável em relação ao estilo de vida desde a infância, retardando ou prevenindo doenças e enfermidades na idade avançada (ORTIZ; ZANETTI, 2000).

2.2 DIABETES MELLITUS TIPO 1

O *Diabetes Mellitus* tipo 1 é uma doença autoimune devido à destruição seletiva das células beta pancreáticas. Ela é uma doença multifatorial, dependente da interação entre resposta imunológica, predisposição genética e fatores ambientais (SESTERHEIM; SAITOVITCH; STAUB, 2007).

Essa patologia é resultado de um processo autoimune específico contra as células beta do pâncreas, mediado pelos linfócitos T, ou seja, o corpo falha no reconhecimento das células beta como próprias do organismo e as destrói por meio de anticorpos ou células brancas do sangue. A sua incidência parece estar aumentando em todas as populações, resultando numa grande disparidade entre diferentes grupos étnicos devido a fatores genéticos e a fatores ambientais (DIB; TSCHIEDEL; NERY, 2008).

Sua evolução natural é composta por quatro fases distintas: a primeira delas é a pré-clínica, na qual ocorre a autoimunidade contra as células beta pancreáticas, diminuindo progressivamente a secreção de insulina. A segunda é o aparecimento dos sintomas, portanto, é o início do diabetes clínico. A terceira fase é a remissão transitória e a quarta e última fase é marcada por complicações, podendo levar a óbito (EINSENBARTH; JEFFREY, 2008).

Essa doença é responsável por no máximo 10% dos casos avaliados e diagnosticados como *Diabetes Mellitus* tipo 1. Aproximadamente 40% dos portadores têm idade inferior a 20 anos quando sua primeira manifestação ocorre, tornando-a uma das patologias mais comuns, crônicas e com grande índice de gravidade na infância (INZUCCHI et al., 2007).

Essa endocrinopatia é mais prevalente na infância, com grande incidência e acometimento cada vez mais precoce. Nos últimos anos observaram-se avanços no conhecimento desta doença. Portanto, acredita-se que o *Diabetes Mellitus* tipo 1 seja um conjunto de distúrbios genéticos heterogêneos que se expressa por fenótipos semelhantes, onde a interação genética e fatores ambientais promovem o desencadeamento do processo autoimune (TANNUS et al., 2007).

De acordo com os aspectos genéticos do *Diabetes Mellitus* tipo 1, percebe-se que é uma doença com herança poligênica complexa, pois foram descritos mais de 20 loci que podem dar susceptibilidade ao seu desenvolvimento (FERNANDES et al., 2003). A região do sistema antígeno leucocitário humano (HLA), encontrada no complexo principal de histocompatibilidade (MHC), localiza-se numa região do braço curto do cromossomo 6 (21.3), constituindo o locus de susceptibilidade para o *Diabetes Mellitus* tipo 1. Além disso, a doença atinge igualmente ambos os sexos, mas, em localidades com alta prevalência da patologia, atinge principalmente homens com mais de 20 anos (SILVA; MORY; DAVINI, 2008).

Os fatores ambientais atuam como modificadores da doença, servindo como “gatilhos”. Os principais são infecções virais (citomegalovírus, rubéola, caxumba, sarampo), dieta precoce na infância (introdução de ingredientes do leite de vaca, cereais e glúten) e toxinas (derivados de N-nitroso). Além disso, administração de vacinas, estresse emocional, influências climáticas, sazonalidade, agentes sanitários e acesso aos cuidados da saúde influenciam (SESTERHEIM; SAITOVITCH; STAUB, 2007).

A população brasileira é muito variada, tanto na questão étnica como na questão genética, devido ao resultado do encontro de genes oriundos de caucasianos, africanos e índios americanos. Grande parte dos caucasianos é proveniente de países europeus. Os africanos vieram para cá na época da colonização brasileira, em navios negreiros provenientes da África Equatorial. Os grupos indígenas são das tribos Tupi e Tapuia. Dessas etnias surgiram as misturas: caboclo (caucasianos com índios), mulato (caucasiano com africano) e cafuso (africano com índio). Devido a essa diversidade e grande extensão territorial do Brasil, ocorre o predomínio de diferentes populações em diferentes regiões do país. Por isso, há a necessidade de se estudar mais a fundo os genes que predisõem ao *Diabetes Mellitus* tipo 1 (ALVES et al., 2006).

Os fatores imunológicos que participam desta patogenia são mecanismos celulares e mecanismos humorais. Os mecanismos celulares são células que constituem o sistema imunológico, como os linfócitos T (CD4+ e CD8+), linfócitos B e as células apresentadoras de antígeno (macrófagos e células dendríticas). Nos mecanismos humorais, participam autoanticorpos específicos para antígenos das ilhotas pancreáticas (FERNANDES et al., 2005).

Portanto, a predisposição da etiologia autoimune é carac-

terizada pela presença de autoanticorpos contra constituintes da célula beta pancreática, acarretando sua autodestruição (CESARINI et al., 2003). A destruição das células produtoras de insulina pode ocorrer através de um processo denominado insulite, e essa destruição em massa acontece devido às agressões imunológicas mediadas por células linfocitárias, macrófagos e células NK ou "Natural Killer". Desta forma, conseqüentemente as células beta se atrofiam e perdem a sua função (BALDA; PACHECO-SILVA, 1999).

2.3 SISTEMA DE ANTÍGENOS LEUCOCITÁRIOS HUMANOS (HLA)

O Complexo Principal de Histocompatibilidade (CPH) é uma família de proteínas de membranas complexas, codificadas por um conjunto específico de genes, que está presente em todas as células nucleadas do organismo, sendo responsável pela apresentação dos fragmentos de antígenos processados. Essas proteínas são diferentes nas pessoas, pois há uma variedade de alelos que um indivíduo pode herdar (SILVERTHORN, 2003). Portanto, representa o conjunto de genes responsável pela codificação das moléculas de histocompatibilidade nas espécies, e no ser humano é chamado de sistema HLA (Antígenos Leucocitários Humanos) (DONADI, 2001).

A nomenclatura dos genes que compõem o sistema HLA foi proposta pelo Comitê de Nomenclatura do Sistema HLA da Organização Mundial da Saúde com o intuito de facilitar a compreensão do complexo gênico e padronizando-o. Além disso, eles se reúnem periodicamente para nomear alelos descobertos e rever a nomenclatura vigente (ALVES et al., 2006).

Até a década de 80, usavam-se métodos sorológicos para detectar antígenos e alelos não específicos. Portanto, nomeiam-se os antígenos com o prefixo HLA seguido de letras maiúsculas para denominar o locus gênico e um ou dois dígitos para a identificação numérica do antígeno (HLA-A1, HLA-A10, HLA-B27). A letra *w*, que significa *workshop*, diferencia o locus C (HLA-Cw1, HLA-Cw4) do sistema complemento (C3, C4, C5). Com a introdução da biologia molecular, acrescentou-se um asterisco para a nomeação da classe I. Em seguida, a letra maiúscula identificadora do locus gênico, depois, dois dígitos referindo-se à tipificação sorológica do antígeno, além dos dois dígitos seguintes que identificam os alelos (HLA-A*0201). Na classe II, os genes que codificam as cadeias alfa e beta são representados por letras maiúsculas "A" e "B", após a designação do locus gênico. Em seguida é adicionado um algarismo representando o gene. No caso dos loci -DQ e -DP, acrescenta-se a letra "A" ou "B" (HLA-DQA, HLA-DQB); para o locus -DR, acrescenta-se apenas a letra "B", por essa ser a sua cadeia polimórfica (HLA-DRB). Como algumas regiões possuem diversos genes, cada locus é seguido de um algarismo para representá-lo, do asterisco e dos quatro dígitos (HLA-DRB1*0101). Usa-se a letra N (nulo) designando que o gene não promove síntese de proteína (ALVES et al., 2005b; FERNANDES, 1999).

As moléculas de histocompatibilidade são glicoproteínas de superfície que apresentam em comum três porções: a primeira é a citosólica, que está voltada para o interior da célula, responsável pela transdução de sinais intracelulares. A segunda é a transmembrana que mantém a molécula acoplada

à camada bilipídica, e por fim a terceira porção, extracelular, sendo a maior e responsável pela apresentação de peptídeos citosólicos/endógenos das células T. Essas moléculas têm como principal função apresentar os peptídeos antigênicos para o reconhecimento dos receptores dos linfócitos T (DONADI, 2000; 2001).

O Complexo Principal de Histocompatibilidade (CPH) contém locos genéticos envolvidos na rejeição de tecidos estranhos ou não próprios, por representarem o conjunto de genes responsáveis pela codificação das moléculas de histocompatibilidade. Nos seres humanos, essa região está localizada no braço curto do cromossomo 6 (FERNANDES et al., 2003), nos intervalos 6p21.31 e 6p21.32.1, possuindo 4 milhões de pares de bases (NAIK, 2003).

O sistema HLA é dividido em três regiões: Classe I, Classe II e Classe III. Os genes agrupados da classe I e classe II estão separados pelos genes da classe III. As moléculas que compõem a Classe I contêm os locos HLA-A, -B e -C, que codificam moléculas presentes em quase todas as células nucleadas e estão relacionadas ao processamento e à apresentação de antígenos intracelulares. As que constituem a Classe II possuem os locos HLA-DR, -DP e -DQ, que codificam moléculas presentes, principalmente na superfície de células imunocompetentes como macrófagos, células dendríticas, monócitos, linfócitos T ativados e linfócito B, além de atuarem no processamento e apresentação de proteínas extracelulares. E as moléculas da região chamada Classe III codificam componentes do sistema complemento e são responsáveis por proteínas importantes na resposta imune (ALVES et al., 2005a; SILVA; MORY; DAVINI, 2008).

Segundo Donadi (2001), essa região é altamente polimórfica. Alguns genes apresentam variações em diferentes membros da população com frequências estáveis, geralmente inferiores a 99%, mostrando o polimorfismo genético. Por isso, cada variação de um gene polimórfico é denominada de alelo e cada locus possui centenas de alelos e as combinações ocorridas ao acaso permitem a variabilidade genotípica para garantir a sobrevivência das espécies (TURNER, 2004). O polialelismo do sistema HLA faz com que a sua participação na resposta imunológica seja importante na patogenia de diversas doenças autoimunes (KLEIN; SATO, 2000; DONADI, 2001; FERNANDES et al., 2003).

2.4 ASSOCIAÇÃO DO SISTEMA HLA COM DOENÇAS AUTOIMUNES

Muitas doenças autoimunes mostram associação à presença de genes HLA particulares. Um único gene HLA pode estar associado a um aumento no risco de diversas doenças autoimunes (DOAN et al., 2008). Entretanto, quando fazemos essa associação, vale lembrar que nem todos os indivíduos portadores de alelos que conferem susceptibilidade a determinadas doenças irão desenvolvê-las, e alguns indivíduos portadores de alguma patogenia não possuem antígenos ou alelos associados a ela (VAN ROOD, 1993).

Muitas dessas patologias autoimunes possuem mecanismos complexos envolvendo diversos fatores, iniciando com a susceptibilidade genética associada aos genes do sistema HLA,

eventos ambientais e resposta autoimune com a presença de autoanticorpos e/ou linfócitos autorreativos, ocasionando anormalidades no metabolismo (FERNANDES et al., 2003).

As doenças autoimunes afetam uma pequena parcela da população, aproximadamente 5 a 10%. Essas doenças multifatoriais incluem fatores genéticos e ambientais. Os indivíduos que herdam determinados alelos possuem maiores risco de desenvolver doenças como as endocrinopatias. Neste caso, apresentam susceptibilidade e os que não herdam possuem maior proteção. Porém, isso depende das combinações entre os alelos que, devido ao polimorfismo do sistema HLA, ocorrem nas diferentes populações, tornando-se muito variável. Desta maneira, nem sempre os marcadores que se aplicam a um determinado grupo populacional se repetem em outros, destacando a variabilidade que existe em ambos (ALVES et al., 2005b).

Os antígenos ou alelos do sistema HLA são associados e estudados em relação a várias doenças. Para isso, são feitos estudos populacionais e familiares. A obtenção dos resultados é através do cálculo do risco relativo, que indica a força da associação do HLA com a doença. É o risco de desenvolver a doença quando o antígeno está presente comparado com o risco de não desenvolver a doença quando o antígeno está ausente. A fração etiológica estima em porcentagem a susceptibilidade da doença, e é calculada nos casos em que o risco relativo é maior que 1. A fração preventiva estima a porcentagem de proteção contra a doença, e é calculada nos casos em que o risco relativo é menor que 1. Por fim, o risco absoluto é o risco real do portador de determinado marcador vir a desenvolver a doença (DONADI, 2001).

2.5 ASSOCIAÇÃO DO SISTEMA HLA COM O DIABETES MELLITUS TIPO 1

Muitos estudos sugerem que a susceptibilidade genética para o Diabetes Mellitus tipo 1 está associada à presença de antígenos de histocompatibilidade, ou seja, ao sistema HLA (CESARINI et al., 2003). A associação desta patologia com o sistema imunológico está bem definida, principalmente os alelos da classe II, pois determinadas combinações de alelos HLA conferem susceptibilidade ou proteção à endocrinopatia. As regiões HLA-DR e -DQ associam-se com essa doença em todos os grupos estudados (ALVES et al., 2006).

A primeira associação entre o sistema HLA e o Diabetes Mellitus tipo 1 foi demonstrada para HLA-B8 e/ou B15. Porém, com o avanço tecnológico foi possível detectar rapidamente esses alelos e explicá-los através da sequência gênica. As moléculas que compõem o sistema HLA possuem semelhanças com uma estrutura ordenada de moléculas relacionadas. Os genes das moléculas HLA de classe I e II codificados no braço curto do cromossomo 6 têm como característica o fenômeno do desequilíbrio de ligação, já que alguns alelos em um haplótipo tendem a ser herdados juntos, pois a frequência de recombinação em certas partes do complexo HLA é bastante reduzida em comparação a outras partes do genoma humano. O desequilíbrio de ligação é um fator importante quando se analisa a associação do sistema HLA com uma doença, no caso o Diabetes Mellitus tipo 1. A alternativa para se estimar a pre-

disposição é através da ligação genética (INZUCCHI, 2007).

A susceptibilidade genética ao Diabetes Mellitus tipo 1 é herdada. Portanto, indivíduos com parentes de primeiro grau afetados possuem maior risco de desenvolver tal doença. Os principais marcadores genéticos envolvidos na apresentação de antígenos das ilhotas e no controle da resposta imune são os loci HLA-DQ e -DR. Os determinantes ambientais mais estudados são: infecções virais, dieta precoce na infância e toxinas. Porém, outros fatores não-genéticos podem alterar a doença (SESTERHEIM; SAITOVITCH; STAUB, 2007).

As células beta do pâncreas são destruídas por causa dos linfócitos T CD4, mediante ativação dos macrófagos, e por linfócitos CD8, por efeito citotóxico direto contra antígenos. Esses mecanismos imunitários aparecem pela existência de anticorpos contra as células beta, modulados a fatores genéticos, relacionados à expressão de genes do sistema HLA de classe II, principalmente HLA-D (BRASILEIRO FILHO, 2006).

As moléculas HLA de classe II são fundamentais para a resposta imune do ser humano, e essa associação com o Diabetes Mellitus tipo 1 pode apresentar peptídeos diabetogênicos, os quais estão localizados no HLA-D, nas sub-regiões DQ e DR. No entanto, a apresentação do antígeno pelas diferentes moléculas HLA-DR ou DQ pode contribuir de modo variável para o desenvolvimento da doença. Dados atuais sugerem que certos alelos DQ estão mais associados com a patologia do que os alelos DR (INZUCCHI, 2007).

A literatura mostra que as moléculas HLA-DR e HLA-DQ estão associadas ao Diabetes Mellitus tipo 1 em diversos grupos étnicos, em especial, HLA-DQB1*0302 e/ou DQB1*0201. Em caucasianos, HLA-DRB1*0301 - DQA1*0501 - DQB1*0201 e DR4 - DQA1*0301 - DQB1*0302 confere susceptibilidade e HLA-DRB1*1501 - DQA1*0102 - DQB1*0602 associa-se mais à proteção. Em japoneses, os antígenos HLA-B54 e DR4 propiciam o desenvolvimento da doença. Nos chineses, HLA-DQB1*0201 promove o desencadeamento da patologia. Na população brasileira, HLA-DR3 e DR4 tinham maior susceptibilidade, assim como heterozigotos HLA-DR3/4.

No Brasil, a miscigenação é muito grande, resultando numa diversidade de alelos e antígenos nas determinadas regiões do país, pois o alelo ou antígeno pode ser determinante num ponto e nem existir no outro. Os estudos devem ser mais amplos e atingir todas as regiões para alcançar um objetivo, aplicando métodos preventivos para a doença.

2.6 MÉTODOS DE DETECÇÃO

Como a variabilidade genotípica do sistema HLA é grande, são necessários métodos eficazes para a detecção dos antígenos ou alelos que o constituem. De acordo com Alves e colaboradores (2005a), este sistema pode ser estudado por métodos sorológicos e por biologia molecular.

O método clássico de identificação dos antígenos que compõem o sistema HLA é o de citotoxicidade celular mediada por anticorpo e dependente de complemento, sendo também denominado de método sorológico. Ele acontece através da reação de um anticorpo anti-HLA, que é obtido a partir de indivíduos politransfundidos ou de mulheres múltiparas com a molécula HLA presente na superfície celular. Depois da rea-

ção antígeno-anticorpo, ocorre a lise celular em consequência da incubação com o complemento, ocasionando uma reação positiva (FERNANDES et al., 2003).

Entre os anos 80 e 90 ocorreram muitos avanços nos processos de tipificação dos alelos do sistema HLA, usando o DNA genômico. Após muitos estudos, chegaram à biologia molecular, na qual se enquadram o SSP e o SSOP (DONADI, 2000). Ao longo dos avanços da biologia molecular na tipificação do polimorfismo do HLA, não são os antígenos que são identificados nas superfícies celulares, mas sim os grupos de alelos individualmente presentes no DNA (DONADI, 2001).

A técnica mais utilizada é a reação em cadeia da polimerase (PCR), que foi desenvolvida pelo geneticista Kary Mullis (SAIKI et al., 1985). Essa técnica permite sintetizar rapidamente uma grande quantidade de um determinado fragmento de DNA. Basicamente, esse método se baseia no processo de replicação de DNA *in vivo*. Durante a reação em cadeia da polimerase, são usadas elevadas temperaturas de forma a separar as moléculas de DNA em duas cadeias simples, permitindo a ligação de oligonucleotídeos iniciadores, ou seja, os primers também em cadeia simples e normalmente constituídos por 15 a 30 nucleotídeos obtidos por síntese química. Para a amplificação de uma determinada região são necessários dois iniciadores complementares das sequências que flanqueiam o fragmento de DNA a amplificar, nos seus terminais 3', ou seja, o grupo 3'-OH tem que estar livre, para que a enzima DNA polimerase atue durante a síntese da cadeia complementar, utilizando como molde cada uma das duas cadeias simples constituintes do DNA a amplificar.

Para a realização da técnica, precisa-se de pequenas quantidades de DNA alvo, tampão salino contendo a enzima polimerase, primers, quatro desoxinucleotídeos constituintes do DNA e o co-fator Mg²⁺. Essa mistura é submetida a diversos ciclos de amplificação que consistem em desnaturar o DNA alvo pelo calor, separando as duas cadeias. Associando os iniciadores por ligações de hidrogênio ao DNA alvo em cadeia simples, permite a associação através do arrefecimento. A extensão dos iniciadores se dá através da síntese da cadeia complementar de cada cadeia molde, catalisada pela DNA polimerase.

Tal processo envolve esses passos e é repetido diversas vezes, sendo possível aumentar a concentração de DNA duas vezes a cada ciclo. Para que aconteça esse procedimento foi criado um aparelho denominado de termociclador, e para a realização dele são utilizadas DNA polimerases termoestáveis, que atuam em altas temperaturas, levando a um aumento na especificidade da reação. O resultado da PCR pode ser visualizado em gel de agarose ou de poliacrilamida.

No método SSP são realizadas várias reações de amplificação, na qual cada uma contém um par de iniciadores capaz de detectar um grupo de alelos ou um alelo. Os produtos da amplificação são submetidos à eletroforese em gel de agarose contendo brometo de etídeo, que é uma substância fluorescente capaz de intercalar-se no DNA. No método SSOP, usa-se um par de iniciadores construídos para amplificar uma região genérica de um gene. Em seguida, o DNA amplificado é hibridado com sondas de oligonucleotídeos capazes de reconhecer os diversos grupos de alelos dos genes ou alelos específicos. Nesse método, o DNA amplificado é desnaturado e fixado em membranas de náilon. As sondas marcadas com material ra-

dioativo ou substância fluorescente são hibridadas aos DNA fixados nas membranas quando incubadas a temperaturas adequadas.

Os genes do Sistema HLA podem ser identificados através de marcadores moleculares que são características do DNA promovendo a diferenciação entre os indivíduos. Além disso, são herdados geneticamente. Assim, marcadores que se aplicam a uma população nem sempre se repete em outras. Por isso a análise deve ser individual, para que se perceba a particularidade de cada uma delas. Atualmente, existem diversas técnicas que possibilitam mostrar a variabilidade do DNA. Variam também quanto à habilidade de detectar diferenças entre os indivíduos, custo, facilidade de uso, consistência e repetibilidade.

3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O estudo da associação do sistema HLA com o Diabetes Mellitus tipo 1, demonstra como é grande a preocupação biológica, médica e social de tal doença. As adversidades sofridas com o passar do tempo no que se refere ao método de detecção dos antígenos e, mais tarde, dos alelos, permitiu a obtenção de maiores certezas nos diagnósticos, além de contribuir para o melhor entendimento dos alelos com a própria patologia autoimune.

De acordo com os autores citados no decorrer do trabalho, os alelos que promovem a maior susceptibilidade, ou seja, aqueles que oferecem maior risco de desenvolver a doença, são aqueles do grupo DRB1*03 e DRB1*04, assim como os heterozigotos, ao contrário do alelo HLA-DQB1*02, que permite ao portador deste possuir proteção à patologia.

Entretanto, ser portador destes alelos não significa que o indivíduo irá desenvolver a doença, da mesma maneira que ser portador do alelo de proteção não indica que o indivíduo nunca desenvolverá a patologia em questão. Muitos outros fatores estão envolvidos, além da questão genética.

Observou-se também, no presente estudo, que as distribuições geográficas, étnicas e ambientais parecem estar envolvidas com o processo de desenvolvimento patológico do Diabetes Mellitus tipo 1.

Enfim, o Diabetes Mellitus tipo 1, é uma doença complexa, que envolve fatores genéticos e ambientais, que resulta na destruição autoimune das células beta. Avanços na biologia molecular e na imunogenética trouxeram grandes contribuições para ampliar o conhecimento da patologia.

REFERÊNCIAS

ALVES, C. et al. Importância do sistema de histocompatibilidade humano (HLA) em pediatria. *Pediatria*. v. 27, n. 4, p. 274-286, 2005a.

_____. Associação do sistema de histocompatibilidade humano (HLA) com doenças endócrinas auto-imunes. *Revista Baiana de Saúde Pública*, v. 29, n.1, p. 105-120, jan./jun. 2005b.

- _____. Distribuição e frequência de alelos e haplótipos HLA em brasileiros com Diabetes Mellito Tipo 1. **Arquivo Brasileiro de Endocrinologia e Metabologia**, v. 50, n. 3, p. 436-444, jun. 2006.
- BALDA, C. A.; PACHECO-SILVA, A. Aspectos imunológicos do diabetes melito tipo 1. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 45, n. 2, p. 175-180, 1999.
- BRASIL, Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. *Diabetes Mellitus*. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2006. (Cadernos de Atenção Básica, n. 16). (Série A. Normas e Manuais Técnicos).
- BRASILEIRO FILHO, G. **Bogliolo**: patologia. 7. ed. Rio de Janeiro, RJ: Guanabara Koogan, 2006.
- CESARINI, P. R. et al. Prevalência dos marcadores imunológicos ANTI-GAD e ANTI-IA2 em parentes de primeiro grau de diabéticos do tipo 1 em amostra da população da grande São Paulo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 49, n. 4, p. 395-400, 2003.
- DIB, S. A.; TSCHIEDEL, B.; NERY, M. Diabetes melito tipo 1: da pesquisa à clínica. **Arquivo Brasileiro de Endocrinologia e Metabologia**, v. 52, n. 2, p. 143-145, mar. 2008.
- DOAN, T. et al. **Imunologia ilustrada**. Porto Alegre, RS: Artmed, 2008.
- DONADI, E. A. Como entender a nomenclatura e os mecanismos de associação entre os antígenos e os alelos de histocompatibilidade com as doenças. **Medicina**, v. 33, p. 7-18, 2000.
- _____. Aspectos moleculares do complexo principal de histocompatibilidade: como entender a associação entre o sistema HLA e as doenças reumáticas. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 41, n. 4, jul./ago. 2001.
- EISENBARTH, G. S.; JEFFREY, J. The Natural History of Type 1A Diabetes. **Arquivo Brasileiro de Endocrinologia e Metabologia**, v. 52, n. 2, p. 146-155, 2008.
- ELLIS, A. E.; BALLINGALL, K. T. Cattle MHC: evolution in action? **Immunological Reviews**, v. 167, p. 159-168, 1999.
- FERNANDES, A. P. M. **Expressão das moléculas de histocompatibilidade de classe I e II em células linfomonocitárias de pacientes com Diabetes Mellitus do tipo 1 recentemente diagnosticados**. Tese (Mestrado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 1999.
- _____. et al. Como entender a Associação entre o sistema HLA e as doenças auto-imunes endócrinas. **Arquivo Brasileiro de Endocrinologia e Metabologia**, v. 47, n. 5, out. 2003.
- _____. et al. Fatores imunogenéticos associados ao diabetes mellitus do tipo 1. **Revista Latino-Americana de Enfermagem**, v. 13, n. 5, p. 743-749, set. 2005.
- FERRAZ, I. **Exames de Rotina para Diagnosticar o Diabetes**. Disponível em: <<http://www.diabetes.org.br/diabetes/exames/exarotina.php>>. Acesso em: 18 ago. 2009.
- GROSS, J. L. et al. Diabetes Mellito: Diagnóstico, Classificação e Avaliação do controle glicêmico. **Arquivo Brasileiro de Endocrinologia e Metabologia**, v. 46, n. 1, p. 16-26, fev. 2002.
- INZUCCHI, S. E. **Diabete Mellito: manual de cuidados essenciais**. Porto Alegre, RS: Artmed, 2007.
- KLEIN, J.; SATO, A. The HLA system: Second of two parts. **The New England Journal of Medicine**, v. 343, n. 11, p. 782-786, set. 2000.
- NAIK, S. The Human HLA system. **Journal of Indian Rheumatology Association**, v. 11, p. 79-83, 2003.
- ORTIZ, M. C. A.; ZANETTI, M. L. Diabetes Mellitus: fatores de risco em uma instituição de ensino na área da saúde. **Revista Latino-Americana de Enfermagem**, v. 8, n. 6, p. 128-132, dez. 2000.
- SAIKI, R. K. et al. Enzymatic amplification of b globin sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anaemia. **Science**, v. 230, n. 4732, p. 1350-1354, Dec. 1985.
- SESTERHEIM, P.; SAI TOVITCH, D.; STAUB, H. L. Diabetes mellitus tipo 1: multifatores que conferem suscetibilidade a patogenia autoimune. **Scientia Medica**, v. 17, n. 4, p. 212-217, out./dez. 2007.
- SILVA, M. E. R.; MORY, D.; DAVINI, E. Marcadores Genéticos e Auto-Imunes do Diabetes Mellito Tipo 1: da Teoria para a Prática. **Arquivo Brasileiro de Endocrinologia e Metabologia**, v. 52, n. 2, p. 166-180, 2008.
- SILVERTHORN, D. U. et al. **Fisiologia humana: uma abordagem integrada**. 2. ed. Barueri, SP: Manole, 2003.
- TANNUS, L. R. M. et al. Diabetes melito do tipo 1ª na primeira infância de gêmeos Dizigóticos: Associação entre fatores genéticos e ambientais. **Arquivo Brasileiro de Endocrinologia e Metabologia**, v. 51, n. 1, p. 142-145, 2007.
- TURNER, D. The human leucocyte antigen (HLA) system. **Vox Sanguinis**, v. 87, n. 1, p. 587-590, 2004.
- VAN ROOD, J. J. The impact of the HLA-system in clinical medicine. **Schweizerische medizinische Wochenschrift**, v. 123, n. 3, p. 85-92, jan. 1993.

Recebido em: 19 Abril 2009
 Aceito em: 25 Junho 2009