

Análise dos polimorfismos *HLA-DQB1*0201/DQB1*0302* em pacientes portadores de diabetes melito tipo 1 no Vale do Sinos *

Analysis of the *HLA-DQB1*0201/DQB1*0302* polymorphisms in type 1 diabetes mellitus brazilian patients

Priscila T Azambuja¹; Sabrina E M Almeida²; Daiane D Berlese² & Regina B Barcelos³

RESUMO - O diabetes melito do tipo 1 (DM1) é uma doença auto-imune de caráter multifatorial. Dentre os fatores genéticos envolvidos no seu desencadeamento, os genes do sistema de histocompatibilidade humano (HLA) são responsáveis por 40% do componente genético desta doença crônica. Este trabalho analisou a frequência dos polimorfismos *HLA-DQB1*0201/DQB1*0302* em pacientes diabéticos do tipo 1 residentes na região do Vale do Sinos (RS-Brasil) através da técnica da reação em cadeia da polimerase e de sondas específicas. Como resultado, verificou-se que a frequência destes polimorfismos era mais elevada em pacientes quando comparada com um grupo controle, dado muito semelhante àqueles descritos na literatura. Enfim, a análise das frequências é de extrema importância para o entendimento da etiologia do DM1, contribuindo assim para o diagnóstico precoce e auxiliando no controle e no acompanhamento eficaz dos pacientes acometidos por esta patologia.

PALAVRAS-CHAVE - Diabetes Mellitus tipo 1, predisposição genética, complexo principal de histocompatibilidade, reação em cadeia da polimerase.

SUMMARY - The type 1 Diabetes Mellitus (DM1) is a multifactorial autoimmune disease. The human leukocyte antigen system (HLA) genes are one of the genetic factors involved and it is responsible to 40% of the genetic marker of this chronic disease. This paper analyzed the frequency of *HLA-DQB1*0201/DQB1*0302* polymorphisms in type 1 diabetic Brazilian patients using the polymerase chain reaction and specific primers. We found that the frequency of these polymorphisms was bigger in patients than in controls and this data is very similar to those described in literature. At last, the analysis of the polymorphisms is very important to the DM1 etiology, thus contributing to better diagnosis and efficient control of the diabetic patients.

KEYWORDS - Type 1 Diabetes Mellitus, genetic predisposition, major histocompatibility complex, polymerase chain reaction.

INTRODUÇÃO

O diabetes melito do tipo 1 (DM1) é uma doença crônica que resulta do ataque auto-imune órgão-específico. Quando os linfócitos T auto-reativos destroem as células beta pancreáticas, ocorre a absoluta deficiência da produção de insulina. Os principais auto-anticorpos encontrados no soro dos pacientes são: antiinsulina (IAA), antiilhotas pancreáticas (ICA), anti-descarboxilase do ácido glutâmico (anti-GAD) e anti-tirosina fosfatase (IA2). Os primeiros sintomas percebidos pelos diabéticos, como polifagia, poliúria, perda de peso e cetoacidose, ocorrem quando as Ilhotas de Langherans já perderam 80% da sua atividade. Em longo prazo, a hiperglicemia ocasiona complicações microvasculares comprometendo principalmente os rins, a retina e os sistemas nervoso e circulatório (20, 12, 3).

No mundo estima-se que haja 18 milhões de portadores de DM1 atualmente, sendo que 60.000 casos novos são diagnosticados ao ano (1). Dentre a população brasileira, acredita-se que 500 mil pessoas são acometidas pelo DM1 (19). Já no Rio Grande do Sul (RS) existem cerca de 15 mil indivíduos atingidos pela doença e destes, 800 encontram-se na região do Vale do Sinos (5).

O RS foi colonizado por diferentes etnias, como alemães, italianos, portugueses espanhóis entre outros. Sendo assim, a população nesta região é de origem caucasiana (13).

A reação auto-imune no DM1 é decorrente de uma associação entre fatores ambientais e genéticos. As infecções virais, o estresse psicológico e a alimentação são exemplos de como o ambiente contribui no desencadeamento do processo inflamatório contra as células beta do pâncreas. Cerca de 64% dos pacientes diabéticos do tipo 1 possuem anticorpos contra os vírus da coxsackie B4, herpes, rubéola ou caxumba (21).

A associação entre os genes do sistema de histocompatibilidade humano (HLA), localizado na região cromossômica 6p21, e o DM1 tem sido exaustivamente estudada, representando cerca de 40% do componente genético desta doença (2). Porém o exato mecanismo que dispara a cascata de eventos que provoca a carência da produção de insulina ainda não está bem estabelecido. Os genes do HLA de classe II (loci DR, DP e DQ) codificam moléculas presentes na superfície das células que atuam na resposta imune. Conseqüentemente, são os marcadores genéticos de doenças endócrinas auto-imunes mais estudados (1, 2). Aly e cols. (3) demonstraram que a presença de um ácido aspártico (Asp) na posição 57 da cadeia beta da proteína, determinada pelo polimorfismo *HLA-DQB1*0602*, seria um fator protetor quanto ao desenvolvimento de DM1. Por outro lado, as variantes non-Asp-57, como *HLA-DQB1*0201* e *DQB1*0302*, são considerados alelos de susceptibilidade por estarem associados a predisposição do DM1.

Em caucasianos, os haplótipos *DR3/DQB1*0201* e *DR4/DQB1*0302* estão presentes em 90% dos pacientes diabéticos do tipo 1, porém a frequência destes polimorfismos varia conforme a região geográfica da população estudada (12). Trabalhos realizados na Europa, Estados Unidos e China encontraram valores que variam entre 47-85% para *DQB1*0201* e de 6-90% para o alelo *DQB1*0302* em pacientes diabéticos do tipo 1 (8, 15). No Estado de São Paulo (Brasil), Volpini e cols. (23) observaram que os indivíduos que apresentavam o polimorfismo *DQB1*0201* tinham 2,3 mais chance de desenvolver o DM1 e aqueles que possuíam o alelo *DQB1*0302* o risco aumentava 4,9 vezes. Fernandes e cols. (10) também verificaram que o risco relativo do desenvolvimento desta patologia era elevado na presença dos alelos *DQB1*0201* (4,45) e

Recebido em 09/10/2008

Aprovado em 08/02/2010

*Centro Universitário Feevale, Novo Hamburgo, RS (Brasil)

*DQB1*0302* (4,49). Estudos brasileiros que relacionam a frequência destes polimorfismos são raros, como o de Bompeixe (4), em Curitiba, que verificou que pacientes portadores de DM1 tinham frequências de 13% e 22% para os alelos *DQB1*0201/DQB1*0302*, respectivamente.

A etiologia do DM1 poderá ser melhor elucidada através da investigação de genes de susceptibilidade para esta doença. Os alelos que apresentam maior frequência em uma determinada população podem contribuir para a compreensão dos fatores que influenciam o aparecimento das doenças. Assim, o objetivo deste trabalho foi verificar as frequências dos polimorfismos *DQB1*0201/DQB1*0302* em portadores de DM1 e em indivíduos com níveis normais de glicose (17) e sem antecedentes familiares de diabetes melito (tipo 1 ou 2), residentes na região do Vale do Sinos (RS-Brasil), e a sua possível correlação com o desenvolvimento desta patologia.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostra

A amostra foi composta por 82 voluntários caucasianos (28 homens e 54 mulheres), residentes na região do Vale do Sinos (RS- Brasil), com idade entre 18-57 anos, sendo 36 portadores de DM1 previamente diagnosticados e com anti-GAD positivo e 46 indivíduos com níveis normais de glicose e sem antecedentes familiares de diabetes melito (tipo 1 ou 2), segundo os critérios da Organização Mundial de Saúde (17). O grupo controle apresentou média de idade similar e distribuição entre gêneros equivalente ao grupo de pacientes portadores de DM1. Os voluntários foram selecionados junto ao Laboratório de Biomedicina do Centro Universitário Feevale, a partir de um questionário de triagem. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Centro Universitário Feevale no dia 23/11/2007 sob o nº 2.02.03.07.801 e, em seguida, foi autorizado pelos participantes através da assinatura de um termo de consentimento livre e esclarecido. Este estudo foi desenvolvido durante o período de julho de 2007 a junho de 2008.

Tipagem de DNA

As amostras foram centrifugadas para separar o plasma da camada de leucócitos e o ácido desoxirribonucléico (DNA) foi extraído pela técnica de *salting-out* (14). Para a tipificação dos alelos *DQB1*0201/DQB1*0302* foi utilizada a técnica da reação em cadeia da DNA polimerase (PCR). Para a amplificação foi usada uma reação de volume final de 50 µL, contendo os seguintes reagentes: água (DNA e RNA free), tampão (10 mM tris, 50 mM de KCl), 50 mM de MgCl₂, 200 mM de dNTP, 2,5 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen™) e 15 µmol/µL de cada um de *primers sense* e *anti-sense* (F: 5'-GATTCGTGTACCA GTTTAAGG-3' e R: 5'-CTCGTAGTTGTGTCTGGACAC-3'). A amplificação foi realizada durante 30 ciclos de 94°C por 3 minutos, 94°C por 1 minuto, 60°C por 1 minuto 72°C por 2 minutos e de extensão final a 72°C por 5 minutos (18). Os produtos amplificados foram identificados por eletroforese em gel de agarose a 1%, corados com 3 µL solução de brometo de etídio e visualizadas após exposição à luz ultravioleta, através de um transluminador. Os produtos de PCR gerados possuíam 237pb, os quais foram identificados a partir da posição e do tamanho das bandas visualizadas comparando-se com um marcador de peso molecular de 100pb.

Hibridização com Sondas

Microplacas (Amino Link) foram sensibilizadas com sondas

aminadas específicas (*DQB1*0201*: 5'-GCTGGGGCTGCCTG-3' e *DQB1*0302*: 5'-GGCCGCCTG CCGCCGAG-3') as quais ficaram a 4°C por 24h. Os produtos amplificados foram desnaturados a 100°C por 5 minutos e, em seguida, 10 µL de cada amostra foi aplicado nas microplacas para permitir a ligação do DNA. Posteriormente, as microplacas foram incubadas no forno de hibridização a 50°C por 1 hora. As microplacas foram submetidas a quatro etapas de lavagem e à adição do conjugado de estreptavidina peroxidase e de tetrametil benzidina (TMB). Após 20 minutos, foi adicionado 100µL de ácido sulfúrico a 0,1M. Para determinar a curva de calibração dos produtos de hibridização, as microplacas foram lidas em leitora de *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) no comprimento de onda 450nm com refiltro no comprimento de onda de 620nm (18).

Análise Estatística

A análise estatística foi realizada pelo pacote estatístico SPSS v.13.0. Foram realizadas análises de frequências dos dados qualitativos, bem como aplicação do chi quadrado (χ^2) para detectar diferenças significativas. O valor de p menor que 0,05 foi considerado estatisticamente significativo.

RESULTADOS

Indivíduos portadores de DM1 tiveram uma frequência de 44,4 % para o alelo *DQB1*0201* e de 52,7% para o alelo *DQB1*0302*. Já os indivíduos com níveis normais de glicose e sem antecedentes familiares de diabetes melito (tipo 1 ou 2) apresentaram uma frequência de 34,8 % para o alelo *DQB1*0201* e de 36,9% para o alelo *DQB1*0302*. Não foi encontrada uma diferença significativa entre as frequências dos polimorfismos *DQB1*0201/DQB1*0302* do grupo de diabéticos e do grupo controle (Tabela 1).

Dentre o grupo de pacientes, 44,4% apresentavam ambos os *DQB1*0201-DQB1*0302*, ou seja, 100% os portadores do alelo *DQB1*0201* também possuíam o alelo *DQB1*0302*. Por outro lado, 32,6% do grupo controle possuía os dois alelos concomitantemente (Tabela 2). Também foi verificado que 43,8% dos pacientes que possuíam os dois alelos apresentavam a doença há mais de 10 anos.

TABELA I
Frequência de portadores dos alelos *HLA-DQB1* em pacientes portadores de DM1 e grupo controle.

Alelos DQB1	Pacientes (%) (N = 36)	Controle (%) (N = 46)	Valor p**
*0201	44,4	34,8	0,49
*0302	52,8	37,0	0,18

**Valor p calculado a partir do teste do chi quadrado (χ^2).

TABELA II
Frequência da combinação alélica dos alelos *DQB1*0201-DQB1*0302* em pacientes portadores de DM1 e grupo controle.

Combinação	Pacientes (%) (N = 36)	Controle (%) (N = 46)	Valor p**
*0201 -*0302	44,4	32,6	0,35
Outros***	52,8	67,4	

** Valor p calculado a partir do teste do chi quadrado (χ^2).

*** Outros significa qualquer haplótipo excluindo *DQB1*0201 -*0302*.

DISCUSSÃO

A etiologia do DM1 está bem estabelecida, porém o mecanismo que desencadeia a reação auto-imune ainda não foi elucidado. Além disso, a prevalência de DM 1 não diagnosticada continua sendo muito alta apesar das variadas campanhas de prevenção. Assim, é importante identificar indivíduos suscetíveis antes do aparecimento das complicações crônicas (7).

A associação entre os genes do HLA de classe II e a predisposição para o desenvolvimento de doenças auto-imunes tem sido extensivamente estudada. Estes genes são altamente polimórficos, ou seja, populações distintas irão apresentar frequências alélicas diferentes (9). Alguns polimorfismos parecem estar correlacionados com uma maior predisposição genética de desenvolver o DM 1. O Brasil é um país que possui uma miscigenação bastante marcante, porém a população do estado do Rio Grande do Sul caracteriza-se por uma origem basicamente caucasóide (13). Em um estudo brasileiro com indivíduos caucasóides, observou-se que cerca de 90% dos pacientes portadores de DM 1 apresentam os alelos *DQB1*0101-DQB1*0201-DQB1*0302* (11).

O presente estudo revelou uma frequência de 44,4 % para o alelo *DQB1*0201* e de 52,7% para o alelo *DQB1*0302* em indivíduos portadores de DM1. Bompeixe (4), em Curitiba (PR-Brasil), verificou que pacientes portadores de DM 1 tinham frequências de 13% e 22% para os alelos *DQB1*0201/DQB1*0302*, respectivamente. Contudo frequências similares ao nosso estudo foram encontradas em um trabalho realizado por Mimbacas e cols (15) que analisaram os polimorfismos do gene *HLA-DQB1* em 72 pacientes com DM 1 em Montevidéu (Uruguai), onde 47% deles possuíam o alelo *DQB1*0201* e 35% o alelo *DQB1*0302*. Em adição, Deja e cols (6), em Katowice (Polônia), observaram que dentre os pacientes diabéticos do tipo 1 (n=44), 37% tinham o alelo *DQB1*0201* e 33% o alelo *DQB1*0302*. Cabe ressaltar que estas populações são principalmente formadas por indivíduos caucasóides.

As frequências dos pacientes com DM1 e do grupo controle encontradas neste trabalho não são diferentes significativamente. Em Ribeirão Preto (SP-Brasil), Nahas (16) também não observou uma diferença significativa entre os pacientes portadores de DM 1 e o grupo controle para as frequências dos alelos *DQB1*0201/DQB1*0302*. Porém, Bompeixe (4), em Curitiba (PR-Brasil), notou que os pacientes e os indivíduos do grupo controle apresentavam frequências estatisticamente diferentes ($p < 0,01$). Contudo, verificamos que as frequências dos pacientes e do grupo controle são diferentes ainda que não tenham apresentado uma significância estatística. Talvez, o número amostral tenha influenciado neste resultado, não permitindo a detecção de uma real diferença entre as frequências. Assim, futuras pesquisas nesta população que analisem um maior número de indivíduos podem gerar dados mais conclusivos. Além disso, a avaliação da frequência alélica do gene *DQB1* em diferentes regiões geográficas do país poderá contribuir para o melhor entendimento dos fatores genéticos envolvidos no desenvolvimento do DM1.

CONCLUSÕES

A pesquisa de novas técnicas para o diagnóstico precoce, juntamente com a determinação dos fatores de risco são imprescindíveis para a evolução das ciências médicas, pois quando se conhece a causa da patologia o controle pode ser realizado com maior eficácia. As complicações do DM estão intimamente associadas ao desenvolvimento de

doenças cardiovasculares, aumentando a morbidade da população mundial. Desta forma, profissionais da área da saúde capacitados e atualizados podem trabalhar em conjunto a fim de realizar o diagnóstico precoce, minimizando a morbidade destes pacientes e contribuindo assim para a redução dos custos do sistema de saúde público (22).

AGRADECIMENTOS

Aos voluntários que participaram deste projeto e ao Centro Universitário Feevale pelo suporte técnico.

REFERÊNCIAS

1. ALVES, C.; MEYER, I.; VIEIRA, N.; TORALLES, M. B. P. - Associação do sistema de histocompatibilidade humano (HLA) com doenças endócrinas auto-imunes. Rev. Baia. Sau. Pub., 29 (1): 105-20, 2005.
2. ALVES, C.; MEYER, I.; VIEIRA, N.; TORALLES, M. B. P.; LEMAIRE, D. - Distribuição e frequência de alelos e haplótipos HLA em brasileiros com diabetes tipo 1. Arq. Bras. Endocrinol. Metab., 50 (3): 436-44, 2006.
3. Theresa A. Aly, Mohamed M. Jahromi, Jennifer M. Barker, Maria S. Fernado, Sunanda R. Babu, Liping Yu, Dongmei Miao, Henry A. Erlich, Pamela R. Fain, Katherine J. Barriga, Jill M. Norris, Marian J. Rewers, and George S. Eisenbarth - Extreme genetic risk for type 1 diabetes. PNAS.; 103 (38): 14074-9, 2006.
4. BOMPEIXE, E. P. - Polimorfismos de *HLA-DQB1* e *HLA-DRB1* e abortamento espontâneo recorrente. 2006. 127p. Tese de Doutorado em Genética - Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal Paraná, Curitiba.
5. DATASUS - banco de dados do Ministério da Saúde. Brasília. Disponível em: <http://w3.datasus.gov.br/datasus/datasus.php>. Acesso em: 13 mai. 2008.
6. DEJA, G.; CHOBOT, P. J.; TENDERA, E. M.; POLANSKA, J.; SIEKIERA, U. - Is the association between TNF- α -308 A allele and DMT1 independent of HLA-DRB1, DQB1 alleles? Mediat. Inflamm., 48: 1-7, 2006.
7. DIABETES CONTROL AND COMPLICATIONS TRIAL RESEARCH GROUP (DCCT). The effect of intensive treatment of Diabetes on the development na progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. N. Engl. J. Med., 329 (14): 977-86, 1993.
8. DORMAN, J.; PORTE, R. E.; STONE, R. A.; TRUCCO, M. - Worldwide differences in the incidence of type 1 diabetes are associated with amino acid variation at position 57 of the HLA-DQ, chain. PNAS, 87: 7370-4, 1990.
9. EMERY, L. M.; BABU, S.; NORRIS, J. M.; REWERS, M.; EISENBARTH, G. S.; BUGAWAN, T. L. & AL - Newborn HLA-DR, DQ genotype screening: age and ethnicity-specific type 1 diabetes risk estimates. Pediat. Diab., 6: (3): 136-44, 2006.
10. FERNANDES, A. P. M.; LOUZADA, J. 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., 958: 305-8, 2002.
11. FERNANDES, A. P.; PACE, A. E.; ZANETTI, M. L.; FOSS, M. C.; DONADI, E. A. - Fatores Imunogenéticos associados ao diabetes mellitus do tipo 1. Ver. Lat-Amer. Enferm., 13 (5): 743-9, 2005.
12. GILLESPIE, K. - Type 1 diabetes: pathogenesis and prevention. Can. Med. Assoc. J., 175 (2): 165-70, 2006.
13. GRIJO, L. A.; KUHN, F.; GUAZELLI, C. A. B.; NEUMANN, E. S. - Capítulos de história no Rio Grande do Sul. Porto Alegre, Editora da UFRGS, 2004, 398p.
14. LAHIRI, D. K.; NURNBERGER, J. I. JR. - A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. Nucl. Acid. Res., 19 (19): 5444, 1991.
15. MIMBACAS, A.; BRAVO, F. P.; HIDALGO, P. C.; CARDOSO, H.; GALLINO, J. P.; JAVIEL, G. & et AL - Diabetes type 1 and DQB1 alleles in Uruguay. Gene. Mol. Res., 2 (1): 29-35, 2003.
16. NAHAS, R.; DEGHAIDE, N. H. S.; DONADI, E. A.; FOSS, M. C. - Frequency of HLA class II -DR and -DQ antigens in Brazilian patients with type I diabetes. Medic., 33: 37-41, 2000.
17. OMS, galeria virtual da organização Mundial da saúde. Genebra. Disponível

em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/en/index.html>. Acesso em: 25 mai. 2008.

18. SANTOS, J.; BRAVO, F. P.; PETRI, R.; ALBALA, C.; CARRASCO, E.; CALVILLAN, M. - Associations between HLA-DQB1 high-risk alleles and type 1 diabetes do not depend on cytomegalovirus antibody status at onset: A case-parent study conducted in Chile. *Imm. Cell. Biol.*, 78: 259-63, 2000.
19. SBD - galeria virtual da Sociedade Brasileira de Diabetes. São Paulo. Disponível em: <http://www.diabetes.org.br/diabetes/exames/exarotina.php>. Acesso em: 5 mai. 2008.
20. SILVA, M. E. R.; MORY, D. & DAVINI, E. - Marcadores genéticos e autoimunes do diabetes melito tipo 1: da teoria para a prática. *Arq. Bras. Endocrinol. Metab.*, 52 (2): 166-80, 2008.
21. TANNUS, L. R. M.; OLIVEIRA, D. S.; MATHEUS, A. S. M.; CUNHA, E. F.; GOMES, M. B. - Diabete Mellito tipo 1 em gêmeos dizigóticos. *Arq. Bras. Endocrinol. Metab.*, 1 (1): 142-5, 2007.

22. UK PROSPECTIVE DIABETES STUDY (UKPDS 33) Group. - Intensive blood-glucose control with sulphonylureas as insulin compared with conventional treatment and risk of complications patients with type 2 diabetes. *Lancet.*, 352: 837-5, 1998.
23. VOLPINI, W. M. G.; TESTA, G. V.; MARQUES, S. B. D.; ALVES, L. I.; SILVA, M. E. R. & et al - Family-based association of HLA class II alleles and haplotypes with type I diabetes in Brazilians reveals some characteristics of a highly diversified population. *Hum. Immunol.*, 62: 1226-33, 2001.

ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIA:

Priscila Tondo Azambuja
Rua Feijó Junior 1100, apto. 401
CEP. 95034-160 Caxias do Sul - RS
E-mail: pribio@feevale.br



Excelência de Conhecimento em Diagnóstico Laboratorial



Centro de Pós-Graduação

CURSOS DE PÓS-GRADUAÇÃO LATO SENSU:

ANÁLISES CLÍNICAS
HEMATOLOGIA CLÍNICA
MICROBIOLOGIA CLÍNICA
CITOLOGIA CLÍNICA
GESTÃO EM LABORATÓRIO CLÍNICO



CURSOS DE TREINAMENTO PROFISSIONAL:

MICROBIOLOGIA
HEMATOLOGIA
IMUNOLOGIA

INFORMAÇÕES E INSCRIÇÕES:

Sociedade Brasileira de Análises Clínicas
Rua Vicente Licínio, 99 Tijuca
Rio de Janeiro - RJ CEP: 20.270-902

Fone: 21 2187 - 0800
Fax: 21 2187 - 0805

Site: www.sbac.org.br
E-mail: cpg@sbac.org.br