

# **Análise do polimorfismo HLA/DR-DQ em Angolanos portadores de Diabetes *Mellitus* tipo I**

**Nilda Tatiana Hernández Ramos**

Dissertação submetida à Escola Superior de Tecnologia a Saúde do Porto para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Bioquímica em Saúde (ramo de Bioquímica Aplicada), realizada sob a orientação científica do **Doutor Rúben Miguel Pereira Fernandes**, Professor Adjunto, área das Ciências Químicas e das Biomoléculas da ESTSP-IPP e a **Doutora Madalena Chimpolo**, Professora Auxiliar, área de Génética da Faculdade de Medicina da Universidade de Agostino Neto, Angola.

Janeiro 2015



## RESUMO

A diabetes *mellitus* do tipo 1 (DM1) é o distúrbio endócrino-metabólico mais frequente em crianças. É uma doença autoimune resultado da destruição selectiva das células beta pancreáticas. A velocidade de destruição das células beta pode ser rápida em algumas pessoas e lenta em outras; esta última é típica de adulto é conhecido como diabetes autoimune latente em adulto (LADA). A sua etiologia envolve factores ambientais e genéticos, dos genes envolvidos a maior contribuição vem da região do genoma onde estão localizados os genes do Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC). A combinação de diferentes alelos do sistema de antígeno leucocitário humano tipo II (HLA-II) esta associada a susceptibilidade da doença e as principais molécula envolvidas são a DQ e DR. O estágio pré-clínico da doença se caracteriza pela presença de auto-anticorpos, sendo o anti-GAD o mais sensível nesta patologia.

**OBJECTIVO:** Analizar a frequência dos polimorfismos HLA-DR/DQ em angolanos portadores de diabetes tipo 1, residentes em Luanda. O tipo de estudo adotado foi caso-controlo num universo de voluntários provenientes da consulta externa de hospitais e clínicas locais no período de outubro de 2012 a outubro 2013. A amostra biológica utilizada foi sangue total, tendo sido processada no laboratório *LABGENE*, da Faculdade de Medicina (FM) da Universidade Agostinho Neto (UNA). Os auto-anticorpos, anti-GAD, foram doseados pelo método de ELISA. O ADN genómico foi extraído à partir de sangue total periférico e tipagem genética foi realizada mediante PCR-SSP. O alelo **DQB1\*02 (DQ2/DQ2)** ( $p=0,033$ , OR= 4, IC (1,2-13,3) foi associado a susceptibilidade da DM1; os alelos **DQB1\*06 (DQ6/DQ6)** ( $p=0,000$ , OR=0,30, IC (0,17-0,54); **\*11** ( $p=0,011$ , OR=0,14, IC=0,032-0,62); **\*13** ( $p=0,006$ , OR=0,13, IC=0,049-0,588) e **\*15** ( $p=0,001$ , OR=0,044, IC=0,005-0,39) foram associados a proteção. Foi encontrado 29,2% de positividade para o anti-GAD, não houve associação significativa ( $p=0,69$ ) entre a resposta positiva do anti-GAD e a idade. Não foi encontrada associação significativa ( $p=0,39$ ) entre o tempo de diagnóstico e resposta humoral. Observou-se associação significativa entre os alelos de risco **DQB1\*02** ( $p=0,000$ ) e resposta positiva para anti-GAD; da mesma maneira houve uma associação significativa para os alelos **DQB1\*06** ( $p=0,002$ ), **DRB1\*11** ( $p=0,048$ ); **\*13** ( $p=0,004$ ) e **\*15** ( $p=0,021$ ) e a resposta negativa do anti-GAD.

Os dados demonstram o forte envolvimento do gene HLA-II (DQ) com a susceptibilidade a DM1 e sugere que a autoimunidade se desenvolve na presença de susceptibilidade genética, quer dizer, em associação com alelos HLA-II específicos.

**Palavras-chaves** – Diabetes Mellitus tipo 1, HLA-II, PCR-SSP, Anti-GAD.

## ABSTRACT

The type 1 diabetes mellitus (T1DM) is the endocrine-metabolic disorder more common in children. It is an autoimmune disease results from selective destruction of pancreatic beta cells. The rate of destruction of beta cells may be rapid in some people and slow in others; the latter is typical adult is known as latent autoimmune diabetes in adults (LADA). Of all the genes involved the largest contribution comes from the region of the genome where are located the genes of the major histocompatibility complex (MHC). The combination of different alleles of the human leukocyte antigen system type II (HLA-II) is associated with disease susceptibility and key molecule involved are DQ and DR. The preclinical stage of the disease is characterized by the presence of autoantibodies, and anti-GAD the most sensitive in this pathology.

**OBJECTIVE :** To analyze the frequency of HLA-DR/DQ polymorphisms in Angolan patients with type 1 diabetes, living in Luanda. The type of study was adopted was a case-control in a universe of volunteers from outpatient local hospitals and clinics. The biological sample used was whole blood and was processed in LABGENE laboratory, Faculty of Medicine (FM) Agostinho Neto University (UNA) .The autoantibodies, anti-GAD, were assayed by ELISA . Genomic DNA was extracted from peripheral whole blood and genetic typing was performed by PCR-SSP. The DQB1 \* 02 (DQ2 / DQ2) ( $p = 0.033$ , OR = 4, CI (1.2 to 13.3) were associated with the susceptibility DM1, whereas the DQB1 \* 06 (DQ6 / DQ6) ( $p = 0.000$  OR = 0.30 CI(0.17 to 0.54); \* 11 ( $p = 0.011$ , OR = 0.14 ,CI = 0.032 to 0.62); \* 13 ( $p = 0.006$ , OR = 0 , 13, CI = 0.049 to 0.588) and \* 15 ( $p = 0.001$ , OR = 0.044 , CI = 0.005 to 0.39) were associated with protection. it was found 29.2% positivity for anti-GAD, there was no significant association ( $p = 0.69$ ) between the positive response of anti-GAD and age. There was no significant association ( $p = 0.39$ ) between the time of diagnosis and humoral response. There was a significant association between the alleles risk of DQB1 \* 02 ( $p = 0.000$ ) and positive for anti-GAD response, the same way there was a significant association for DQB1 \* 06 alleles ( $p = 0.002$ ), DRB1 \* 11 ( $p = 0.048$ ) \* 13 ( $p = 0.004$ ) and \* 15 ( $p = 0.021$ ) and the negative response of the anti-GAD.

The data demonstrate the strong involvement of HLA-II (DQ) with DM1 and surge that autoimmunity develops in the presence of genetic susceptibility to say, in association with specific alleles HLA-II.

**Keywords** - Type 1 Diabetes Mellitus, HLA-II, PCR-SSP, Anti-GAD

## ÍNDICE GERAL

1. INTRODUÇÃO .....	1
1.1. Diabetes <i>mellitus</i> tipo 1 .....	1
1.1.1. Epidemiologia .....	3
1.2. Antígeno Leucocitário Humano .....	5
1.2.1. Associação dos Genes do HLA com a DM1.....	6
1.3. Mecanismos Humorais .....	11
1.3.1. Anti-GAD vs. DM1 .....	13
2. JUSTIFICATIVA .....	17
3. OBJETIVOS.....	19
3.1. Objetivos Gerais.....	19
3.2. Objetivos Específicos .....	19
4. METODOLOGIA .....	21
4.1. Local de estudo .....	21
4.2. Universo.....	21
4.3. Amostra.....	21
4.4. Critério de Inclusão e Exclusão. ....	21
4.5. Variáveis. ....	22
4.6. Procedimentos laboratoriais. ....	22
4.6.1. Colheita do sangue. ....	22
4.6.2. ELISA anti-GAD.....	23
4.6.3. Extração do ADN.....	25
4.6.4. Amplificação do ADN.....	25
4.6.5. Identificação dos produtos de amplificação em gel de agarose.....	27
4.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA. ....	28
5. RESULTADOS. ....	29
5.1. Expressão das moléculas HLA-DQ/DR. ....	31
5.2. Associação entre as moléculas HLA-DQ/DR e DM1.....	35

5.2.1. Frequências dos diferentes alelos e genótipos HLA-DQB1 nos pacientes DM1 e controlos.....	35
5.2.2. Frequência dos diferentes alelos e genótipos HLA-DRB1 nos pacientes DM1 e controlos.....	37
<b>5.3. Avaliação da resposta autoimune.....</b>	<b>41</b>
5.3.1. Em função do tempo medio de diagnóstico.....	41
5.3.2. Em função da idade.....	42
5.3.3. Em função dos alelos e genótipos encontrados.....	42
<b>5.4. Frequência alélica e genotípica em DM1 e LADA.....</b>	<b>45</b>
<b>6. DISCUSSÃO .....</b>	<b>49</b>
<b>7. CONCLUSÕES .....</b>	<b>59</b>
<b>8. BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>63</b>
<b>9. APÊNDICES .....</b>	<b>73</b>

## ÍNDICE DE ABREVIATURAS

<b>Anti-GAD</b>	Anti-desidrogenase do Acido Glutâmico
<b>DM</b>	Diabetes Mellitus
<b>DM1</b>	Diabetes Mellitus Tipo 1
<b>DM2</b>	Diabetes Mellitus Tipo 2
<b>IA2</b>	Anti-Insulinoma
<b>ICA</b>	Anticorpo Anti-Ilhota
<b>IAA</b>	Anti Insulina
<b>HLA</b>	Sistema Antigénio Leucocitário Humano
<b>MHC</b>	Complexo Principal de Histocompatibilidade
<b>OMS</b>	Organização Mundial da Saúde
<b>PCR-SSP</b>	Reação de Polimerização em Cadeia com Iniciadores de Sequências Específicas.
<b>EDTA</b>	Ácido etilendiaminotetraacético
<b>TBE</b>	Tris / Borato/EDTA
<b>LADA</b>	Diabetes latente auto-imune do adulto
<b>GABA</b>	Ácido gama-aminobutírico
<b>RIE</b>	Radioimunoensaio
<b>T1DG</b>	<i>Type 1 Diabetes Genetics Consortium</i>
<b>NIH</b>	Instituto Nacional de Saúde
<b>dNTPs</b>	Desoxirribonucleotidos Trifosfatados
<b>DOPT</b>	<i>Diabetes Outcome Progression Trial</i>



## ÍNDICE DE TABELAS

TABELA I. Incidência da DM1 em países de África.....	4
TABELA II. Genes HLA-DQB1 de susceptibilidade a DM1.....	20
TABELA III. Alelos HLA associados ao maior risco e à proteção da DM1.....	20
TABELA IV. Cálculo para a mistura de PCR (HLA – DQ .....	33
TABELA V. Cálculo para a mistura de PCR (HLA – DR.....	33
TABELA VI. Caracterização das amostras DM1.....	37
TABELA VII. Caracterização dos controlos .....	38
TABELA VIII. Tipagem dos alelos para DM1 .....	39
TABELA IX. Tipagem dos alelos para os controlos.....	40
TABELA X. Distribuição dos grupos de alelos DQB1 nos DM1 e controlos .....	42
TABELA XI. Distribuição dos genótipos DQB1 nos DM1 e controlos... ..	43
TABELA XII. Distribuição dos grupos de alelos DRB1 nos DM1 e controlos .....	45
TABELA XIII. Distribuição dos genótipos DQB1 nos DM1 e controlo.....	46
TABELA XIV. Associação entre tempo de diagnóstico e o anti-GAD .....	47
TABELA XV. Associação entre a idade de diagnóstico e o anti-GAD. ....	47

TABELA XVI. Associação entre a frequência dos alelos HLA-DQ e a resposta anti-GAD.....	48
TABELA XVII. Associação entre a frequência dos genótipos HLA-DQ e a resposta anti-GAD.....	48
TABELA XVIII. Associação entre a frequência dos alelos HLA-DR e a resposta anti-GAD.....	49
TABELA XIX. Associação entre a frequência dos genótipos HLA-DR e a resposta anti-GAD.....	49
TABELA XX. Frequência dos alelos DQB1 em DM1 e LADA .....	50
TABELA XXI. Frequência dos genótipos DQB1 em DM1 e LADA.....	50
TABELA XXII. Frequência dos alelos DRB1 em DM1 e LADA.....	51
TABELA XIII. Frequência dos genótipos DRB1 em DM1 e LADA .....	51

## 1. INTRODUÇÃO

A etiologia da diabetes *mellitus* (DM) é complexa e não é totalmente compreendida, sabe-se que é uma doença multifactorial, que tem como característica geral o aumento de glicose no sangue. Ainda assim, muito tem havido enorme progresso no sentido da melhoria da compreensão da base genética desta síndrome que é, ainda uma causa importante de doença cardíaca e derrame cerebral (AMERICA DIABETES ASSOCIATION, 2006). O aparecimento e aplicação de novas tecnologias têm permitido aumentar o conhecimento relacionado a fisiopatologia da DM levando a uma melhor compreensão das suas bases imunológicas, da sua susceptibilidade genética, assim como uma melhor compreensão do papel desenvolvido pelo ambiente, pela dieta e pelo estilo de vida.

Os critérios para o diagnóstico e classificação da diabetes são diversos e variam de país para país. A classificação proposta pela Organização Mundial de Saúde (AMERICA DIABETES ASSOCIATION, 2013) tem em consideração a etiologia da diabetes e inclui quatro tipos:

1. **Diabetes *mellitus* tipo 1 (DM1);**
2. **Diabetes *mellitus* tipo 2 (DM2);**
3. **Outros tipos específicos de DM** (defeitos na ação da insulina, doença do pâncreas, endocrinopatias, infecções, indução química ou por drogas, formas incomuns de diabetes mediada imunologicamente e outras síndromes associadas);
4. **Diabetes gestacional.**

Em Angola pouco se sabe sobre a etiologia da DM1 sendo, por tanto, a importância deste trabalho é conhecer os aspectos essenciais sobre a predisposição genética deste tipo de DM na população.

### 1.1. Diabetes *mellitus* tipo 1

A DM1 é definida como uma doença resultante da destruição das células beta das ilhotas de Langerhans do pâncreas, atribuível quer a um processo autoimune, quer a uma causa desconhecida (DM idiopática). Como consequência desta destruição a produção de

insulina acaba por diminuir para níveis abaixo de um limiar crítico para o indivíduo, terminando numa carência absoluta de insulina (Lima, 2001). Portanto, nesta patologia a terapia hormonal com insulina é fundamental para a sobrevivência dos pacientes.

A DM1 é considerada o distúrbio endócrino-metabólico crônico mais frequente na infância podendo ocorrer em qualquer idade, manifestando-se geralmente abaixo dos trinta anos (America Diabetes Association, 2013).

Durante a progressão da doença, a velocidade de destruição das células beta é muito variável, podendo ser rápida em algumas pessoas e lenta em outras. (Skyler, 2010). A forma de progressão lenta ocorre, geralmente, nos adultos e, por vezes, é referida como diabetes autoimune latente do adulto (LADA) (Cernea, 2009).

Alguns doentes, particularmente as crianças e os adolescentes, podem apresentar cetoacidose como primeira manifestação da doença. Outros têm uma hiperglicemia ligeira em jejum que pode evoluir, rapidamente, para uma hiperglicemia grave e/ou cetoacidose na presença de uma infecção ou de outra situação de *stress*. (Sperling, 2002). Em outros, particularmente adultos, as células beta podem manter uma função residual, durante muitos anos, suficiente para prevenir cetoacidose (WHO, 2007).

Outros, porém referem uma insulinopenia permanente e tendência para cetoacidose mas, não apresentam qualquer evidência de um processo autoimune sendo assim classificado como de Tipo 1 idiopático (Mclarty et al., 1990; American Diabetes Association, 1997). Esta forma de diabetes é mais comum nos indivíduos oriundos de África e da Ásia (Hagopian et al., 1995). Outra forma característica em Africanos caracteriza-se por uma cetoacidose de manifestação periódica em indivíduos sujeitos a uma terapêutica de substituição com insulina que pode não ser constante (Ahren e Corrigan, 1980).

De forma a esclarecer os mecanismos etiopatológicos da DM1 e da patogénese das suas complicações, estudos epidemiológicos têm permitido identificar os diversos factores de risco para seu desenvolvimento sendo assim dados de grande valor para estabelecer o perfil dos pacientes e definir meta a serem traçadas quanto ao manejo da doença.

### 1.1.1. Epidemiologia

Actualmente a DM1 atinge um número considerável de pessoas. No mundo estima-se que exista 12 milhões de casos, sendo que este valor tende a dobrar em 2030 (WHO, 2007). A sua incidência varia largamente entre populações e áreas geográficas. Americanos de origem africana e os hispânicos têm menor incidência que caucasianos residentes na mesma área (Laport, 1984). As maiores taxas de incidência mundial ocorrem na Finlândia e Sardenha (Itália), com aproximadamente de 40/100.000 habitantes/ano, seguidas por outras populações caucasianas na Europa e América (cerca de 10-20/100.000 habitantes/ano). Finalmente, os países asiáticos (Japão, China e Coreia), apresentam as menores taxas mundiais (inferiores a 3/100.000 habitantes/ano) (Karvonen et al., 2000).

Em 2010 a DM1 acometia 479,6 mil crianças entre zero e 14 anos no mundo, e a sua incidência se mostrava em franca ascensão de 3% ao ano (International Diabetes Federation, 2010). Há um aumento na incidência anual em Europa e uma tendência de aumento entre as crianças mais jovens. Curiosamente, os países de incidência mais baixa da Europa Oriental têm um rápido aumento na incidência anual (por exemplo: Roménia e Polónia). Este aumento na incidência não pode ser atribuído à mutação genética da população mas sim, a mudança no estilo de vida e a prática de uma melhor higiene do meio ambiente, sendo esta a causa mais provável para tal aumento (Sanjeevi, 2009).

Achados clínicos sugerem que as características da DM1 em África Subsaariana podem diferir daquelas em populações europeias. Por exemplo, a idade de início tende a ser mais tardia, em comunidades africanas, em média, 22-29 anos, a preponderância em mulheres foi relatada na África do Sul (Kalk, 1993).

Os dados sobre a incidência da DM1 em África são poucos (figura 1), embora exista alguns trabalhos que reportam dados do continente (tabela I)

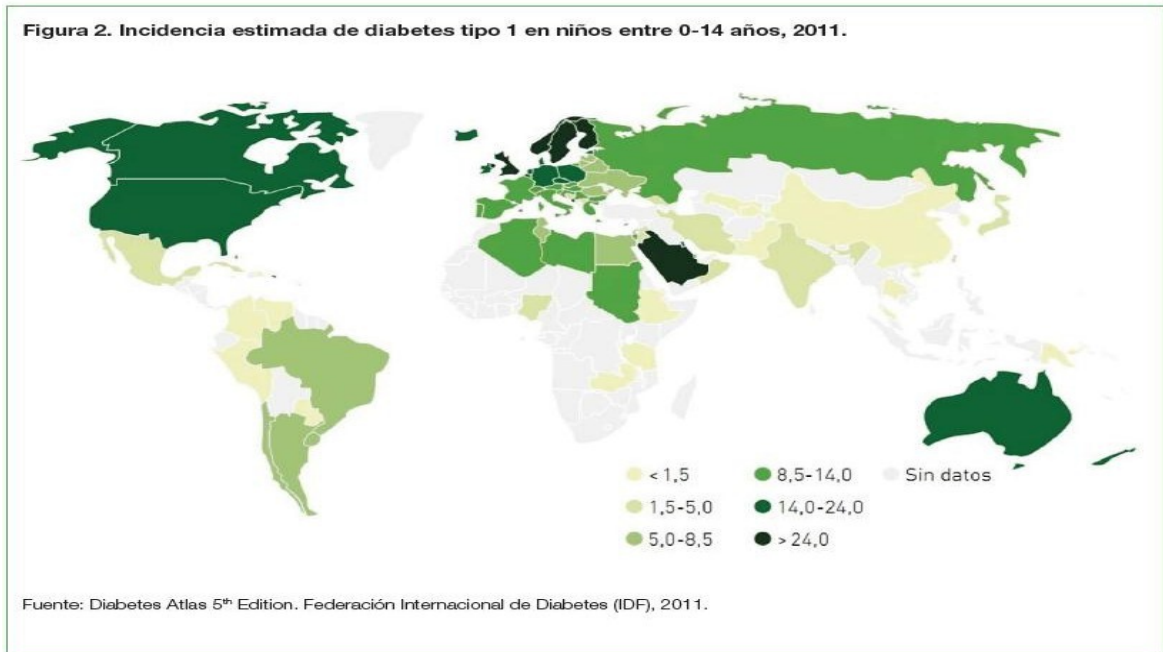


FIGURA 1. Mapa de Incidência da DM1

TABELA I. Incidência da DM1 em países de África

	Incidência
Argélia	0,27/1 000
Gana	0,75/1000
Nigéria Igbo	0,25-0,46/ 1 000

Fonte:PADOA,2011

Em Bengo, uma população rural de Angola, achou-se uma prevalência da DM de 2,8% (Neto, et al., 2010). Foi o primeiro e único estudo realizado em Angola até a data.

As explicações para estas diferenças regionais e étnicas na prevalência da DM sugerem a influência de factores genéticos e ambientais. Nesta direção novas abordagens foram descritas pela *Type 1 Diabetes Gentic Consortium* (T1DGC) com o apoio do Instituto Nacional de Saúde (NIH) (Sanjeevi, 2009).

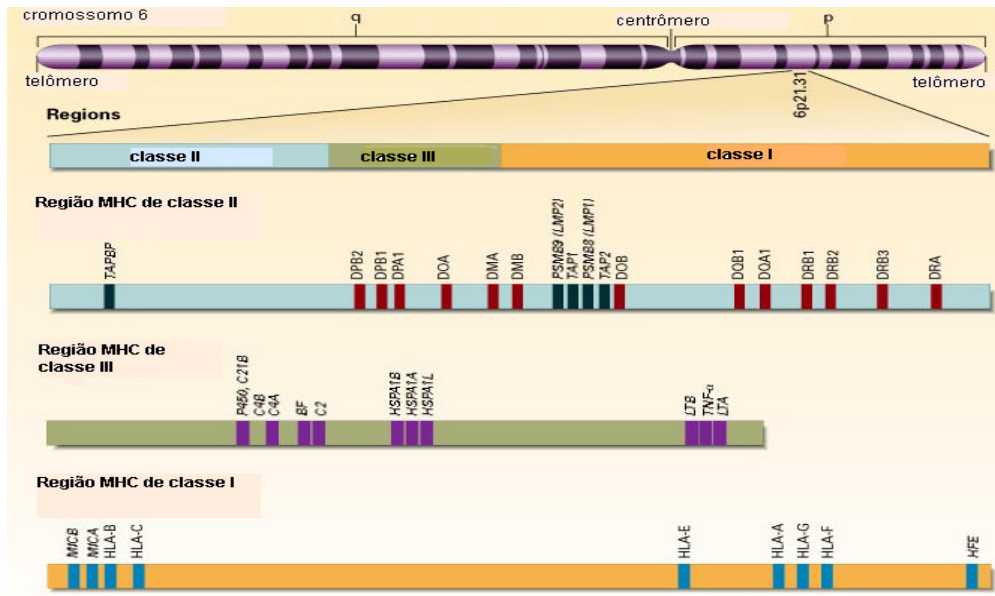
## 1.2. Antígeno Leucocitário Humano

Os genes que codificam as proteínas estruturais do sistema de histocompatibilidade humano são assim chamados porque, quando foram descritos pela primeira vez, eram os principais elementos genéticos relacionados com a rápida rejeição de tecidos transplantados em animais de laboratório, particularmente em ratos, sendo em conjunto denominados MHC. Assim, o MHC representa o conjunto de genes responsável por codificar as moléculas do HLA. No ser humano está localizado no braço curto do cromossoma 6, e, didacticamente, esses genes podem ser reunidos em 3 grupos, denominados genes de classe I, II e III (figura 2).

Os genes de classe I codificam as moléculas clássicas de histocompatibilidade HLA-A, B e C.

Os genes da classe II codificam as moléculas clássicas HLA-DR, DQ e DP, que estão presentes constitutivamente apenas nas superfícies de alguns tipos celulares como macrófagos, linfócitos B e células dendríticas, colectivamente denominadas de células apresentadoras de antígenos. Estas moléculas são heterodímeros formados por uma cadeia  $\alpha$  e uma  $\beta$ , ambas codificadas por genes situados no MHC, ou seja, no cromossoma 6. Estes contêm dois domínios  $\alpha_1/\alpha_2$  e  $\beta_1/\beta_2$  com cerca de 90 resíduos para as moléculas HLA-DQ e DP. Entre os domínios  $\alpha$  e  $\beta$  os que apresentam maior polimorfismo são  $\alpha_1$  e  $\beta_1$ . No entanto para as moléculas HLA-DR, o polimorfismo ocorre apenas no domínio  $\beta_1$  da cadeia  $\beta$ , sendo sempre não polimórfica a cadeia  $\alpha$ . (Noble ;Valdes, 2011).

Os genes de classe III, embora estejam incluídos dentro do MHC, não codificam moléculas de histocompatibilidade, e sim outras moléculas, algumas delas fazendo parte do sistema imune enquanto outras não. Assim, as proteínas C4 e C2 da via clássica do complemento o factor B da via alternativa, os factores de necrose tumoral (TNF- $\alpha$  e TNF- $\beta$ ). A proteína do choque térmico (Hsp 70) e as enzimas 21-hidroxilase são moléculas incluídas na região de classe III. (Pociot et al., 2010).



**FIGURA 2.** Representação esquemática do cromossoma seis humano, com as regiões do Complexo de Histocompatibilidade (MHC) e o sistema genético HLA.

Em laranja, está representada a região de classe I, em azul a região de classe II e em verde a região de classe III. Fonte: Klein e Sato, 2000. Apesar dos produtos MHC terem um papel crucial na regulação da resposta imune, alguns haplótipos HLA têm sido associados com a predisposição a doenças imunes. Atualmente sabe-se que a susceptibilidade à DM1 é muito complexa e que envolve a combinação de diferentes alelos HLA, classe II, promovendo efeitos antagônicos ou sinérgicos. Assim os estudos genéticos em diabéticos tipos 1 são complicados pela heterogeneidade de diferentes populações e grupos étnicos. A contribuição de um gene varia com o desequilíbrio de ligação e interação com outros genes, que podem diferir entre as populações. Variantes que conferem pequeno risco para a doença podem induzir alterações no gene candidato, contribuindo para a destruição autoimune (Van Lumen et al, 2012).

### 1.2.1. Associação dos Genes do HLA com a DM1

HLA-DQ e HLA-DR são os principais elementos genéticos associados com a de diabetes do tipo 1 humana. Codificados para proteínas heterodiméricas polimórficas, cuja principal função é a de interceptar .

Antígenos peptídicos no endossoma e apresentá-los na superfície de células apresentadoras de antígenos (células dendríticas, linfócitos B, monócitos / macrófagos) para CD4 (+) células T auxiliares (Eisenbarth, 2010). A investigação sistemática das propriedades

moleculares dos alelos **HLA-DQ** relacionadas com a susceptibilidade ou resistência a diabetes tipo 1 tem mostrado que essas propriedades são segregadas ao longo das linhas de susceptibilidade ou resistência.

Uma correlação destas características com a função de cada segmento particular da molécula de **HLA-DQ** produz perspectivas interessantes para as vias possíveis que conduzem a diabetes tipo 1. Restam, no entanto, áreas a ser esclarecidas, incluindo os mecanismos pelos quais a protecção dominante é conferida por certos alelos, a interacção entre **HLA-DQ** e o *locus* relacionado **HLA-DR** (Ere e Travers, 2000).

Os primeiros estudos acerca da susceptibilidade imunogenética a DM1 datam da década de 70, sendo encontradas associações com as moléculas **HLA-B8** e **B15**. Posteriormente verificou-se que as associações mais importantes eram com as moléculas de classe II, **HLA-DR3** e **HLA-DR4**, em desequilíbrio de ligação com os antígenos **HLA-B8** e **B15**, respectivamente. Subsequentemente, os genes **DQA1\*0301** e **\*0501** e os **DQB1\*0201** e **\*0302** revelaram-se os mais fortemente associados à doença (Nepom e Kwok, 1998). Actualmente tem sido sugerido que ambos genes **DR** e **DQ** influenciam na susceptibilidade ou protecção á DM1, promovendo efeitos sinérgicos ou antagonistas de acordo com o haplotipo (She, 1996; She e Marron, 1998).

Na população em geral, apenas metade das pessoas herdam uma cópia (alelo) do gene chamado **DR**, **DR3** e **DR4** e menos de 3% das pessoas têm dois alelos. No entanto, na diabetes tipo 1, pelo menos, um alelo de **DR3** ou **DR4** é encontrado em 95% de caucasianos, e os indivíduos com ambos **DR3** e **DR4** são particularmente susceptíveis a diabetes tipo 1. Inversamente, o alelo **DR2** tem uma função protectora (DEAN, 2004). Similares ao gene **DR**, certos alelos do gene **DQ** são factores de risco para o desenvolvimento da doença, enquanto outros alelos de **DQ** são protectores. Há também uma tendência para as pessoas que herdam **DR3** ou **DR4** para herdar a **DQ**, o que aumenta o seu risco genético de desenvolver diabetes. Por outro lado, os alelos de protecção de **DR** e **DQ** tendem a ser herdados juntos. Estas tendências têm complicado o estudo dos efeitos dos genes **HLA-DR** ou **HLA-DQ** sobre o indivíduo (Mackay e Rosen, 2000).

Em caucasianos, os indivíduos heterozigóticos **HLA-DR3/DR4** apresentam risco relativo (RR) mais elevado para o desenvolvimento da doença. Em contraste, o antígeno **HLA-DR2** e mais fracamente os **HLA-DR5** são raramente encontrados entre os pacientes com DM1, estando associados com resistência ao desenvolvimento da doença (Nepom, 1990). Neste grupo, a susceptibilidade a DM1 está associada com os haplotipos **HLA-DRB1\*03-DQA1\*0501-DQB1\*0201** e **HLA-DRB1\*04-DQA1\*0301-DQB1\*0302**, enquanto o haplotipo **HLA-DRB1\*1501-DQA1\*0102-DQB1\*0602** está fortemente associado com protecção contra o desenvolvimento da doença (Boitard, 1997).

No final da década de 80, verificou-se que os haplótipos **HLA-DR/DQ** que conferiam susceptibilidade a doença tinham características peculiares, sendo que o haplótipo **HLA-DRB1\*04/DQB1\*0302** estava associado ao desenvolvimento da doença e o **HLA-DRB1\*04/DQB1\*0301** não estava (Nepom e Know, 1998). A diferença entre os alelos **HLA-DQB1\*0302** e **DQB1\*0301** está localizada em uma sequência de nucleótidos, correspondente ao primeiro domínio polimórfico da molécula **DQB**, onde existem apenas quatro codões responsáveis pela síntese de aminoácidos presentes no sulco de ligação da molécula HLA. Um desses codões, localizado na posição 57 nos alelos de resistência, apresenta o resíduo ácido aspártico. Nos alelos de susceptibilidade, esse aminoácido não é encontrado na posição 57, sugerindo que a presença de um resíduo diferente dele nessa posição estaria correlacionada com susceptibilidade a doença. No entanto, em japoneses, a molécula **HLA-DQ** que confere susceptibilidade a diabetes apresenta ácido aspártico na posição 57 (Nepom, 1995).

Em estudos realizados em populações altamente miscigenadas, como é o caso da população brasileira, encontrou-se que os haplótipos **HLA-DR3 /DR4** e **HLA- DQB1\*0302** conferem susceptibilidade ao desenvolvimento da doença (Eizirik, 1987).

Na genotipagem realizada na população Jamaicana o maior risco relativo (RR) foi associado com o haplótipo **DRB1 \* 03-DQ2/DRB1 \* 04-DQ8**, enquanto que os haplótipos **DRB1 \* 0401-DQ8** e **DRB1 \* 0408-DQ8** foram positivamente associados com a doença ao contrário do que acontece nos caucasianos onde, o haplótipo **DRB1 \* 0408-DQ8** é incomum e o **DRB1 \* 0401-DQ8** é o haplótipo da maior predisposição. O

haplótipo **DRB1 \* 1503-DQ6** foi associado com a protecção de diabetes na população jamaicana, este haplótipo é raro entre os caucasianos, sendo o **DRB1 \* 1501-DQ6** o haplótipo associado a protecção em caucasianos (Heward, et al., 2002).

O estudo realizado em Xhosa (um grupo étnico sul-africano que fala a língua xhosa) associa a doença com o haplótipo **DRB1 \* 14011**, com semelhança notável para grupo africano caucasoídes e europeus e as suas populações parentais. (Lombard, 2006). Outro estudo realizado em um grupo de indivíduos Zulu em Durban, KwaZulu-Natal, através do PCR-SSP, identificam que os haplótipos **HLA-DQB \* 0302** ( $p < 0,0001$ ), **DRB1 \* 09** ( $p < 0,0001$ ), **DRB1 \* 04** ( $p=0,002$ ), **DRB1 \* 0301** ( $p=0,003$ ), **DQB\* 02** ( $p=0,004$ ) e **DQA \* 03** ( $p=0,035$ ), estavam associados com a doença, enquanto os haplótipos **HLA-DRB1 \* 0301-DQA \* 0501**, **DRB1 \* 04-DQA \* 03**, **DRB1 \* 04-DQB \* 0302**, **DRB1 \* 0301-DQB \* 0201**, **DQA\* 0501-DQB \* 0201** e **DQA \* 03-DQB \* 0302**, foram associados positivamente ( Pirie,et al., 2001).

No Camarões encontrou-se uma alta-frequência dos alelos **DRB1\*03** ( $p=0.001$ ), **DRB1\*1301** ( $p<0.0001$ ), **DQA1\*0301** ( $p=0.001$ ) e **DQB1\*0201** ( $p<0.001$ ) em pacientes diabéticos comparados com o grupo controlo. Os alelos mais frequentes no grupo controlo foram **DQA1\*01**, **DQB1\*0602** e **DRB1\*15**. Os alelos **DRB1\*04** não foram associados com a DM1 (Mbanva et al., 2001).

Assim, o risco associado ao genótipo HLA é definido pela combinação de alelos de suscetibilidade e de protecção, sendo que as moléculas **HLA-DQ** são as mais importantes na susceptibilidade da doença. A sua associação a **DR** deve-se ao desequilíbrio de associação entre os alelos existentes entre os genes **HLA-DR** e **DQ** (Thorsby et al, 1991; Vicario et al., 1992).

A tabela II enumera os principais alelos **HLA-DQB1** relacionados à doença e indica os haplótipos MHC de classe II de susceptibilidade.

**TABELA II. Genes HLA-DQB1 de susceptibilidade á DM1.**

Alelos HLA-II de susceptibilidade	Haptótipo DQ-DR	RR
DQB1*0302	DQB1*0302-DQA1*0301-DRB1*04	~8
DQB1*0201	DQB1*0201-DQA1*0501-DRB1*03	~4
DQB1*04	DQB1*04-DQA1*0301-DRB1*04	~4
DQB1*0303	DQB1*0303-DQA1*0301-DRB1*09	~4

Fonte: Atkinson e Eisenbarth, (2001)

Legenda: RR – Risco relativo.

A **tabela III** enumera os alelos associados a maior risco e á protecção da DM1 (BOITARD, C et al., 1997).

**TABELA III. Alelos HLA associados ao maior risco e protecção da DM1.**

		HLA DRB1	HLA DQA1	HLA DQB1
<b>Risco</b>	Alto	0401, 0402, 0405	0301	0302
		0301	0501	0201
	Moderado	0801	0401	0402
		0101	0101	0501
		0901	0301	0301
<b>Protecção</b>	Fraca ou moderada	0401	0301	0301
		0402	0301	0302
		0701	0201	0201
		1101	0501	0301
	Alta	1501	0102	0602
		1401	0101	0503
		0701	0201	0303

Fonte: BOITARD, C et al., (1997).

Alguns estudos tentam explicar a natureza autoimune da DM1 por diferentes mecanismos. O ataque ao sistema imunológico é indicado pelo facto de ser detectado, nesses pacientes, anticorpos contra a insulina, as células beta e de algumas das proteínas insulares. (Abbas, 2002).

Embora nem todos os indivíduos que tenham auto-anticorpos desenvolveram DM1 a sua identificação é fundamental para identificação de grupos de risco para a diabetes. A sua determinação é de fácil realização e reprodutibilidade, podendo auxiliar no diagnóstico precoce e na prevenção de episódios de cetoacidose em familiares de diabéticos. (Gillespie, 2006).

### 1.3. Mecanismos Humorais

O estágio pré-clínico da DM1 é caracterizado pela presença de auto-anticorpos contra constituintes da célula beta pancreática, que participam na sua autodestruição. Estes anticorpos têm sido descritos desde a década de 80 e sua presença indica a existência de um processo autoimune que pode levar a destruição das células beta pancreáticas. Os auto-anticorpos são marcadores do processo autoimune e não agentes patogénicos (Atkinson e Eisenbarth, 2001). Pacientes diabéticos com auto-anticorpos presentes são considerados como do tipo 1 e os clinicamente determinados são: anti-Insulina (IAA), anticorpo anti-Ilhota (ICA), anti-desidrogenase do ácido Glutâmico (anti-GAD) e anti-Insulinoma (IA2).

Os anticorpos **IAA** são os únicos específicos da célula beta e devem ser medidos antes de iniciar o tratamento com insulina. São medidos principalmente por radioimunoensaio (RIE) e o resultado é expresso como positivo ou negativo. Em crianças com menos de 10 anos de idade, a presença dos anticorpos anti-insulina pode preceder os outros e nestes casos a sua medição deve ser incluída (Bingley, 2001) nos protocolos clínicos de diagnóstico complementar.

Os **ICAs** policlonais do tipo IgG que reagem com todos os componentes das ilhotas são anticorpos. O **anti-GAD** e **anti-IA2 (ICA512)** são subfrações do **ICA**. Foram os primeiros a serem relacionados a presença de DM1 autoimune e são medidos por imunofluorescência indireta, utilizando idealmente pâncreas humano. É um método laborioso com muitas exigências técnicas. Estão presentes em cerca de 70 a 80% dos pacientes DM1 logo após o diagnóstico, mas tendem a desaparecer após 2 a 3 anos de duração da doença. (Setermeim, 2007). Estudos em pacientes da África do Sul relatam uma

ocorrência de ICA de 36% em pacientes com DM1 (Omar, 1986), e uma ocorrência de 43% em pacientes da Etiópia (Peter, 1986).

Os anticorpos **anti-GAD** são encontrados em cerca de 80% dos pacientes tipo 1 de instalação recente (Bingley, 2001) e são ainda detectados em 50% dos pacientes após 10 anos de diagnóstico, ao contrário dos demais anticorpos detectáveis em pacientes diabéticos (Neptom, 1995). Diversas metodologias têm sido usadas para a detecção do anti-GAD, por exemplo o RIE. A especificidade deste teste é em torno de 98% (Atkinson, 2001; Bingley, 2001). Num estudo da África do Sul em 2002 onde foi utilizado o RIE, identificou-se anticorpos GAD em 44% dos pacientes com DM1 (Nepom, 1995).

Os anticorpos **anti-IA2** são dirigidos contra uma proteína da família da fosfatase da tirosina, um grupo de enzimas relacionadas à função de receptor e de sinalização intracelular. Estão presentes em 60% dos pacientes no diagnóstico e a avaliação do subclone ICA512 está disponível (Wiest – Ladenburger, 1997).

Alguns estudos têm mostrado que, o anti-GAD e anti-IA2 desaparecem com o tempo (Savola, 1998), enquanto outros têm mostrado um aumento de auto-anticorpos com o tempo (Decochez, 2000).

Os estudos em populações caucasianas revelaram uma ocorrência de 80-90% de auto-anticorpos em pacientes recentemente diagnosticados com DM1 (Landin, 1992; Notkins, 2001). No geral, os caucasianos tendem a ter uma prevalência maior de todos os anticorpos (89,9%) no início da doença, quando comparados com os negros, (46,5%) (Libman, 1998; Neufeld, 1980).

A medição dos anticorpos está indicada principalmente para definir o tipo de diabetes em um paciente já com o diagnóstico estabelecido com o objectivo de evitar o início de um tratamento incorreto com agentes orais em pacientes com DM1. Sendo assim alguns estudos revelam que, pacientes considerados inicialmente como tipo 2 apresentavam altos níveis de anticorpos anti-GAD sendo estes incluídos na categoria de LADA (Niskanen, 1995; Pozzilli, 2001).

Ainda sobre auto-anticorpo anti-GAD pode-se dizer que é considerado o exame de preferência para confirmar o diagnóstico da diabetes autoimune e a sua determinação é mais reprodutível e mais simples de ser realizada, em relação aos outros anticorpos.

As características acima descritas justificam a escolha anti-GAD no presente estudo.

### 1.3.1. Anti-GAD vs. DM1

No soro da maioria dos portadores da "*stiff-man syndrome*" observa-se a presença de anticorpos contra uma enzima a descarboxilase do ácido glutâmico (GAD). Esta enzima participa na biossíntese do neurotransmissor inibidor, ácido gama-aminobutírico (GABA). Ela concentra-se seletivamente nas terminações nervosas GABAérgicas e, fora do sistema nervoso central, nas células beta Pancreáticas. Recentemente, a enzima descarboxilase do ácido glutâmico foi identificada como sendo o auto-antigénio de peso molecular 64000 (64kd) das células  $\beta$  pancreáticas. A enzima consiste em duas isoformas, GAD65 (células beta) e GAD67 (no cérebro), é considerada um dos mais importantes antigénios envolvidos na patogénese da DM1, sendo GAD65 o principal alvo dos auto-anticorpos para o GAD (Ohta, 1995).

Estudos em populações caucasianas revelaram uma ocorrência de 80-90% dos auto-anticorpos em pacientes recentemente diagnosticados com DM1 (Landin, 1992; Notkins, 2001). Relatórios da Ásia têm demonstrado uma ocorrência de auto-anticorpos na ordem dos 83,3% – 90% em pacientes japoneses (Akamine, 1997; Kawasaki, 2004).

Diabéticos tipo 1 diagnosticados há mais de três anos, no Sul do Brasil, com idade média de 27 anos (metade homens, metade mulheres) foram identificados como positivos para o anti-GAD na ordem dos 63,8%, e esta proporção foi significativamente maior do que no grupo controlo. Estes resultados mostram a alta prevalência de anti-GAD indicando que o anticorpo esteve presente longo tempo após a doença ter sido diagnosticada. (Moreira, 2011).

Em diabéticos tipo 1 de origem africana do Hospital Muhimbil em Dar e Salaam, na Tanzânia, encontrou-se uma ocorrência de 42,6% destes anticorpos (Lutale, 2007). Achados semelhantes foram encontrados em pacientes etíopes sul-africanos (Omar, 1986; PANZ, 2000), assim como em outras populações não-caucasianos. Na Arábia Saudita, por exemplo, obteve-se 54% (Damanhour, 2005).

Em outro achado não se observou correlação entre o tempo de diagnóstico da doença e detecção de auto-anticorpos mas sim, uma forte associação com a história familiar de diabetes entre os pacientes de auto-anticorpos positivos versus auto-anticorpos negativos com DM1, o que está de acordo com a noção bem conhecida que a diabetes autoimune tem uma base genética (Altobelli, 1998; Sia, 2005).

Nos últimos tempos demonstrou-se que o ensaio anti-GAD também tem um papel importante no diagnóstico e classificação da diabetes na vida adulta apresentando desde uma proporção de adultos que se apresentam com DM2 aparente, mas que na realidade têm uma insulite (infiltração linfocitária por células T), evoluindo lentamente a autoimune, uma condição conhecida como diabetes LADA e que ainda carece de definição e devido a seu espectro patofisiológico e clínico a situa entre DM1 e DM2.

Achados demonstram que o LADA é o responsável por 10 % de todos casos de DM1 e responde pelo segundo pico de incidência de diabetes autoimune, mas tardio, já na maturidade, entre os 50 e os 60 anos de idade bastante distante do pico conhecido da criança e adolescente (Turner, 1997; Vandewalle, 1995; Krulewski, 1997; Roglic, 1995; Blohne, 1992; Karjalainen, 1989).

Em um estudo realizado, em pacientes diagnosticados como DM1 e aqueles identificados como LADA com títulos elevados de anti-GAD, um total de 84 % progrediram para necessidade de insulino-terapia, após 6 anos. Só 50% daqueles apresentaram títulos baixos de anti-GAD e 40% dos DM2, precisaram de tratamento. Este resultado foi associado a progressiva deterioração da função das células beta nestes pacientes (Rosário, 2007).

Num grupo de nigerianos na faixa etária de 50-59 anos que, até então havia sido tratado como DM2, foi diagnosticado que a maioria (48%) era anti-GAD positivo, sendo posteriormente reclassificados como LADA. (Olufunmiayo, 2012).

Dos resultados anteriores pode-se concluir que a determinação do processo etiológico da DM1 pode ser melhor identificado e sub-classificado se forem realizadas determinações apropriadas dos anticorpos. Reconhece-se que, actualmente, tais determinações são pouco frequentes ou completamente nulas em alguns países como no caso de Angola.

A experiência até hoje vivida pelos profissionais de saúde demonstra que, em algumas circunstâncias a distinção do tipo de diabetes é mais difícil, sendo necessário medir os auto-anticorpos relacionados com a insulite em pacientes com o diagnóstico estabelecido. O anti-GAD é o anticorpo de eleição para confirmar o tipo de DM em estudo. A técnica revela-se simples, quando comparada a medição de outros anticorpos. A sua presença após o estabelecimento da patologia também favorece o seu uso ao permanecer por mais tempo uma vez diagnosticada a patologia.

Considerando que a síndrome se tornou nos últimos tempos um grande problema de saúde pública e o facto de não existirem estudos genéticos até a data em Angola, justifica-se a necessidade de se identificar a frequência do HLA relacionada à DM1, na população angolana. Trata-se de um trabalho preliminar, numa população que apresenta um rico *pool* genético devido a diversidade de grupos populacionais constituindo uma oportunidade única para estudar a predisposição genética de doença, influenciada pelos mesmos factores ambientais.



## 2. JUSTIFICATIVA

Atualmente a DM1 é uma doença que tem despertado o interesse de muitos profissionais da saúde pois é uma patologia crónica de grande escala em todo mundo. Considerando que a síndrome se tornou nos últimos tempos um grande problema de saúde pública, é de extrema importância iniciar ou dar continuidade a trabalhos voltados para este problema tendo em conta que o número de diabético vem crescendo e com eles os problemas colaterais.

Considerando que o sistema HLA está envolvido na susceptibilidade da DM1, o análise do polimorfismo dos genes do HLA-II (alelo DQ e DR) nos portadores de DM1 na população Angolana constitui uma oportunidade única para o início do esclarecimento a respeito da associação deste alelos com a susceptibilidade a DM1 nesta população. Considerando o facto de não existirem estudos genéticos até a data em Angola trata-se de um trabalho preliminar, numa população que apresenta um rico *pool* genético devido a diversidade de grupos populacionais constituindo uma oportunidade única para estudar a predisposição genética de doença, influenciada pelos mesmos factores ambientais.

Tendo em conta estes argumentos e considerando a escassez de estudos afins na população angolana decidiu-se realizar o presente estudo perseguindo os objectivos que a seguir discriminamos.



### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. Objetivos Gerais

Estudar a frequência dos polimorfismos HLA-DR/DQ em pacientes angolanos portadores de diabetes tipo 1, residentes em Luanda .

#### 3.2. Objetivos Específicos

1. Tipificar os alelos HLA-DRB1 e DQB1 na amostra estudada (pacientes angolanos residentes em Luanda);
2. Comparar a expressão dos alelos determinados com os alelos de susceptibilidade já descritos na literatura;
3. Avaliar a resposta autoimune em doentes DM1.



## 4. METODOLOGIA

O tipo de delineamento adotado foi caso-controlo.

### 4.1. Local de estudo

O estudo foi realizado em hospitais e clínicas da cidade Luanda a citar Hospital Pediátrico, Hospital Militar de Luanda, Hospital Américo Boavida, Hospital de Prenda, Clínica Sagrada Esperança, Clínica Girassol e no laboratório *LABGENE* da Faculdade de Medicina da Universidade Agostinho Neto.

### 4.2. Universo

O universo esteve constituído por todos os pacientes que se apresentaram à consulta externa dos hospitais e clínicas seleccionadas, no período de outubro de 2012 e outubro de 2013.

### 4.3. Amostra

A população de estudo foi constituída por dois grupos, um deles pertencia aos indivíduos portadores de diabetes tipo 1 (caso) em acompanhamento na consulta externa de medicina interna e/ou endocrinologia; o segundo grupo por indivíduos normoglicémicos considerados não portadores da doença (controlo) em acompanhamento nas mesmas unidades de saúde.

### 4.4. Critério de Inclusão e Exclusão.

Foram incluídos no presente estudo, indivíduos de ambos os sexos, sem limite de idade, nacionais residentes em Luanda.

Os pacientes com diagnóstico prévio de diabetes tipo 1, que frequentaram a consulta externa de medicina interna e/ou endocrinologia, no período de estudo, foram identificados como caso. Aqueles que não colaboraram devidamente durante a pesquisa foram excluídos.

O grupo controlo foi selecionados dos mesmos locais de estudos, mas de outras consultas externas, todos normoglicemicos; sendo excluídos aqueles que a priori apresenta-se sinal de doença autoimune.

Os dados de todos os voluntários foram obtidos e registados através de um questionário (**Apêndice A**) e os mesmos assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (**Apêndice B**).

#### **4.5. Variáveis.**

As variáveis estudadas foram:

1. Idade
2. Tempo de diagnóstico
3. Género
4. Anti-GAD
5. Alelos
6. Genótipos

#### **4.6. Procedimentos laboratoriais.**

Neste estudo foi utilizado como amostra biológico sangue periférico.

##### **4.6.1. Colheita do sangue.**

Foram colhidos 5 ml de sangue periférico em tubo de ensaio contendo ácido etilenodiaminotetra-acético (EDTA). A amostra foi subdividida em duas alíquotas. Uma delas foi centrifugada à temperatura de 25°C, 3000 rpm durante 10 minutos. O sobrenadante (plasma), foi colhido em tubos de *eppenderford* e imediatamente junto à

segunda alíquota congelada a  $-20^{\circ}\text{C}$  até a realização dos procedimentos seguintes de determinação de anticorpos, extração de ADN e genotipagem HLA.

#### 4.6.2. ELISA anti-GAD.

A determinação do auto-anticorpo foi realizada de acordo as instruções do fabricante (*anti-GAD ELISA, EA 1022-9601 G da EUROIMMUN*). Os auto-anticorpos humanos determinados por ELISA são especificamente contra isoforma GAD65.

O protocolo estava estruturado por quatro passos que incluem a incubação das amostras, incubação do anti-GAD e do conjugado e por fim incubação do substrato.

**1º Passo:** Incubação da amostra .

Foram transferidos 25 ul dos calibradores, controlos positivo, negativo e amostra nos poços individuais da microplaca segundo o seguinte protocolo de pipetagem:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	C1	A1	A9	A17								
B	C2	A2	A10	A18								
C	C3	A3	A11	A19								
D	C4	A4	A12	A20								
E	C5	A5	A13	A21								
F	C6	A6	A14	A22								
G	NEG	A7	A15	A23								
H	POS	A8	A16	A24								

A seguir foram todos incubados por 60 minutos a temperatura ambiente com uma agitação de 500 rpm. No fim deste tempo os poços foram esvaziado e lavados de forma subsequentes por três vezes utilizando 300 ul de solução de lavagem, foi retirado todo o liquido da microplaca batendo-a em papel absorvente com as cobertura para abaixo de forma a remover todo o tampão de lavagem residual.

**2º Passo:** Incubação do anti-GAD.

Foi pipetado 100  $\mu$ l de anti-GAD biotilado em cada poço da microplaca, e logo a seguir foram incubados por 60 minutos a temperatura ambiente com uma agitação de 500 *rpm*, a seguir foi realizada a lavagem com descrita no 1º passo.

### **3º Passo: Incubação do Conjugado.**

Foi pipetado 100  $\mu$ l do conjugado (peroxidase marcada com avidina) em cada poço da microplaca, uma vez coberta, foi incubado por 20 minutos a temperatura ambiente com agitação de 500 *rpm*, a seguir foi realizada a lavagem com descrita no 1º passo.

### **4º Passo: Incubação do substrato.**

Foi pipetado 100  $\mu$ l da solução substrato / cromogéneo em cada poço da microplaca. Foi incubada por 20 minutos a temperatura ambiente protegida da luz direta. Findo este período foi adicionado 100  $\mu$ l solução de paragem em cada poço. A medição da intensidade fotométrica da cor foi realizada, no intervalo de cinco minutos, após a adição da solução de paragem da reação num aparelho RT – 2100C Microplate Reader.

O *kit anti-GAD ELISA* continha tiras de micro placa, com poços cobertos GAD, onde as amostras analisadas foram incubadas. No caso de amostras ser positivas, os anticorpos específicos ligavam-se ao GAD. Os anticorpos ligados actuavam divalentemente formando uma ponte entre GAD dos poços do microplaca e o anti-GAD marcado com biotina. O sinal foi amplificado com avidina (conjugado enzimático) que catalisava a reação e o resultado era um composto insolúvel corado. A intensidade da cor formada é proporcional a concentração dos anticorpos contra GAD.

Os resultados foram lidos a 450nm por interpolação com a curva de calibração considerando o limite de linearidade até 120 UI/ml (C2), sendo que valores acima de 10 UI/ml foram considerados positivos.

#### 4.6.3. Extração do ADN.

A extração de ADN foi realizada utilizando as instruções do fabricante do *kit InstaGene™ Whole Blood Kit 732-6211*, da **BIO-RAD Laboratories**.

Para isto, 50 uL de sangue total foram transferidos para microtubos de 1,5 ml e logo a seguir adicionado 1ml de *Lysis Buffer*, a mistura foi incubada por 8 minutos a temperatura ambiente, homogeneizada e centrifugada a 10,000 *rpm* durante 1 minuto a temperatura ambiente. O sobrenadante foi cuidadosamente retirado e a seguir realizou-se duas lavagens consecutivas do precipitado através da adição de 0,5 ml do *Lysis Buffer*, a mistura foi agitada e centrifugada a 10,000 *rpm* durante 1 minuto. Nesta altura o precipitado obtido se apresentava de cor branca. Finalmente foi adicionado ao precipitado 0,2 ml de InstaGene Matrix, e incubado durante 8 minutos a 70°C, agitado vigorosamente no vortex durante 10 segundos, incubado durante 4 minutos a 95°C, agitado uma vez mais no vortex vigorosamente durante 10 segundo e finalmente centrifugado a 10,000 *rpm*. Finalmente retiramos cuidadosamente o sobrenadante que continha o ADN.

O ADN foi quantificado por espectrofotometria a 260nm e congelado a -20 °C pronto para ser amplificado.

#### 4.6.4. Amplificação do ADN.

O ADN genómico *foi* amplificado pelo método da reação de polimerização em cadeia com iniciadores de sequências específicas (PCR-SSP), utilizando o *kit* comercial **AllSet+™ Gold SSP** (Invitrogen; lote 020).

A PCR-SSP é uma técnica molecular onde são realizadas várias reacções de amplificação, cada uma contendo um par de iniciadores capazes de detectar alelos HLA. A atribuição dos alelos consiste meramente em determinar se a amplificação ocorreu ou não. O método é de baixa resolução, pois não detecta os alelos propriamente ditos, mas sim grupos de alelos.

Foi utilizada placa com poços, cada um deles continha uma solução seca do iniciador de SSP (alelos e/ou iniciadores específico do grupo) e um par de iniciadores controlo

compatíveis com as sequências não alélicas. O par de iniciadores controlo amplificou o fragmento de um gene conservado presente em todas as amostras. O *kit* fornece alíquotas de tampão contendo desoxirribonucleótidos trifosfatos (dNTPs) e gel loading buffer, a enzima utilizada foi *Ampli-Taq 360 ADN Polimerase (250 U) da AB (Applied Biosystems), lote 1306028*.

O tampão de PCR foi adequadamente homogeneizado antes de preparar as misturas segundo as **tabelas IV e V**.

**TABELA IV. Cálculo para as misturas de PCR HLA – DQ.**

Poços de 10 ul /teste	Tampão de PCR (ul)	Água (ul)	ADN (50 ng/ul)	Tag (ul)
16	80	105,8	21,7	1,2

**TABELA V. Cálculo para as misturas de PCR HLA –DR.**

Poços de 10 ul /teste	Tampão de PCR (ul)	Água (ul)	ADN (50 ng/ul)	Tag (ul)
24	115	152	31,3	1,8

A *master mix* para o tubo controlo, identificado por uma cor azul, não possuía ADN.

A mistura pronta para amplificação foi colocada no termociclador GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems) previamente programado segundo os parâmetros a seguir discriminados na Tabela VI.

**TABELA VI. Condições do PCR HLA –DR.**

<b>Etapas</b>	<b>Temperatura °C</b>	<b>Tempo (segundos)</b>	<b>Ação</b>
Uma etapa de desnaturação	96	60	Desnaturação
5 CICLOS	96	25	Desnaturação
	70	50	Recozimento
	72	45	Extensão
21 CICLOS	96	25	Desnaturação
	65	50	Recozimento
	72	45	Extensão
4 CICLOS	96	25	Desnaturação
	55	60	Recozimento
	72	120	Extensão
MANTER	4	INFINITO	

#### 4.6.5. Identificação dos produtos de amplificação em gel de agarose.

Os produtos de amplificação foram separados por tamanho, através da técnica de eletroforese em gel de agarose 2% com tampão TBE 0,5%. A agarose foi dissolvida por ebulição e esfriada até aproximadamente 60 ° C, adicionando brometo de etídio de concentração final de 0,5 ug/ml. O gel foi moldado e após estar completamente solidificado, acontecia a remoção cuidadosa dos pentes e a sua transferência para a unidade de eletroforeses, com nível da solução tampão TBE 5% até uma profundidade de aproximadamente 1 a 2 mm acima da superfície do gel. O gel foi cuidadosamente carregado na ordem padronizada e posto a correr durante 25 minutos a 150 v, 80 mA. Após este período o gel foi colocado no transiluminador UV e fotografado para documentação e interpretação.

Para interpretar os resultados o *kit* forneceu um mapa através do qual se realizou a identificação dos alelos segundo o tamanho das bandas (**Apêndice C e D**). Cada reação DQB1 e DRB1, exceto a reação de controlo negativo, possuíam um par de primers, com um controlo interno positivo não alélico, a uma concentração menor que os alelos

específicos. Esses primer produziam um produto de amplificação de 800pb em todos os tubos de amplificação dos alelos HLA-DQB e HLA-DRB. Quando um produto de amplificação estava presente e o controlo interno ausente, foi considerado a presença do alelo específico e o tamanho do fragmento dos produtos específicos foi desprezado, quer dizer, a interpretação foi baseada na presença ou ausência da amplificação do alelo ou grupo específico.

A ausência de banda de controlo sem amplificação específica indicava falha nas reações, este facto foi desprezado em aqueles caso onde não houve dificuldade para a atribuição do alelo.

#### 4.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA.

Os resultados foram analisados através do programa SPSS versão 20.0. Foi utilizado os dados de uma tabela de contingência 2x2 e para a comparação das distribuições das frequências alélicas foi realizado o teste exato de Chi-quadrado ou Fishe. Nos casos em que o valor da *significância estatística* ( $p$ ) foi significativo ( $\leq 0,05$ ), calculou-se o Odds Ratio (razão de probabilidades) de forma a avaliar a força da associação, que nos indicou quão mais frequente a doença ocorre indivíduos portadores do marcador de histocompatibilidade em relação aos indivíduos que não apresentam o marcador. Nos casos em que o OR foi maior do que 1, significou que a frequência do marcador nos pacientes é maior do que nos controlos, indicando que o marcador está associado com susceptibilidade da doença. Quando o OR foi menor do que 1, o significado foi o inverso, isto é, o marcador foi associado a proteção contra o desenvolvimento da doença.

## 5. RESULTADOS.

Foram avaliados 52 pacientes DM1, com tempo médio de diagnóstico de 3 anos, deles 31 (59,6%) do sexo masculino e 21 (40,4%) do sexo feminino, com média de idade  $26,3 \pm 16,1$  anos.

Foram avaliados 20 controlos, deles 13 (65%) correspondem ao sexo masculino e 7 (35%) ao sexo feminino, com média de idade foi  $25,4 \pm 12,6$  anos. O valor e médio de glicemia em jejum foi 87,5 mg/dl.

A **tabela VII e VII** caracterizam os pacientes e controlos segundo o sexo, idade e o tempo do diagnóstico da doença.

**TABELA VII. Caracterização das amostras DM1.**

PACIENTES			
ID	Sexo	Idade (anos)	Tempo de diagnóstico da doença
A5	M	29	14anos
A6	F	14	3anos
A10	F	14	3anos
A11	M	13	3anos
A12	M	14	1ano
A13	F	12	3anos
A14	F	10	3anos
A15	M	27	1ano
A16	F	9	4anos
A18	M	14	3anos
A2	F	33	5anos
A21	F	17	2anos
A23	M	32	9anos
A36	F	36	4anos
A37	M	56	3dias
A38	F	43	3dias
A39	M	8	8 Dias
A40	M	53	3anos

**TABELA VII. Caracterização das amostras DM1 (cont).**

<b>PACIENTES</b>			
<b>ID</b>	<b>Sexo</b>	<b>Idade (anos)</b>	<b>Tempo de diagnóstico da doença</b>
A41	M	9	1 Mês
A42	F	14	3anos
A43	F	22	2anos
A44	F	17	3anos
A45	M	20	2anos
A46	M	29	3anos
A48	F	23	3anos
A49	M	28	2ano
A50	M	24	3anos
A51	F	14	1ano
A52	M	25	1ano
A53	M	21	5anos
A54	F	23	4anos
A55	M	23	3anos
A56	M	35	8anos
A57	M	17	1 Ano
A58	M	52	1ano
A59	M	61	2anos
A60	F	7	3meses
A61	M	34	2anos
A62	F	12	2meses
A8	F	13	8 Anos
A9	M	15	7 Anos
A63	M	42	2nos
A64	M	59	7anos
A65	M	55	5 Anos
A66	M	24	13 Anos
A67	M	13	1 Ano
A68	M	37	5 Meses
A69	F	12	1 Ano
A70	F	10	8 Meses
A71	F	22	10 Anos
A72	M	64	3 Anos
A73	M	59	6 Anos
<b>N=52</b>	<b>F=21 M=31</b>	<b>Idade média = 26,3 ±16,1</b>	<b>Tempo médio = 3,2 anos</b>

**TABELA VIII. Caracterização dos controlos.**

<b>CONTROLOS</b>			
<b>ID</b>	<b>Sexo</b>	<b>Idade</b>	<b>Glicemia (mg/dl)</b>
1C	M	25	118
2C	F	8	88
3C	M	15	105
4C	F	26	79
5C	M	17	86
6C	M	38	96
7C	F	16	79
8C	M	26	72
9C	M	25	87
10C	M	36	97
11C	M	38	91
12C	M	16	87
13C	F	37	78
14C	M	55	66
15C	F	9	90
16C	M	15	95
17C	M	39	77
18C	F	29	98
19C	M	30	100
20C	F	8	86
<b>N=20</b>	<b>F=7</b> <b>M= 13</b>	<b>Idade média =</b> <b>25,4 ±12,6</b>	<b>Glicemia média</b> <b>=87,5 mg/dl</b>

### 5.1. Expressão das moléculas HLA-DQ/DR.

Para o estudo da expressão das moléculas HLA-DQ/DR foram realizadas 26 tipagem dos alelos HLA-DQB1 e 31 dos HLA-DRB1 em 35 pacientes DM1, tabela IX.

**TABELA IX. Tipagem dos alelos em DM1.**

ID	<i>Locus</i>			
	DQB1	DRB1	DRB4	DRB5
A5	*05:01 *06:01	*01:01 *13:74		
A6	*02:01	*01:01 *03:38		
A8	*02:01 *05:01	*01:01/02 *07:01		
A9	*02:01 *05:01	*09:04/06		
A10	*02:01	*03:01 *09:04/06		
A11	NR	*03:01 *13		
A12	*02:01	*09:04/06	*01:01/03	*01:01/02
A13	*02:01 *06:01	*03:38		
A14	*02:01	*04:01/02 *09:04/06		
A15	*03:01 *06:01	*01:01/02 *10:01		
A16	*05:01 *03:03	*01:01/02		
A18	*02:01	*01:01		
A21	NR	*03:02 *11	*01:01	*01:01
A38	*03:01/02 *04:01/02	*03:01 *11		
A40	NR	*10:01 *16:01		
A41	*02:01 *06:01	*03:01 *13		
A42	NR	*01:01/02		
A45	*06:01	*01:01/02 *09:04/06		

**TABELA IX. Tipagem dos alelos em DM1  
(Cont).**

ID	<i>Locus</i>			
	DQB1	DRB1	DRB4	DRB5
A51	NR	*01:01/02 *13		
A52	*05:01 *04:01/0 2	*03:02 *11		
A2	*06:01 *05:01	*01:01/02 *15:10		
A46	NR	*08:04 *13		
A48	NR	*03:01		
A39	NR	*01:01/02 *04:01/02		
A36	NR	*01:01/02 *13		
A68	*03:02 *02:01	NR		
A62	*02:01	*03:01 *09:04/06		
A60	*02:01	*03:01 *01:01		
A66	*02:01 *05:01	*01:01 *07:01		
A67	*02:01	NR		
A69	*02:01	*03:01		
A70	*02:01	NR		
A71	*02:01 06:01	*01:01 *03:38		
NR: não realizado	*02:01			
A61	*03:02	*04:01		
A59	03:02	NR		
NR 35	Não realizado.	N=31		

Os 20 controlos foram tipados para as moléculas HLA-DQ/DR, tabela X.

**TABELA X. Tipagem dos alelos em controlos.**

ID	<i>Locus</i>			
	DQB1	DRB1	DRB4	DRB5
1C	*02:01 *03:03	*13 *07		
2C	*02:01 *06:01	*04:01 *13		
3C	*06:02	*15:01		
4C	*06:02 *03:01	*11 *03:01		
5C	*02:01 *06:02	*01:03 *15:01		
6C	*02:01 *04:02	*03:40 *11		
7C	*05:01 *06:01	*03:06 *11:37		
8C	*02:01 *06:01	*03:40 *11	*01:01/03	*01:01 *02:02
9C	*02:01 *03:03	*13		
10C	*06:02 *04:02	*03:02 *11		
11C	*02:01 *05:01	*03:02 *11		
12C	*05:01	*14 *13		
13C	*05:01 *06:02	*11 *13		
14C	*05:01 *04:02	*13		
15C	*02:01 *06:01	*15		
16C	*02:01 *06:02	*01:03 *15:01		
17C	*06:02	*01:03 *15:01		
18C	*06:01	*13		
19C	*06:02	*01:03 *15:01		

**TABELA X. Tipagem dos alelos em controlos  
(cont)**

ID	<i>Locus</i>			
	DQB1	DRB1	DRB4	DRB5
20C	*06:02	*11 *13		

## 5.2. Associação entre as moléculas HLA-DQ/DR e DM1.

Foram genotipados 35 amostras para os genes HLA-DQB1 e HLA-DRB1, sendo que 31 foram pacientes DM1 e 20 controlos.

### 5.2.1. Frequências dos diferentes alelos e genótipos HLA-DQB1 nos pacientes DM1 e controlos.

Da genotipagem HLA-DQB1 resultaram 5 grupos de alelos, \*02, \*03, \*04, \*05 e \*06. A maior percentagem correspondeu ao alelo \*02 (53,8%) nos pacientes DM1 enquanto os controlos aparecem com 25% do total de alelos tipados, este alelo se revelou significativamente mais frequente nos pacientes DM1 ( $p=0,016$ ; OR=4, IC (1,2-13,3) quando comparado aos controlos. O grupo de alelos \*06, foi a segunda maior percentagem encontrada 15,4% nos DM1 já nos controlos se revela com maior percentagem 47,5%, o mesmo mostrou-se significativamente mais frequentes nos controlos ( $p=0,000$ ; OR=0,30, IC (0,17-0,54) em relação ao DM1. Os alelos \*03 e \*05 aparecem com percentagem idêntica nos DM1 (13,4%), sendo que o alelo \*03, nos controlos, revela uma menor percentagem (7,5%) enquanto que o alelo \*05 mostra uma maior percentagem (15%) quando comparada aos DM1. Finalmente o alelo \*04 aparece com menor percentagem (3,8%) nos DM1 sendo inferior aos controlos onde o mesmo representa o 5% dos alelos tipados neste grupo.

Os resultados referidos apresentam-se no gráfico 1 e tabela XI.

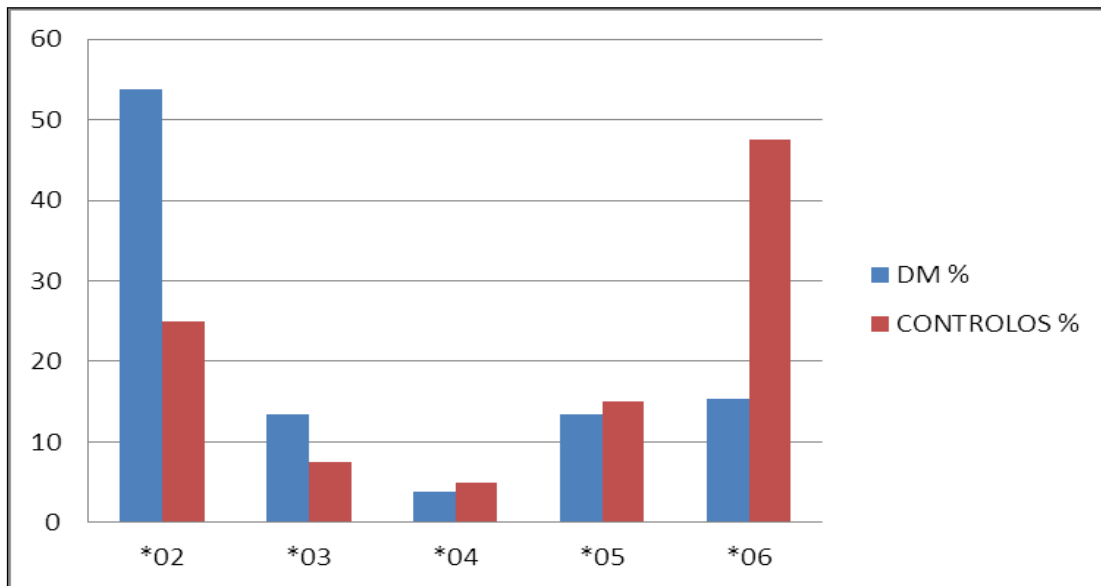


GRÁFICO 1. Distribuição por percentagem dos alelos do locus DQB1 em DM1 e controlos.

TABELA XI. Distribuição dos grupos de alelos DQB1 nos pacientes DM1 e controlos.

Alelos	DM 1		CONTROLOS		P	OR	IC (95%)
	N=26	%	N= 20	%			
DQB1	<i>2n</i>		<i>2n</i>				
*02	28	53,8	10	25	0,033	4	1,2-13,3
*03	7	13,5	3	7,5	0,47	1,41	0,32-6,2
*04	2	3,8	2	5	0,46	0,54	0,07-4,2
*05	7	13,5	6	15	0,51	0,58	0,16-2,06
*06	8	15,4	19	47,5	0,00	0,30	0,17-0,54

Legenda: p: probabilidades OR: "Odds ratio" ou "Razão de Probabilidades" IC: intervalo de confiança

Foi encontrado que o genótipo **DQ2/DQ2** *homozigotos* aparece com 38,5% dos DM1, sendo esta frequência significativamente maior quando comparado aos controlos (p=0,042; OR=7,6, IC (0,89-64,6). O genótipo **DQ6/DQ6** *homozigótico* revelou-se com uma percentagem de 3,8% em DM1, sendo esta frequência significativamente menor (p=0,020; OR=0,08, IC (0,009-0,822) em relação aos controlos (25%). Os genótipos *heterozigóticos* **DQ2/DQ6** e **DQ2/DQ5** aparecem com uma percentagem de 11,5% cada um deles nos DM1, sendo que para **DQ2/DQ6** este valor representa um percentagem menor se comparada ao controlos (25%), ao contrário do **DQ2/DQ5** onde este valor é superior aos dos controlos (5%). O conjunto de outros genótipos, aparece com a segunda maior

percentagem 19,2% nos DM1, similar percentagem aos dos controlos (20%). As outras percentagens se encontram distribuídas entre os restantes genótipos (gráfico 2 e tabela XII).

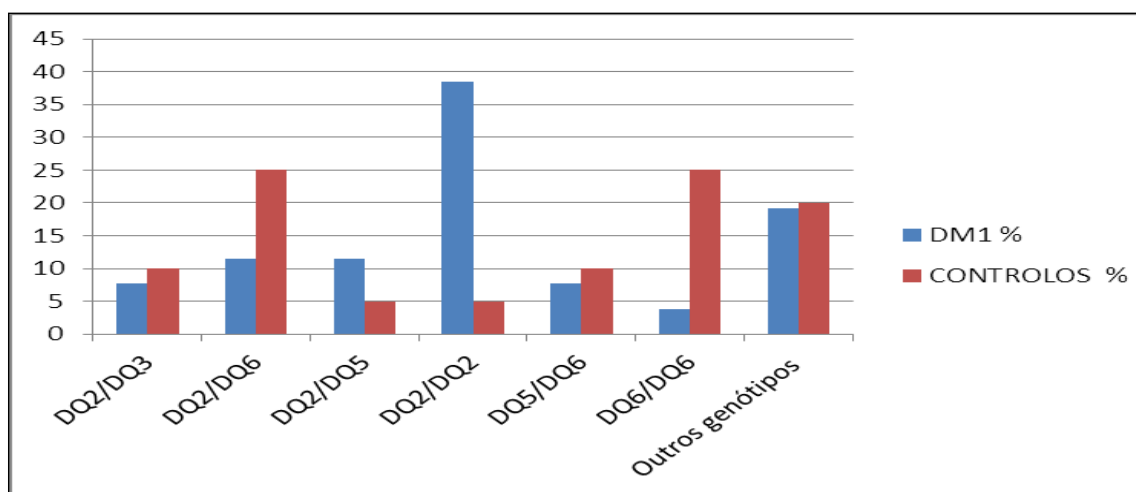


GRÁFICO 2 - Distribuição por percentagem dos genótipos do locus DQB1 em DM1 e controlos.

TABELA XII. Distribuição dos genótipos nos pacientes DM 1 e controlos.

Genótipos	DM 1		CONTROLOS		P	OR	IC (95%)
	N =26	%	N=20	%			
DQ2/DQ3	2	7,7	2	10	0,61	0,54	0,071-4,20
DQ2/DQ6	3	11,5	5	25	0,124	0,2	0,059-1,330
DQ2/DQ5	3	11,5	1	5	1,0	1,78	0,17-18,3
<b>DQ2/DQ2</b>	<b>10</b>	<b>38,5</b>	<b>1</b>	<b>5</b>	<b>0,042</b>	<b>7,6</b>	<b>0,89-64,6</b>
DQ5/DQ6	2	7,7	2	10	0,61	0,54	0,071-4,20
<b>DQ6/DQ6</b>	<b>1</b>	<b>3,8</b>	<b>5</b>	<b>25</b>	<b>0,020</b>	<b>0,08</b>	<b>0,009-0,822</b>
<i>Outros genótipos</i>	5	19,2	4	20	0,70	0,66	0,16-2,83

Legenda p:probabilidade OR: OR: "Odds ratio" ou "Razão de Probabilidades" IC: intervalo de confiança

### 5.2.2. Frequência dos diferentes alelos e genótipos HLA-DRB1 nos pacientes DM1 e controlos.

Para a molécula HLA-DRB1 foi encontrado 8 grupos de alelos (\*01, \*03,\*04,\*07,\*09,\*11,\*13;\*15). Os grupos de alelos com maior frequência nos DM1

quando comparada aos controlos foram **\*01** (29%) e **\*03**(25,8%), sendo que o alelo **\*01** foi significativamente mais frequente nos DM1 ( $p=0,026$ ; OR=4,2, IC (1-15,2), não entanto o alelo parecer não estar associado ao risco da doença, IC (1- 15,2). Os grupos de alelos **\*11** ( $p=0,011$ ; OR=0,14, IC=0,032-0,62), **\*13** ( $p=0,006$ ; OR=0,13, IC (0,049-0,488) e **\*15** ( $p=0,001$ ; OR=0,13; IC (0,005-0,039) foram significativamente menor no DM1 quando comparado aos controlos. O alelo **\*09** (12,9%), resultou com uma frequência significativamente maior para os DM1 ( $p=0,041$ ; OR= 1, IC (0,25-0,39), embora este resultado surgira que não exista associação de risco verdadeira. As restantes percentagem aparecem distribuídas entre os demais grupos de alelos achados nos grupos estudados (gráfico 3 e tabela XIII).

Ainda, há presença dos genes **DR4** e **DR5** nossa amostra de estudo, estes geralmente associados de uma maneira fraca e heterogénea á Tiroidite de Hashimoto (TH), outro distúrbio autoimune, mas decorrente da resposta imune anormal á glândula da tiroide, (Farid e Thompson, 1985).

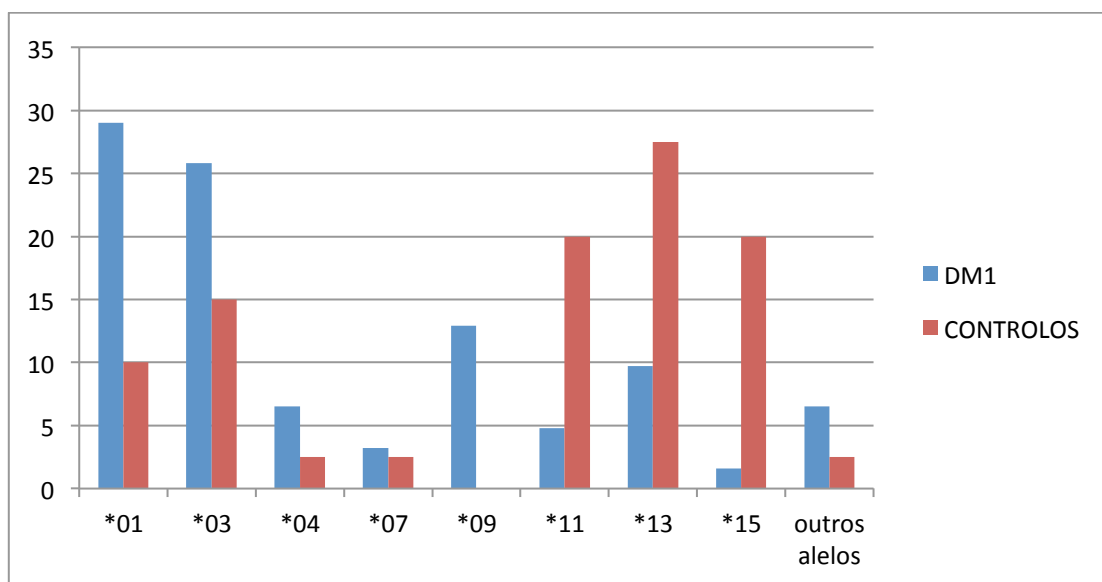


GRÁFICO 3 – Distribuição por percentagem dos alelos do *locus* DRB1 em DM1 e controlos

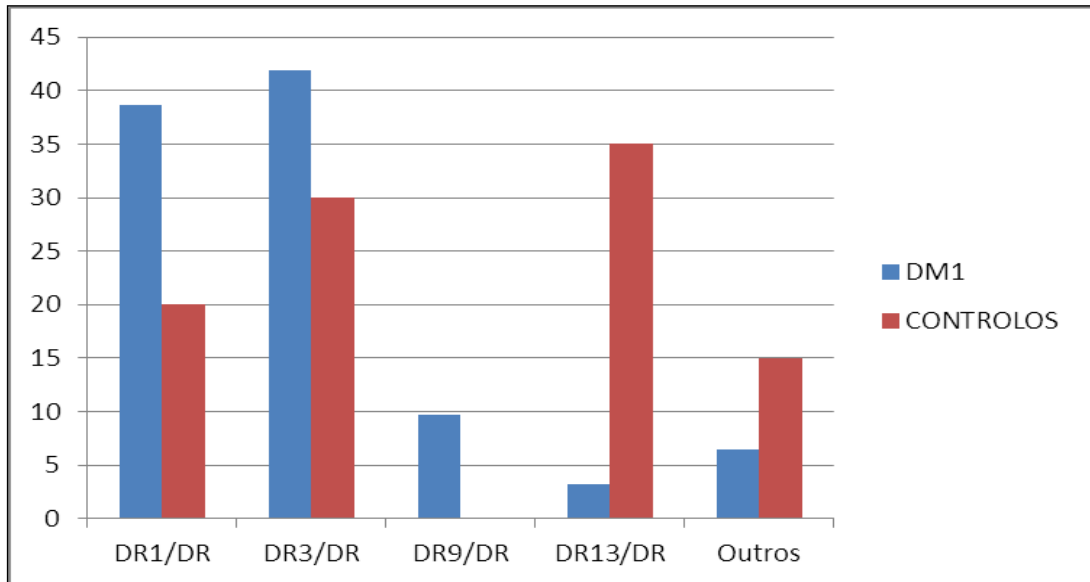
**TABELA XIII: Distribuição dos grupos de alelos HLA-DRB1\* nos pacientes DM 1 e controlos**

Alelos	DM 1		CONTROLOS		p	OR	IC (95%)
	n= 31	%	n=20	%			
DRB1	<i>2n</i>		<i>2n</i>				
<b>*01</b>	<b>18</b>	<b>29</b>	<b>4</b>	<b>10</b>	<b>0,026</b>	<b>4,2</b>	<b>1,17-15,2</b>
*03	16	25,8	6	15	0,39	1,9	0,61-6,3
*04	4	6,5	1	2,5	0,64	2,4	0,25-23,6
*07	2	3,2	1	2,5	1,0	1,15	0,098-13,5
<b>*09</b>	<b>8</b>	<b>12,9</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0,041</b>	<b>1,0</b>	<b>0,25-23,6</b>
<b>*11</b>	<b>3</b>	<b>4,8</b>	<b>8</b>	<b>20</b>	<b>0,011</b>	<b>0,14</b>	<b>0,032-0,62</b>
<b>*13</b>	<b>6</b>	<b>9,7</b>	<b>11</b>	<b>27,5</b>	<b>0,006</b>	<b>0,13</b>	<b>0,049-0,588</b>
<b>*15</b>	<b>1</b>	<b>1,6</b>	<b>8</b>	<b>20</b>	<b>0,001</b>	<b>0,044</b>	<b>0,005-0,39</b>
<i>Outros alelos</i>	4	6,5	1	2,5	1,0	1,7	0,17-18,4

Legenda p:probabilidade; OR: "Odds ratio" ou "Razão de Probabilidades"; IC:intervalo de confiança .

Para realizar o análise genotípica da molécula **HLA- DRB1**, neste estudo em particular, foram constituídos genótipos com um alelo afim pois a frequência individual não oferecia muita informação (tabela VIII). O genótipos de maior frequência encontrados no DM1 foram **DR3/DR**(41,9%), **DR1/DR** (38,7%), **DR9/DR**(9,7%) quando comparado aos controlos. O genótipo **DR13/DR** (3,2% vs 7%) resultou com menor frequência nos DM1 em relação aos controlos.

Nenhum dos genótipos achados mostrou frequência significativa (gráfico 4 e tabela XIV).



**GRÁFICO 4.** Distribuição por percentagem dos genótipos DRB1 em DM1 e controlos.

TABELA XIV. Genótipo DRB1 em pacientes diabéticos e controlos.

Genótipo DRB1*	DM 1		CONTROLOS		P	OR	IC (95%)
	n= 31	%	n=20	%			
DR1/DR	12	38,7	4	20	0,35	2,1	0,57-7,65
DR3/DR	13	41,9	6	30	0,77	1,4	0,42-4,47
DR9/DR	3	9,7	0	0	0,29	0,91	0,83-1,0
DR13/DR	1	3,2	7	35	0,07	1,38	0,42-4,47
<i>Outros genótipos</i>	2	6,5	3	15	0,66	0,6	0,29-1,22

### 5.3. Avaliação da resposta autoimune.

A resposta autoimune foi avaliada através do anti-GAD, os mesmos foram determinados em 72 amostras, das 52 (72,2 %) correspondem aos pacientes DM1 e 20 (27.8 %) aos controlos. Dos DM1, 50 amostras cumpriram os requisitos necessários para ser processadas por ELISA, das 26 (52%) resultaram anti-GAD positiva (tabela 8 e apêndice H). Das amostras controlos, 1 (5%) resultaram anti-GAD positiva.

#### 5.3.1. Em função do tempo medio de diagnóstico

Considerando que o tempo médio de diagnóstico na amostra DM1 estudada é 3 anos, avaliamos o comportamento da positividade do anti-GAD para os menores e maiores de 3 anos, 24 (48%) dos DM1 possuíam um tempo diagnóstico menor a 3 anos, 26 (52 %) aparecem com tempo de diagnóstico maior a 3 anos. Não houve associação significativa entre tempo e a frequência de anti-GAD positivo ( $p=0,39$ ). A maior frequência de positividade de anti-GAD foi encontrada nos pacientes com tempo diagnóstico menor a 3 anos, 14 (53,8%) (tabela XV).

TABELA XV. Associação entre o tempo de diagnóstico da doença e o anti-GAD.

Tempo Diagnóstico	<i>anti-GAD</i>		Total
	Negativo	Positivo	
<3 Anos	10	14	24
>3 Anos	14	12	26
Total	24	26	50

### 5.3.2. Em função da idade.

Os pacientes foram agrupados em faixa etária, 34 (38,2%) correspondia a idade menor aos 30 anos e 16 (18%) a idade superior 30 anos. De forma geral observou-se, para os menores de 30 anos, uma maior frequência de positividade do anti-GAD em relação aos pacientes com idade superior aos 30 anos. Nesta amostra não houve associação significativa entre a idade dos pacientes e frequência de anti-GAD positivo ( $p=0,69$ ). Observou-se entre os pacientes com idade maior a 30 anos, uma maior frequência de positividade do anti-GAD quando comparada a negatividade da resposta (56,2% vs. 43,8%) (tabela XVI).

TABELA XVI. Associação entre a idade e o anti-GAD.

Idade	<i>anti-GAD</i>		Total
	Negativo	Positivo	
≤30 Anos	17	17	34
>30 Anos	7	9	16
Total	24	26	50

### 5.3.3. Em função dos alelos e genótipos encontrados

Do total de alelos e genótipos encontrados na amostra estudada, foram selecionados para esta análise, aqueles que aparecem com frequência significativos.

Do universo de alelos DQB1 distribuídos nos grupos estudados (DM1 e controlos), 27 alelos foram \*02, deles 19 foram anti-GAD positivo enquanto que 8 resultaram anti-GAD negativo. Observou-se que o alelo \*02 foi significativamente mais frequente entre as amostras com anti-GAD positivo ( $p=0,000$ ); por sua vez o alelo \*06 aparece com 3 indivíduos anti-GAD positivo, enquanto 18 indivíduos foram anti-GAD negativo, resultando significativamente mais frequentes ( $p=0,002$ ) para o anti-GAD negativo quando comparado ao anti-GAD positivo (tabela XVII).

TABELA XVII. Associação entre a frequência dos alelos HLA-DQ e a resposta *anti-GAD*

Alelos *DQB1	<i>anti-GAD</i>		Total	P
	Positivo	Negativo		
03	3	6	9	0,7
04	4	0	4	0,21
<b>02</b>	<b>19</b>	<b>8</b>	<b>27</b>	<b>0,000</b>
<b>06</b>	3	18	21	<b>0,002</b>
05	2	9	11	0,4
NR	2	18	20	-
Total de alelos	33	59	<b>92</b>	

A totalidade de genótipo **DQ2/DQ2** (*homozigótico*) foi *anti-GAD* positivo, sendo este genótipo significativamente mais frequente entre as amostras com resposta positiva do *anti-GAD* ( $p=0,000$ ), enquanto que a totalidade do genótipo **DQ6/DQ6** aparece associado a resposta negativa do *anti-GAD*, o mesmo revelou-se significativamente mais frequente para a resposta negativa do *anti-GAD* (Tabela XVIII).

TABELA XVIII. Associação entre a frequência dos genótipos DQ e a resposta *anti-GAD*.

Genótipos	<i>anti-GAD</i>		Total	P
	Positivo	Negativo		
DQ2/DQ3	2	2	4	0,83
DQ2/DQ6	3	5	8	0,83
<b>DQ2/DQ2</b>	<b>11</b>	<b>0</b>	<b>11</b>	<b>0,000</b>
<b>DQ6/DQ6</b>	0	6	6	<b>0,030</b>
DQ5/DQ6	0	4	4	0,21
DQ2/DQ5	3	1	4	0,36
<i>Outros genótipos</i>	1	8	9	0,12
Total	20	26	<b>46</b>	

A associação para os alelos **HLA-DRB1** e a resposta imune é observada na tabela XIX.

TABELA XIX. Associação entre a frequência dos alelos HLA-DR e a resposta anti-GAD

Alelos DRB1	anti-GAD		NR	Total	p
	Positivo	Negativo			
04	2	3	-	5	0,55
07	2	1	-	3	0,57
15	0	9	-	9	<b>0,021</b>
03	11	10	2	24	0,294
<b>09</b>	<b>7</b>	<b>1</b>	-	<b>8</b>	<b>0,008</b>
01	4	18	-	22	0,104
11	1	10	-	11	<b>0,048</b>
13	1	15	1	17	<b>0,004</b>
Outros alelos	0	3	1	4	<b>0,026</b>
Total	28	70	4	<b>102</b>	

Os alelos **DRB1 \*11,\*13,\*15** e outros alelos aparecem significativamente associados a resposta negativa dos auto-anticorpos anti-GAD ( $p \leq 0,05$ ), enquanto que alelo **\*09** foi significativamente mais frequentes ( $p=0,008$ ) nos pacientes com anti-GAD positivo. O alelo **\*03**, revelou-se mais frequente para a resposta anti-GAD positiva, enquanto que e alelo **\*01**, pelo contrario aparece com a maior frequência para pacientes com anti-GAD negativo (Tabela XIX).

A tabela XX mostra associação do genótipo **DRB1** a resposta do anti-GAD. O genótipo **DR13/DR** aparece com uma associação significativa a resposta negativa do anti-GAD ( $p=0,002$ ). Os genótipos **DR9/DR** aparecem associados a resposta positiva do anti-GAD, não entanto, esta associação não foi significativa, já o genótipo **DR1/DR** foi mais frequente na resposta negativa do anti-GAD.

**TABELA XX. Associação entre a frequência dos genótipos DR e a resposta anti-GAD**

Genótipos	anti-GAD		NR	Total	p
	Positivo	Negativo			
DR3/DR	9	9	1	19	0,48
DR1/DR	6	10	0	16	0,64
DR9/DR	3	0	0	3	0,07
<b>DR13/DR</b>	<b>1</b>	<b>7</b>	<b>1</b>	<b>9</b>	<b>0,002</b>
<i>Outros genótipos</i>	2	2	-	4	0,16
Total	21	28	2	<b>51</b>	

#### 5.4. Frequência alélica e genotípica em DM1 e LADA.

Considerando os mecanismos patofisiológicos que dividem clinicamente os doentes diabéticos tipo 1 considerados clássicos (DM1) daqueles com diabetes autoimune latente do adulto (LADA), considerou-se estudar as associações alélicas e genotípicas nestes dois grupos. Desta forma foram considerados DM-1 clássico aqueles indivíduos com idades menores ou iguais a 30 anos e LADA aqueles com idades maiores que 30 anos.

Foi observado que para HLA-DQB1, os alelos \*02, \*05 e \*06 apresentavam uma diminuição de frequência ao passar e uma faixa etária ( $\leq 30$ ) a outra ( $>30$ ). Outros como \*03 e \*04 mantiveram ou aumentaram ligeiramente a sua frequência ao passar de uma faixa etária a outra. As análises nos genótipos mostraram uma resposta semelhante aos dos alelos (Tabelas XXI e XXII).

**TABELA XXI. Frequência dos alelos DQB1 em DM1 e LADA**

Alelos	Faixa etária		N
	$\leq 30$ (n)	$>30$ (n)	
03	2	5	7
04	1	1	2
06	7	1	8
02	26	2	28
05	6	1	7
<b>Total</b>	<b>42</b>	<b>10</b>	<b>52</b>

**TABELA XXII. Frequência dos genótipos DQB1 em DM1 e LADA**

Genótipos	Faixa etária		Total (N)
	≤ 30 (n)	>30 (n)	
DQ2/DQ3	0	2	2
DQ2/DQ6	3	0	3
DQ2/DQ2	10	0	10
DQ6/DQ6	1	0	1
DQ2/DQ5	3	0	3
DQ5/DQ6	1	1	2
Outros genótipos	4	1	5
<b>Total</b>	<b>22</b>	<b>4</b>	<b>26</b>

Nos alelos e genótipos HLA-DR observou-se um comportamento similar aos alelos HLA-DQ. De forma geral nas menores idade revelaram a maior frequência de alelos e genótipos em relação as maiores idades. Com exceção do alelo \*04 e outros alelos, onde não se mostrou grandes variações (tabela XXIII e XXIV).

**TABELA XXIII. Frequência dos alelos DRB1 em DM1 e LADA**

Alelos	Faixa etária		Total (N)
	≤ 30 (n)	>30 (n)	
04	2	2	4
01	16	2	18
15	0	1	1
03	16	0	16
09	8	0	8
11	2	1	3
07	2	0	2
13	5	1	6
<i>Outros alelos</i>	2	2	4
<b>Total</b>	<b>53</b>	<b>9</b>	<b>62</b>

**TABELA XXIV. Frequência dos genótipos DRB1 em DM1 e LADA**

Genótipos	Faixa etária		Total (N)
	≤ 30 (n)	>30 (n)	
DR13/DR	1	0	1
DR9/DR	3	0	3
DR3/DR	12	1	13
DR1/DR	10	2	12
<i>Outros genótipos</i>	0	2	2
<b>Total</b>	<b>26</b>	<b>5</b>	<b>31</b>



## 6. DISCUSSÃO

DM1 é uma doença autoimune que resulta em destruição das células beta do pâncreas, que produzem insulina. A autoimunidade da DM1 está influenciada pela presença de alelos HLA específicos e de auto-anticorpos.

Assim sendo, neste estudo foi determinada a frequência dos alelos de susceptibilidade a doença e avaliou-se a associação dos mesmos com a resposta imune.

Para atingir os objectivos propostos, foram estudados indivíduos com diagnóstico clínico prévio de DM1, todos provenientes de hospitais e clínicas de Luanda, alguns deles de diagnóstico recente (fim da fase aguda) e outros na fase crónica. Os indivíduos durante a fase aguda não apresentam manifestações clínicas, pelo que dificilmente estariam disponíveis para este tipo de estudo.

Foram estudados 52 pacientes com diagnóstico clínico de DM1 e 20 controlos (normoglicemicos). O grupo DM1 e controlos apresentaram-se homogéneos em relação a género ( $p=0,604$ ) e a idade ( $p=0,195$ ), não se observam diferença significativa.

No grupo DM1 houve predomínio do sexo masculino, embora se surgira que a incidência da doença seja igual para ambos sexos (Harjutsalo; Sjöberg; Tuomilehto, 2008). A média de idade de 26,3 anos para os DM1, semelhante aos relatos que planteia que a idade de início tende a ser mais tarde em populações africanas, entre 22-29 anos (Kalk, 1993). Quanto ao tempo de diagnóstico, a média foi de 3 anos, resultados similares ao estudo realizado em Camarões onde o tempo médio ao diagnóstico foi de 3,3 anos (Hawa et al., 2006).

De maneira geral os dados registrados na literatura indicam que a maior frequência dos alelos de risco corresponde a HLA-DQB1\*0201 e/ou \*0302 e DRB1\*03 e/ou DRB1\*04. Enquanto o alelo de proteção DQB1\*0602 confere proteção dominante. (Boitard et al, 1997). Mas sabendo que a doença acontece em populações etnicamente diferentes, a associação com os alelos HLA pode ser do mesmo modo diferente, por tanto só o análises

de populações diferentes nos dará a ideia desta variação, e um fato que pode simplificar a investigação da susceptibilidade a DM1 é estudar populações nas quais os marcadores para doença sejam infrequentes.

No presente estudo realizado numa população angolana foram genotipados 35 amostras de portadores DM1 e 20 controlos. De todos os alelos HLA-DQ encontrados foi possível associar a susceptibilidade da doença o grupo de alelo HLA-DQB1\*02 (OR=4 , IC (1,2-13,3), o mesmo aparece com uma frequência significativa superior para os portadores de DM1 quando comparada aos controlos (p=0,033). Estudos semelhantes envolvendo populações zimbabueanas revelaram maior frequência dos alelos DR2 (\*02) em relação aos controlos (Garcia-Pacheco, 1992).

Interessante neste estudo foi a presença significativamente frequente nos portadores de DM1 do genótipo DQ2/DQ2 (p=0,042), com OR=7,6; IC(0,89-64,6) para a predisposição da doença. Benseffaj, 2012 no estudo semelhante em portadores marroquinos achou frequência maior de genótipo nos portadores de DM1 em relação aos controlos.

O alelo DQB1\*06 com uma frequência significativamente superior nos portadores de DM1 quando comparado aos controlo (p=0,00) semelhante a estudo de Garcia-Pacheco, 1992. Os dados obtidos sugerem que o alelo seja protetor (OR=0,30; IC(0,17-0,54) a semelhança da população estudada por Volpini 2001, com RR= 0,3.

O genótipo DQ6/DQ6 revelou-se significativamente superior nos controlos em relação aos DM1 (p=0,020) e aparece associado a susceptibilidade da doença (OR=0,08; IC(0,009-0,822)). No estudo realizado em Marrocos foi achado, que o genótipo DQB1\*02/06 revelou uma maior frequência nos controlos em relação aos DM1 e o mesmo esteve associado a proteção (Benseffaj e cols, 2012).

Estes resultados confirmam o estudo anterior (Parry e Brooks, 2008) no qual confere ao alelo \*06 uma proteção dominante.

A molécula HLA-DR não revelou associação significativa com a susceptibilidade da doença. Foi observado que os alelos \*03 e \*04 estiveram mais frequentes nos portadores de DM1

quando comparados aos controlos enquanto que no estudo realizado na população do Zimbabué o grupo de alelos DR4 (\*04), DR3 (\*03) esteve significativamente aumentado em pacientes em relação com os controlos ( Garcia-Pacheco, 1992).

O alelo HLA-DRB1\*01 revelou uma frequência significativamente maior ( $p=$ ), quando comparado aos controlos, não entanto no análise estatístico sugerem que o mesmo não esta associado ao risco da doença OR =4,2, IC (1-15,2). Este alelo e pouco frequente nos dados relatado na literatura, pelo menos como marcador da doença (DM1) mas sim com protector. Na literatura este alelo aparece frequentemente associados a artrite reumatoide, a mesma pode coexistir com DM1, ambas possuem muitos aspectos em comum e uns deles é o gene *PTPN22* ligado a incidência de ambas doenças (Kapitány et al, 2005).

Alguns estudos realizados em diferentes populações mostram que diferentes haplotipos HLA-DR-DQ influenciam de diversas maneiras na DM1. É interessante sinalar o papel no identificado que haplotipo DRB1\*01/DQ teve no presente estudo, pois o mesmo aparece com regularidade. Em um estudo no Brasil foi relatado que o grupo de alelos (\*01) quando ligado ao DQB1\*0501, estava associado à proteção da doença (Thomson et al, 2007), em contrapartida por outros é considerado de risco moderado. (Boitar et al.,1997).

A associação característica da população caucasiana (DR3, DR4) não foi encontrada neste estudo sugerindo que a susceptibilidade poderia estar associada com DR7 e DR9. O alelo DRB1\*09 é raro na população do Norte de Africa, em nosso estudo foi observado só nos portadores de DM1, o mesmo há sido reportada em diabéticos marroquinos da região Souss, principalmente de origem Berber (Izaabel et al., 1996). Ikegami et al, 2007 sugere que o alelo é característico de diabéticos japoneses e coreanos e o genótipo DR9/DR9 e de alto risco para a população Asiática.

Semelhante ao estudo de Bernseffat e cols, 2012 não foi encontrado genótipo com frequência significativa, com exceção da combinação DRB1\*03/DR, a mesma aparece no presente estudo com uma frequência maior nos DM1 quando comparada aos controlos.

Associado a proteção foram observados os alelos HLA-DRB1 \*11 ( $p=0,011$ ; OR = 0,14,IC(0,032-0,62), \*13 ( $p=0,006$ ; OR=0,13, IC(0,049-0,588) e \*15 ( $p=0,001$ ; OR

=0,04, IC(0,005-0,39). O alelo HLA-DRB1\*11 foi associado a protecção para DM1 no estudo realizado por Volpinis e cols, 2001, com risco relativos (RR) de 0,22. O \*15 também foi relatado como protector nos trabalhos de Volpini e cols, 2001, como RR de 0,1. Protecção contra DM1 também foi conferida pelo alelo \*13 com RR=0,4 na pesquisa de Volpini e cols, 2001, RR=0,31. Numa população negra homogénea do Zimbabué os alelos \* 11 revelam-se significativamente maior nos controlos do que em pacientes, o que faz crer no seu papel protetor contra DM1 (Garcia-Pacheco, 1992). Os alelos \*13 e \*15 também foram mais frequente em controlos no estudo realizado por Benseffaj e cols, 2012.

A apresentação clínica inicial diferencia as duas formas de diabetes associadas aos auto-anticorpos, LADA e DM1. A primeira caracteriza-se por ausência de cetonúria ou hiperglicemia, sintomática acentuada nos primeiros 6 á 12 meses (Rosário, 2007), não havendo necessidade de insulina nesse período, o que se assemelha ao DM 2 clássica; enquanto a DM1 é definida na presença de sintomas típicos de hiperglicemia (poliúria, polidipsia e/ou perda de peso), cetonúria com necessidade de insulina imediata após o diagnóstico (Shahid e tal.,2012).

Embora a presença de qualquer um dos anticorpos (IAA, IA2 ICA, GADA) indique autoimunidade em adultos diabéticos, a solicitação do anti-GAD é necessária e na maioria das vezes suficiente (Pozzalli e Di mario, 2001; Borge et al, 2002), por ser o mais sensível nessa faixa etária (Takino et al., 2002). Assim pode-se estabelecer como critério diagnóstico de LADA (diferenciando-se do DM2).

Poucos são os dados epidemiológicos, imunológicos e genéticos disponíveis para a população diabética tipo 1 em Africa. Reporta-se positividade dos auto-anticorpos em diabéticos do Norte de África, observando-se frequências menores que nos DM1 caucásianos (Libman et al, 2003). Em países como Tunísia e Camarões se observaram frequência de 51,2% (Mclarty et al, 1990) e 34% (Hawa et al, 2006). Em nosso trabalho, foram encontrados 26 (29,2%) de positividade para a anti-GAD. Estes dados contradizem os registos onde se consideram que os africanos juntos aos filipinos raramente apresentam anti-GAD positivo (Medici, et al, 1999 e Banerji et al, 1994), ao que parece ser é que existem poucas determinações deste auto-anticorpo em todo o continente, o que obviamente impossibilita conhecer a verdadeira realidade da frequência do anti-GAD em

diabéticos africanos. A maioria das publicações reporta resultados do ICA em detrimento do anti-GAD e o facto de existir escassa informação sobre a prevalência do LADA em África, o que também dificulta a classificação dos diferentes tipos de diabetes.

A prevalência do LADA tem sido estimada em diversas publicações, variando em função da população estudada (país). Os critérios usados são, sobretudo, a idade, tempo do diagnóstico e dos anticorpos avaliados.

A semelhança do estudo ADOPT em norte-americanos (Zinman et al, 2004) foi considerado LADA todos aqueles pacientes com idade superior a 30, dos quais 9 (56,2%) possuíam anti-GAD positivo, Esta frequência foi semelhante a encontrada no estudo realizado em nigerianos, 48% (Olufunmiayo, 2012), ou seja 9 indivíduos, neste estudo, são considerados LADA.

Do universo de diabéticos anti-GAD positivo, verificou-se uma frequência 17 (65.4%) de positividade para os menores de 30 anos em relação aos maiores de 30 anos 9 (34,6%), resultado semelhante ao estudo realizado na África do Sul (33%) (Rheeder et al, 2001) o que confirma a hipóteses de que o anti-GAD é um marcador sensível de DM1 na faixa pediátrica, enquanto que, a DM1 que inicia na idade adulta é caracterizada por períodos assintomáticos mais longo, antes do diagnóstico ou seja, existe preservação da função das células beta residuais.

A semelhança de um estudo realizado em Brasil (Serfaty et al, 2010), não houve associação entre a idade e a positividade de anti-GAD ( $p=0,69$ ) o que nos faz pensar na hipótese de que a idade de aparecimento dos sintomas da DM autoimune no adulto depende do grau de falência das células beta. O processo de destruição das células beta (avaliada através do péptido C) ocorre gradativamente durante um período que a pessoa com diabetes não percebe por não ter sintomas. Inclusive os anti-GAD podem-se originar até oito anos antes da manifestação da condição, dificultando qualquer tratamento preventivo. Considerando estes argumentos podemos pensar que a idade de início da doença não é considerada parâmetro adequado para definir esta patologia.

Os casos avaliados no presente estudo possuíam tempo médio de diagnóstico de 3 anos, semelhante ao estudo realizado em Camarões onde o tempo médio ao diagnóstico foi de 3,3 anos (Hawa et al., 2006). Deste 24 (48%) correspondeu aos diabéticos com tempo diagnóstico menor a 3,2 anos, enquanto 26 (52 %) correspondeu aos pacientes com tempo de diagnóstico maior a 3,2 anos. Não houve associação entre o tempo diagnóstico e a frequência de anti-GAD positivo ( $p = 0,39$ ). A maior frequência de positividade de anti-GAD foi encontrada nos pacientes com tempo diagnóstico menor a 3,2 anos, 14 (53,8%) de forma semelhante ao que aconteceu em um estudo num grupo de pacientes diabéticos italianos em que se achou que 44% deles foram positivos para anti-GAD. (Zanone et al, 2003).

Os resultados obtidos foram semelhantes ao estudo realizado na Tunísia onde, observou-se que com o aumento do tempo de duração da doença em diabéticos jovens a prevalência do anti-GAD diminuiu, 84,6 % dos jovens com diagnóstico recente (<6 meses) foi positivo ao anti-GAD enquanto que deles 29,1% resultaram positivo a longo termo (> 5anos) (Elkadhi,2002). Em nosso caso observou-se que para > 3 anos, apenas o 46,2 % resultaram positivo em relação ao 53,8% (<3 anos).

A frequência da positividade a resposta autoimune avaliada pelo anti-GAD foi bem maior na idade pediátrica comparada aos LADA. Contudo foi mas extensiva ao tempo de diagnóstico no LADA, o que condiz de princípio com as características clínicas e imunológicas destes pacientes.

Estes achados justificam a hipótese de que o anti-GAD tem seu melhor desempenho nos indivíduos adulto com início da doença, sendo o teste que permanece positivo por mais tempo após o diagnóstico. Mantém sensibilidade de 70% a 80% para o diagnóstico independente da idade (Silva et al, 2008). Em nosso estudo, a idade média dos pacientes diabéticos foi de 26,3 anos, verificando-se uma maior presença de diabéticos jovens, quer dizer DM1 clássico e não LADA e daí o facto de existir a tendência a diminuição do anti-GAD ao longo do tempo nessa faixa etária, maioritariamente jovem.

Ainda sobre anti-GAD podemos encontrar em estudos diversos, comportamentos diferentes em relação a associação entre a frequência de alelos susceptíveis ou de risco e presença do

anti-GAD nas diferentes amostras de diabéticos autoimunes quando comparados com controlos, por exemplo.

No estudo de Buzzetti e cols, 2007, observaram que a prevalência do HLA-DQB1\*0201 foi maior em pacientes com altas concentrações de anti-GAD (50%) comparadas as concentrações mais baixas do anticorpo (26,8%) e anti-GAD negativos (16,5 %), mas não houve diferença entre os primeiros em relação ao HLA-DQB1\*0302. No mesmo estudo o alelo protetor DQB1\*0602 resulta em menor prevalência para altos níveis de concentração de anti-GAD.

Os nossos resultados a semelhança do estudo de Buzzetti e cols, 2007 resultaram numa frequência significativamente maior dos alelos HLA-DQB1\*0201 associada a positividade de anti GAD ( $p \leq 0,05$ ) quando comparada com a resposta negativa dos auto-anticorpos (57,6% vs 13,5%); o alelo DQB1\*0602 mostrou uma menor frequência para a positividade de anti-GAD quando comparado ao alelo\*02 (57,6 % vs 9,1%). O genótipo DQ2/DQ2 e DQ6/DQ6 a semelhança ao anterior, possuem uma associação significativa para o anti-GAD ( $p \leq 0,05$ ). Em relação ao alelo \* 03 aparece só com uma frequência de 3% no que positividade e anti-GAD se refere, estes resultados faz sem duvida, o alelo \*0201 muito ligado a sensibilidade imunológica destes pacientes sendo identificado como alelo de risco a considerar nesta população.

Enquanto aos alelos HLA-DR observamos que os alelos (\*11,\*13,\*15) considerados neste trabalho como protetores possuem as maiores frequências para a resposta anti-GAD negativo, sendo significativa ao do genótipo DR13/DR.

O alelo \*09 aparece com uma frequência significativamente ( $p \leq 0,05$ ) associada a positividade do anti-GAD, facto que faz lembrar o estudo realizado em pacientes japoneses onde se verificou que haplótipo contendo os alelos DRB1\*09 e DRB1\*07 tem sido associado a IA-2A em DM1 (Lambert et al, 2004). Esta associação foi observada em nosso estudo mas com anti-GAD. Estes achados, por nós considerados relevantes, possivelmente não foram tidos em conta ao longo de trabalhos do género dado a menor frequência em comparação com DRB1 \* 04 haplótipos. Na verdade, DRB1 \* 07 haplótipos são considerados neutros ou de protecção da população do Reino Unido e na Tunísia (Fekih et

al, 2013), mas pelo que se constata aqui deve ser tomados em consideração para estudos de susceptibilidade a DM1.

Fazendo a análises desde esta óptica de resultados pode pensar-se que a determinação dos auto-anticorpos não deve ser limitada aos alelos tipicamente reconhecidos como susceptíveis pelo contrário, deverá incluir genótipos novos que indiquem a suspeita de novos casos de altos ou baixo risco. Esta estratégia seria aplicável a mais diabéticos do que uma baseada em DRB1 \* 03/04 haplótipos.

O alelo \*01 revelou uma maior frequência associada a resposta negativa do anti-GAD em relação a positividade, facto que não faz questionar o seu papel de risco ou protector, ao parecer este esteja condicionado ao alelo ao qual se encontra ligado (DQB1\*05 ou DQB1\*02). Quando ligado a \*05, parecer ter um efeito protector em base a negatividade do *anti*-GAD, e quando ligado ao alelo \*02 geralmente existe positividade do *anti*-GAD. Apresenta-se com frequência 4:18 para *anti*-GAD positivo e todos eles pertencem são menores de 30 anos. Assim, a genética pouco auxilia na identificação de DM autoimune do adulto (Densai et al,2007).

Nem todos os pacientes deste estudo, mesmo que diagnosticados clinicamente e avaliados geneticamente apresentavam anti-GAD positivo, este facto é valido e este descrito em muitas literaturas, quer dizer, pode ser anti-GAD negativo ao diagnóstico e passar a ser detectado anos após a evolução da doença. É possível ainda o aparecimento da positividade mais tardia, o que sinaliza a existência de um sistema imune mais predisponente ao desenvolvimento de doenças autoimunes de modo geral (Tsirogiani, 2009). Também podemos estar perante o subtipo DM1 idiopático, frequente na população em estudo (africana), ou *Maturity Onset Diabetes of the Young (MODY)*.

Tuomi e cols, 1999 observaram que a frequência do HLA-DQB1\*0302 (41%) (de risco para DM1) foi significativamente maior nos pacientes com LADA em relação aos controlos (24%), mas inferior que no DM1 clássico (71%), estando ainda relacionado com concentração sérica de anti-GAD (29% para baixas versus 47% com altas concentrações). Nenhuma diferença foi observada na frequência do alelo protetor DQB1 \* 0602 entre os grupos.

Em nosso estudo verificou-se um comportamento similar da frequência entre DM1 e LADA para os alelos HLA de risco (\*02), o mesmo aparece com maior frequência para DM1 em relação aos LADA. Por sua vez o alelo \*06, ao contrário do estudo anterior a sua frequência parece diminuir com idade do diagnóstico (> 30), enquanto o alelo\*03 aumento para o LADA, o que faz pensar que este alelo tenha sua maior predisposição para a diabetes com início mais tardio.



## 7. CONCLUSÕES

A DM1 é uma patologia complexa, que envolve factores genéticos e ambientais, levando à destruição autoimune das células beta. Avanços em imunogenética trouxeram enorme contribuição ao conhecimento da patogénia, às suas diferentes manifestações clínicas e patologias associadas.

Sendo assim o entendimento dos factores associados ao desenvolvimento da autoimunidade do DM1 oferece perspectivas futuras para intervenções que subsidiam medidas curativas e preventivas as pessoas susceptíveis a doença (portadores de marcadores imunogénéticos, como alelos HLA de susceptibilidade e autoanticorpos).

Com a intenção de identificar os alelos HLA de susceptibilidade e o mecanismo que rodeia a presença dos anticorpos o que faz deste indivíduos susceptíveis a doença foram determinados os alelos HLA-DQ/DR marcadores de risco, assim como foi determinado a presença de auto-anticorpos, anti-GAD, nesta amostra de DM1 angolanos, constituindo o primeiro estudo molecular realizado com este objectivo e com o propósito obter uma maior perspectiva do diagnóstico, prognóstico, prevenção e tratamento da doença.

1. Como resultado da tipificação encontramos alelos característicos da DM1, tais como HLA- DQB1\*02, \*03, \*06 e DRB1\*01, \*07, 09, \*11,\*13,\*15.
2. Os resultados revelam a forte participação das moléculas **HLA-DQ** para a susceptibilidade a DM1 na população angolana e sugerem associações positivas e negativas entre os grupos de alelos, algumas já encontradas em estudos anteriores.
  - O alelo **DQB1\*02:01 (DQ2/DQ2)** foram significativamente associado a chance a desenvolver a DM1.
  - O alelo, **DQB1\*03**, aparecem com frequência superiores para os DM1.
  - Os alelos **DQB1\*06 (DQ6/DQ6)**, **DQRB1\*11,\*13,\*15**; foram associados significativamente a protecção contra a doença.
  - Não foi encontrado alelos característicos da molécula **HLA-DR** associado com o risco a doença, não entanto, os alelos **\*03, \*04** e o genótipo **DR3/DR** foram mais frequentes em DM1.

- Realçar a presença dos alelos **DRB1\*01**, **\*07** e **\*09** que sugerem participação activa na patogenia.
3. Por outro lado os dados demonstram que a autoimunidade desenvolve-se na presença de susceptibilidade genética, quer dizer, em associação com alelos HLA-II específicos.
- Enfatiza o LADA como uma condição heterogénea que inclui o tipo clínico DM1 clássico, caracterizada pela presença de auto-anticorpos (anti-GAD) e antígenos HLA-DQ/DR com a progressiva perda das funções das células beta. Ainda sobre a modulação da resposta imune ao anti-GAD se pode pensar, portanto, ser uma abordagem eficaz para a prevenção dos diabéticos portadores não só **DQB1\*02/03** e **DRB1 \* 03/04**, mas também **DRB1 \* 07** ou **DRB1 \* 09** haplótipos.

A importância da DM1 do ponto de vista social e económico é inegável devido às altas taxas de morbilidade, mortalidade e de incapacitação para o trabalho. Desta forma, fica evidente que tal doença merece especial cuidado no sentido de uma detecção precoce dos indivíduos susceptíveis para que haja possibilidade de intervenção profilática nos mesmos. De esta forma, o conhecimento dos factores de risco para o desenvolvimento da DM na infância e não só contribuirá para que se possa detectar os indivíduos de alto risco e tentar intervenções anteriores a fase clínica da doença, evitando assim maior morbi/mortalidade da mesma.





## 8. BIBLIOGRAFIA

Abbas, A., Lichtman, A.H. e Pober, J.S. (2002) *Imunologia celular e molecular*. 4ta edição Rio de Janeiro.

Ahren, B. e Corrigan, C.B. (1998) Intermittent need for insulin in sub-group of diabetic patients in Tanzania. *DiabetMed* .2: 262-64.

Altobelli, E., Chiarelli, F., Valenti, M., Verrotti, A., Blasetti, A. e Di Orio, F. (1998) Family history and risk of insulin-dependent diabetes mellitus: a population-based case-control study. *ActaDiabetol*. **35**:57-60.

Akamine, H., Komiya, I., Shimabukuro, T., Asawa, T., Tanaka, H., Yagi, N., Taira, T., Nagata, K., Arakaki, K., Wakugami, T., Takasu, N., Powell, Mj., Furmaniak, J. e Smith, B.R.(1997). High prevalence of GAD65 (and IA-2) antibodies in Japanese IDDM patients by a new immunoprecipitation assay based on recombinant human GAD65. *DiabetMed*.**14**:778-784.

American Diabetes Association (2006) .Standards of medical care in diabetes-2006. *Diabetes Care*. **v.29** (Supp 1): S5-S35.

American Diabetes Association (2013) .Standards of medical care in diabetes-2013. *Diabetes Care*.**v.36** (Supp 1): S66.

Atkinson, Ma. e Eisenbarth, Gs.(2001).Type 1 diabete: new perspectives on disease pathogenesis and treatment. *Lancet*. **358**:221-9.

Atkinson, Ma. e Maclaren, Nk. (1994).The pathogenesis of insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med*.**331**: 1.428-36.

Baekkeskov, S., Jan-Aanstoot, H. e Christgan, S.(1990).Identification of the 64K autoantigen in insulin-dependent diabetes as the GABA-synthesizing enzyme glutamic acid decarboxylase. *Nature*.151-6.

Balda, C. A. e Pacheco-Silva, A. (1999). *Aspectos imunológicos da diabetes mellitus tipo 1*.Rev. Assoc. Méd. Bras. v. **45** n. 2.

Banerji, MA. , Chaiken, RL., Huey, H., Tuomi, T., Nrin, AJ., Mackay, IR et al. (1994). GAD antibody negative NIDDM in adult black subjects with diabetic ketoacidosis and increased frequency of human leukocyte antigen DR3 and DR4 .*Flatbush diabetes* .*Diabetes*, **43**:741-5

Benseffaj, N.; Brick,Ch.; Atouf,O.; Bourhanbour, A.D.; Sanae,O e Essakalli., M.(2012).Human leukocyte antigen(HLA)polymorphism and type 1 diabetes in Moroccan population .*African Journal of Biotechnology* ,**11(95)**:16126-131

Bingley, Pj., Bonifacio, E., Ziegler, A-G., Schatz, Da., Atkinson, Ma., Eisenbarth, Gs. The Immunology of Diabetes Society. (2001). Proposed guidelines on screening for risk of type 1 diabetes. *Diabetes Care*. **24**:398.

Bingley, PJ. (2010) Clinical applications of diabetes antibody testing. *J Clin Endocrinol Metabol.* ; **95**:25–33.

Blohmé, G., Nyström, L., Arnqvist, Hj., Lithner, F., Littorin, B. e Olsson, Po. (1992). Male predominance of type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus in young adults: results from a 5-year prospective nationwide study of the 15-34 year age group in Sweden. *Diabetologia*. **35**:56-62.

Boitard, C., Caillat-Zucman, S. e Timsit, J. (1997). Insulin-dependent diabetes and human leukocyte antigens. *Diabetes Metab*. **23**:22-8.

Cabrera-Rode, E. Díaz-Horta, O., Rendón, A., Molina, G., Vera, M. e Licea, M. (1997). Prevalence of Islet Cell Antibodies (ICA) in diabetes mellitus and other diseases in Cubans. *Autoimmunity*. **26**:7-10.

Cernea, S., Buzzetti, R., Pozzilli, P. (2009). B-cell protection and therapy for latent autoimmune diabetes in adults. *Diabetes Care*, **32**:S246-S252.

Cervin, C., Lyssenko, V., Bakhtadze, E., Lonholm, E., Nilsson, P., Tuomi, T., et al. (2008) Genetic similarities between latent autoimmune diabetes in adults, type 1 diabetes, and type 2 diabetes. *Diabetes*, **57**:1433–7.

Dean, L, et al. (2004) Factores genéticos na Diabetes Tipo 1. In *Paisagem genética de Diabete*. National Center for Biotechnology Information (EUA), National Library of Medicine, National Institutes of Health, Bethesda, MD 20892-6510, 2004. Cp 2.

Desai, M., Zeggini, E., Horton, VA., Owen, KR., Hattersley, AT., Levy, JC. et al. (2007). An association analysis of the HLA gene region in latent autoimmune diabetes in adults. *Diabetologia*. **50**:68–73.

Devendra, D., Liu, E. e Eisenbarth, Gs. (2004). Type 1 diabetes: recent developments. *BMJ*. **328**:750-4

Garcia-Pacheco, JM et al (1992). Distribution of HLA-DQA1, -DQB1 and DRB1 alleles in black IDDM patients and controls from Zimbabwe. *Tissue Antigens*. ; **40**(3):145-9.

Eisenbarth. Banting Lecture (2010): An Unfinished Journey : Molecular Pathogenesis to Prevention of type 1 A. Diabetes. *Diabetes*, v.59, n.4, p.759-74.

Eizirik, D., Monteiro, Cmc. , Voltarelli, Jc. , e Foss, Mc. (1987). Frequency of HLA antigens in a Brazilian type I diabetic population. *Braz J Med Biol*. **20**:533-7.

Elkadhi, A., Kleifi, N., Abid, A., et al. (2002). Prevalence of anti-GAD autoantibodies in Tunisian children with type 1 diabetes. *Tunis Med*, **80**(5):281-85.

Eren, E; Travers, P. (2000). *The structure of the major histocompatibility complex and its molecular interactions*. In: R Lechler & A Warrens editors. HLA in Health and Disease. 2da edição. San Diego: Academic Press, p. 23-33.

Farid, NR. e Thompson, C. (1985). HLA and autoimmune endocrine disease. *Mol Biol Med.* **1986**; 3:85-97.

Fernandes, APM., Louzada, Jr., Foss, MC., Donadi, EA.(2002).HLA-DRB1 , DQB1, and DQA1 allele profile in Brazilian patients with type 1 diabetes mellitus .*Ann NY Acad Sci*; **958**:305-8.

Gale, EA. (2001). The discovery of type1 diabetes. *Diabetes* .**50**:217-226.

Gillespie, K. (2006). Type I diabetes: pathogenesis and prevention. *Can. Med Assoc. J. Montreal*, **v.175**, n.2, p.165-170.

Hagopian, WA., Sanjeevi, CB., Kockum, I., Landin-Olsson, M., Karlsen, AE., Sundkist, G. et al.(1995) Glutamate decarboxylase-, insulin-, and islet cell-antibodies and HLA typing to detect diabetes in a general population-based study of Swedish children. *J Clin Invest*; **95**:1505-11.

Harjutsalo,V.;Sloberg,L.; Tuomilehto,J.(2008).Time trends in the incidence of type1 diabetes in Finnish children:a cohort study .*Lancet*,**v.371**,n.9626,p.177-82

Hawa, MI., Picardi, A., Costanza, F. et al. (2006) .Frequency of diabetes and thyroid auto antibodies in patients with autoimmune endocrine disease from Cameron. *Clin Immunology*; **118**: 229-32.

Heward, Jm. , Mijovic, Ch. , Kelly, Ma. , Morrison, E. e Barnett, Ah.(2002). HLA-DQ and DRB1 polymorphism and susceptibility to type 1 diabete in Jamaica. *Eur J Immunogenet*; **29(1)**: 47-52.

Ikegami, H.; Kaawabata,Y.; Nosso, S. et al.(2007).Genetics of type 1 diabetes in Asian and Caucassian populations .*Diabetes Res.Clin.***77**:116-21.

INTERNACIONAL DIABETES FEDERATION. IDF.(2010) Diabetes Atlas.Diabetes in the Young: a Global Perspective. Internacional.Diabetes Federation.

Izaabel,H.; Garchon H-J; Beaurain,G.;Biga,M.et al.(1996) .Distribution of HLA class II alleles and haplotype in insulin dependent Moroccan diabetics .*Human Immunol.***49**:137.

Japan and Pittsburgh Childhood Diabetes Research Groups. (1985). Coma at onset of young insulin-dependent diabetes in Japan: the result of nationwide survey. *Diabetes*; **34**: 1241-46.

Kapitány. A., Zilahi, E., Szántó, S et al. (2005). "Associação de artrite reumatóide com HLA-DR1 e HLA-DR4 na Hungria". *Ann. NY Acad. Sci* ;**1051**:263-270.

Karjalainen, J., Salmela, P., Ilonen, J., Surgel, Hm. e Knip, M.(1989).A comparison of childhood and adult type 1 diabetes mellitus. *N Engl J Med*; **320**:881-6.

Karvonen M, Laporte R, Libman I, Tuomilehto J, Viik-Kajander M. (2000). Incidence of childhood Type 1 Diabetes Worldwide **23(10)**: 1516-1526.

Kalk, Wj., Krl H. e Raal, Fj. (1993). A idade de início e distribuição por sexo de insulino-dependente diabetes mellitus em africanos na África do Sul. *Pós-Med J*; **69**: 552-56.

Kawasaki, E. e Eguchi, K, (2004). Is Type 1 diabetes in the Japanese population the same as among Caucasians? *Ann N Y Acad Sci* .**1037**:96-103.

Kawasaki, E., Takino, H., Yano, M., Uotani, S., Matsumoto, K., Yamaguchi, Y., Akazawa, S. e Nagataki, S. (1994). Evaluation of islet-specific autoantibodies in Japanese patients with insulin-dependent diabetes mellitus: a comparison between autoantibodies to glutamic acid decarboxylase, autoantibodies to 64 kDa islet cell protein and islet cell antibodies. *J-Autoimmun*; **6**: 791-802.

Kawasaki, E., Sera, Y., Fujita, N et al (2001) Association between IA-2 autoantibody epitope specificities and age of onset in Japanese patients with autoimmune diabetes. *J Autoimmun*; **17**:323–331.

Klein, J e Sato. (2000). The HLA System. *N Engl J Med*; 343:702-709.

Kolb, H., Dannehl, K., Grünekle, D. et al. (1998). Prospective analysis of islet cell antibodies in children with type 1 (insulin-dependent) diabetes. *Diabetologia* .**31**:189-94.

Krolewski, As., Warram, Jh., Rand, Li. e Kahn, Cr.(1997). Epidemiologic approach to the etiology of type 1 diabetes mellitus and its complications. *N Engl J Med*; **317**:1390-8.

Ladin-Olsson, M., Palmer, Jp., Lernmarks, L., Sundkvist, G., Nystram, L. e Dahlquist, G. (1992). Predictive value of islet cell and insulin autoantibodies for Type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus in a population-based study of newly-diagnosed diabetic and matched control children. *Diabetologia*; **5**:1068-1073.

LaPort, E. e Cruickshanks, Kj. (1984). *Incidence and risk factors for insulin-dependent diabetes*. National Diabetes Data Group. Diabetes in America. 85-1468.

Lambert, AP., Gillespie, KM., Thomson, G et al (2004) Absolute risk of childhood-onset type 1 diabetes defined by human leukocyte antigen class II genotype: a population-based study in the United Kingdom. *J Clin Endocrinol Metab*; 89:4037–4043.

Lechler, R e Warrens, A (2000). *HLA in Health and Disease*. 2 ed. London: Academic press. 472 p.

Libman, Im., Pietropaolo, M., Dorman, Js., LaPorte, E. e Becker, D. (1982). Islet cell autoimmunity in white and black children and adolescents with IDDM. *Diabetes Care*; **21**: 1824-1827.

Libman, Im., Pietropaolo, M., Arsalanian, SA., et al. (2003). Evidence for heterogeneous pathogenesis of insulin-treated diabetes in black and white children. *Diabetes Care* ;**10**:2876-82.

- Lima, G., Nóbrega, H.C., e Nóbrega, L. C. (2001). *Atlas em Endocrinologia*. São Paulo: Atheneu. 351p.
- Lindholm, E. , Hallengren, B., Agardh, CD.(2004).Gender differences in GAD antibody-positive diabetes mellitus in relation to age at onset , C-peptide and other endocrine autoimmune diseases *.Diabetes Metab Rev. ;158-64.*
- Liu, E., e Eisenbarth, Gs. (2002).Type 1A diabetes mellitus associated autoimmunity. *EndocrinolMetabClin North Am; 31:391-410.*
- Lohmann, T., Kellner, K., Verlohren, HJ., Krug, J., Steindorf, J., Scherbaum ,WA. et al. (2001) Titre and combination of ICA and autoantibodies to glutamic acid decarboxylase discriminate two clinically distinct types of latent autoimmune diabetes in adults (LADA). *Diabetologia; 44:1005–10.*
- Lombard, Z., Brune,Ae., Hoal ,Eg., Babb, C., Van Helden,Pd., Epplen, Jt. e Bornman, L. (2006). HLA class II disease associations in southern Africa. *Tissue Antigens; 67(2):97-110.*
- Lutale, Jjk., Thordarson, H., Holm, Pi., Eideand, Ge. e Vetvik, K. (2007).Islet cell autoantibodies in African patients with Type 1 and Type 2 diabetes in Dar es Salaam Tanzania: a cross sectional study.*Journal of Autoimmune Diseases; 4:4doi: 10.1186/1740-2557-4-4.*
- Mackay, I. e Rosen, Fs. (2000).*The HLA system: First of two parts. N Engl J Med. 343:702-9.*
- Marques, SBD., Volpini, W., Caillant-Zucman, S., Lieber, SR., Pavin, EJ., Persoli, LB(1998). Distribution of HLA-DRB1 alleles in mixed population with insulin-dependent diabetes mellitus from the Southeast of Brazil *.Braz J Med Biol Res ; 31:365-8*
- McLarty, D., Athaide, I., Bottazzo, GF., Swai, ABM. e Alberti, KGMM.(1990)Islet cell antibodies are not specifically associated with insulin- dependent diabetes in rural *Tanzanian Africans.Diabetes Res ClinPract ;9: 219-24.*
- Mbanya, Jcn., Ngogang, J., Salah, Jn., e Balkau, B. (1997). Prevalence of NIDDM and impaired glucose tolerance in a rural and an urban population in Cameroon.*Diabetologia 40:824-829.*
- Mbanya, JC ., Sobngwi, E e Mbanya, DN. (2001).HLA-DRB1, -DQA1, -DQB1 and DPB1 susceptibility alleles in Cameroonian type 1 diabetes patients and controls. *Eur J Immunogenet.; 4:459*
- Medici, F., Hawa MI., Giorgini, A., Panelo, A., Solfelix, CM., Leslie, RD et al.(1999). Antibodies to GAD65 and a tyrosine phosphatase – like molecule IA-2ic in Filipino type 1 diabetic patient’s *.Diabetes Care; 22: 1458-61.*
- Moreira, Mc I., Müllerlara, G., Linden, R., Feksab, L., Tavares, G., Almeida, S., e Bolzanberlese, D. (2011). Frequency of the anti-glutamic acid decarboxylase immunological marker in patients with diabetes duration longer than three years in southern Brazil Universidade Feevale, Novo Hamburgo,

Rio Grande do Sul, Brazil .*Journal Medicina* ; **129**:130-3.

Nahas, R., Deghaide, NHS., Donadi, EA., Foss, MC., (2000).Frequency of HLA class II –DR and DQ antigens in Brazilian patients with type I diabetes. *Medicina (Ribeirão Preto)*; **958**:305-8.

Nepom GT. (1990) Aunified hypothesis for the complex genetics of HLA associations with IDDM.*Diabetes*; 39:1153-7.

Nepom, Gt. (1995).Class II antigens and disease susceptibility.*AnnulRevMed*; **46**:17-25

Nepom, Gt., e Kwok, Ww. (1998). Molecular basis for HLA-DQ associations with IDDM. *Diabetes*; **47**:1177-84.

Neto, A., Freitasand, M. e Foss, M. C.(2010). Prevalence of diabetes mellitus and impaired glucose tolerance in a rural community of Angola. *Diabetology & Metabolic Syndrome* ;**2:63 doi:** 10.1186/1758-5996-2-63.

Neufeld, M.,Maclaren,Nk., Riley, Wj. ,Lezotte, D. ,Mclaughlin,Jv., Silverstein, J. e Rosenbloon, Al. (1980).Islet cell and other organ-specific antibodies in U.S. Caucasians and Blacks with insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetes*.**29**:589-592.

Niskanen, Lk., Tuomi, T., Karjalainen ,J., Groop ,Lc. eUusitupa ,Mij. (1995). GAD antibodies in NIDDM. Ten-year follow-up from diagnosis. *Diabetes Care*.**18**:1557-65.

Noble,J.A.; Valdes,A.M.(2011).Genetic of the HLA Region in the Prediction of type1 Diabetes .*Curr.Diab.Rep.*,v.**11**,n.6,p.533-542

Notkins, A. e Lernmark, A (2001). Autoimmune type1 diabetes: resolved and unresolved tissues.*J ClinInvest* .**108**:1247-1252.

Omar, Ma.,Bottazzo, G. e Asmal, Ac.(1986).Islet cell antibodies and other autoantibodies in South African blacks and Indians with insulin dependent diabetes mellitus (IDDM).*HormMetab.Res* ;**18**:126-128.

Olufunmiayo, A. et.al (2012). Latentes Diabetes Mellitusauto-ímenes em adultos (LADA) e as suas características em um subconjunto dos nigerianos inicialmente administrado para a diabetes tipo 2. *Internacional de Arquivos de Medicina* ; **5 (1): 23. DOI:** 10.1186/1755-7682-5-23.

Ogata-K; Ohta-K; Kubo-H; Yamaguchi-A; Watanabe-H. Rinsho-Byori. May(1995). The glutamic acid decarboxylase (GAD) antibodies and their clinical significance.; 43(5): 468-70.

Owerbach, D., Naya, Fj., Tsai, Mj., Allander, Sv. , Powell, Dr. e Gabbay, Hg. (1997).Analysis of candidate for susceptibility to type1 diabetes. *Diabetes*; **46**:1069-74.

Padoa, CJ.(2011).The epidemiology and pathogenesis of type 1 diabetes mellitus in Africa.

*JEMDSA*; **16**:130-5.

Panz, Vr., Kalk, Wj., Zouvanis, M. e Joffe, Bi (2000). Distribution of autoantibodies to glutamic acid decarboxylase across the spectrum of diabetes mellitus seen in South Africa. *DiabetMed* .**17**:524-527.

Parry , CS., Brooks, RB(2008).

Peter, Wh., Lester, Ft., Kohnet, Kd. e Hildmann, W. (1986).The frequency of islet cell surfasse antibodies in newly diagnosed diabetics from Ethiopia. *Exclin Endocrinol*. **87**:326-332.

Pirie, Fj., Hammond, Mg., Motala, Aa. e Omar, Ma.(2001). HLA class II antigens in South African Blacks with type I .*Tissue Antigens*; **57(4)**:348-52.

Pociot , F.; Akolkar,B.; Concannon,P.; Erlich,H.A.;Julier ,C.;Morahan,G.;Nierras,C.R.; Todd,J.A.; Rich,S.S.;Nerup.J.(2010).Genetic of type 1 diabetes: What´s Next?. *Diabetes Journal* ,v.**59**,n.7,p.1561-1571.

Pozzilli, P.*et al.* (2001). Autoimmune diabetes not requiring insulin at diagnosis (Latent Autoimmune Diabetes of the Adult). *Diabetes Care* ;**24**:1460-7.

Rewers, M. e Klingensmith, Gj. (1997).Prevention of type 1 diabetes. *Diabetes Spectr*;**10**:282-92

Rheeder, P., Stolk, R. Grobde, DE.( 2001) Ethnic differences in C-peptide levels and anti-GAD antibodies in South African patient with diabetic ketoacidosis . *QJM*;**94**:39\_43.

Roglic, G., Pavlic-Renar, I., Sestan-Crnek, S., Prasek, M., Kadrnka-Lovrencic, M. e Radica, A *et.al.* (1995). Incidence of IDDM during 1988-1992 in Zagreb, Croatia. *Dialectologies*; **38**:550-4.

Ronningen, Ks. , Spurkland, A. Tait, Bd., Drummond, B., Lopez-Larrea, C., Baranda, Fs *et.al.* (1995). HLA class II associations in insulin-dependent diabetes mellitus among blacks, Caucasoid and Japanese .*Disease component*; **W6.4**:713-22.

Rosário, Pws., Reis, Js., Fagundes, Ta., Calsolari, Mr., Amim, R., Silva, Sc *et.al.*(2007)Latent Autoimmune Diabetes in Adults (LADA): usefulness of anti-GAD antibody titers and benefit of early insulinization. *ArqBrasEndocrinolMetab*; **51 (1)**:52-58.

Sanjeevi, CB. (2009).Type 1 diabetes research: Newer approaches and exciting developments.*Int J Diabetes* . ; **29(2)**: 49–51.

Savola, K., Sabbah, E., Kulmala, P., Vahasalo, P., Ilonen, J. e Knip, M. (1998). Autoantibodies associated with Type I diabetes mellitus persist after diagnosis in children. *Diabetologia* . ; **41**:1293-1297.

Fabiano Marcel Serfaty<sup>I, II</sup>; Joana R. Dantas<sup>III</sup>; Mirella H. Almeida<sup>III, IV</sup>; Juliana Domingues G.

Duarte<sup>V</sup>; Rosane Kupfer<sup>I</sup>; Felipe Campos<sup>III</sup>; Lenita Zajdenverg<sup>III</sup>; Adolpho Milech<sup>III</sup>; Melanie Rodacki<sup>III</sup>; José Egídio Paulo de Oliveira<sup>II</sup>. GADA persistence and detectable C peptide in patients with long standing *diabetes mellitus* type 1 Arq Bras Endocrinol Metab vol.54 no.5 São Paulo 2010

She, JX. (1996). Susceptibility to type I diabetes: HLA-DQ and DR revised. *Immunology Today*. **17**:323-9.

She, JX e Marron, MP. (1998). Genetic susceptibility factors in type: linkage, disequilibrium and functional analyses. *Curr Opin Immun*; **10**:682-8.

Sia, C. e Michael, W. (2005). The Role of HLA Class I Gene Variation in Autoimmune Diabetes. *Rev Diabet Stud*; **2**:97-109.

Sperling, MA (2002). Diabetes mellitus em crianças. In: Behrman RE, Kliegman RM, Jenson HB. Nelson: tratado de pediatria. 16. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.1740-63.

Steffes, MW., Sibley, S., Jackson, M., Thomas, W. (2003). Beta-cell function and the development of diabetes-related complications in the diabetes control and complications trial. *Diabetes Care*; **26**:832-6.

Syler, J.S. (2010) Immunomodulation for type 1 diabetes mellitus. *Int. J. Clin. Pract.*, v.64, S.166, p59-63.

Tait, KF. e Gough, SC. (2003). The genetics of autoimmune endocrine disease. *Clin Endocrinol*; **59**:1-11.

Thorsby, E., Gjertsen, H., Lunden, Kea., Ronningen, KS (1991) Insulin dependent diabetes mellitus susceptibility or protection may be determined by certain HLA-DQ molecules. *Bailleres Clin Endocrinol Metab*; **5**:361-373.

Thorsby, E. e Ronningen, KS. (1993). Particular HLA-DQ molecules play a dominant role in determining susceptibility or resistance to type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus. *Diabetologia*; **36**:371-7.

Thomson, G., Valdes, AM., Noble, JA et al (2007). "Efeitos factores predisponentes relativa da classe II HLA haplótipos DRB1-DQB1 e genótipos de diabetes tipo 1: uma meta-análise". *Tecido Antigénios*; **70 (2)**: 110-127.

Tsirogiani, A., Pipi, E., Soufleros, K. (2009). Specificity of islet cell autoantibodies and coexistence with other organ specific autoantibodies in type 1 diabetes mellitus. *Autoimmun Ver*: 687-91.

Turner, R., Stratton, I., Horton, V., Manley, S., Zimmet, P., Mackay, Ir et al (1997). Autoantibodies to islet cytoplasm and glutamic acid decarboxylase for prediction of insulin requirement in type 2 diabetes. *Lancet*; **350**:1288-93.

Vandewalle, Cl., Falorni, A., Svanholm, S., Lernmark, A., Pipeleers, Dg. et al (1995). High

diagnostic sensitivity of glutamate decarboxylase autoantibodies in IDDM with clinical onset between age 20 and 40 years. *J ClinEndocrinolMetab*; **80**:846-51.

Van Lummel , M.; Van Veelen ,P.A.; Zaldumbide, A.; De Ru, A.;Janssen, G.;Moustakas,A.; Papadopoulos, G.; Drijfhout, J.; Roep, B. ; Konig, F.Type I diabetes-associated HLA-DQ8 transdimer accommodates a unique peptide repertoire .*J.Biol.Chem.*,p.287,n 12,p.9514-24.

Vicario, JL., Martínez, Laso J., Corell, A., Martín, JM – Villa. , Morales, P., Lledó, G et al (1992) Comparision between HLA-DRB and DQ DNA sequences and classic serological markers as Type 1 diabetes mellitus predictive risk markers in the Spanish population. *Diabetologia*; **35**:475-481.

Volpini, WMG., Testa, GV., Marques, SBD., Alves, LI., Silva, MER., Dib, SA., et al (2001). Family- based association of HLA class II alleles and haplotype.s with type I diabetes in Brazillians reveals some characteristics of a highly diversified population. *Hum Immunol*; **62**:12226:33.

Wang, J., Miao, D., Babu, S., Yu, J., Barher, J., Klingensmith, G., et al (2007). Prevalence of autoantibody-negative diabetes is not rare at all ages and increases with older age and obesity. *J Clin Endocrinol Metabol*; **92**:88–92.

Wiest-Ladenburger, U., Hartmann, R., Hartmann, U., Berling, K., Böhm, Bo. e Richter, W. (1997). Combined analysis and single-step detection of GAD65 and IA2 autoantibodies in IDDM can replace the histochemical islet cell antibody test. *Diabetes*; **46**:565-71.

.WHO (World Health Organization), Galeria Virtual. Genebra, (2007). Apresenta informações a respeito da saúde mundial. Acedido em 12 ago. 2012, em <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/en/index.html>

Zimmet, PZ., Tuomi, T., Mackay, R., Rowley, MJ., Knowies, W., Cohen, M. et al.(1994).Latent autoimmune diabetes mellitus in adults (LADA): the role of antibodies to glutamic acid decarboxylase in diagnosis and prediction of insulin dependency. *Diabetic Med* .**11**: 299-303.

Zimmet, PZ. (1995).The pathogenesis and prevention of diabetes in adults.*Diabetes Care*; **18**: 1050-64.

Zanone, MM. , Catalfamo E., Pietropaolo, SL., Rabbone. I, Sacchetti. I, et al. (2003) Descarboxilase do ácido glutamico e ICA512/IA-2 auto-anticorpos como marcadores de doença e sua relação com a função das células beta residual e controlo glicemico em ovens diabéticos tipo 1 *Metabolism*; **52(1)**:25-9.



## 9. APÊNDICES

Apêndice A. Termo de consentimento livre e esclarecido

Apêndice B. Questionario para os voluntários

Apêndice C. Mapa para análise dos alelos HLA-DQ

Apêndice D: Mapa para análise dos alelos HLA-DR

Apêndice E. Exemplos de tipagem do HLA-DQ para DM 1

Apêndice F. Exemplos de tipagem do HLA-DR para DM 1

Apêndice G – Exemplos do ELISA /anti-GAD

Apêndice H. Resultados globais dos pacientes DM-I

## Apêndice A. Termo de consentimento livre e esclarecido



**UNIVERSIDADE AGOSTINHO NETO**  
**FACULDADE DE MEDICINA**

FICHA # \_\_\_\_\_

INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA:

**PESQUISA:** Análise do polimorfismo HLA/DR-DQ em pacientes angolanos portadores de Diabetes Mellitus tipo 1.

**Pesquisador Responsável:**

**Telefone para contato:**

**Pesquisador participante:**

**Telefone para contato:**

Você está sendo convidado(a) para participar, como voluntário, em uma pesquisa. Após ser esclarecido(a) sobre as informações a seguir, no caso de aceitar fazer parte do estudo, assine ao final deste documento, que está em duas vias. Uma delas é sua e a outra é do pesquisador responsável.

### **Qual o objectivo desta pesquisa?**

O objetivo é estudar a frequência dos polimorfismos HLA-DR/DQ em pacientes angolanos diabéticos tipo1, residente em Luanda/Angola. Trata-se de um estudo prospectivo, com coleta de dados de pacientes com diabetes Mellitus tipo 1. Será incluído nos estudos pacientes portadores de DM1 de ambos sexos, da cidade de Luanda. O objetivo é estudar a frequência dos polimorfismos HLA-DR/DQ em pacientes angolanos diabéticos tipo1 (estudo genético), residentes em Luanda/Angola.

### **Como faremos este estudo?**

Será colectada uma amostra de sangue, com o uso de agulhas e seringas descartáveis, o sangue será examinado através de técnicas de biologia molecular para avaliar o seu perfil genético, sendo que as variáveis analisadas serão: sexo, tempo da doença, além de dados laboratoriais. Os critérios de inclusão são todos os pacientes de ambos sexos portadores de DM1 com ou sem tratamento sem limite e idade, residentes em Luanda.

**Quais os riscos e custos?**

Não há riscos em participar da pesquisa., salvo o desconforto próprio de uma punção venosa. O seu custo neste estudo será o seu deslocamento até o local de colecta a indicar posteriormente. A colheita será feita no início da sua participação no estudo.

**O que você ganha com este estudo?**

A pesquisa não vai gerar benefício imediato, os seus benefícios serão sim a longo prazo. Espera-se que no final deste estudo seja possível contribuir para o entendimento dos factores que estão associados a um maior risco de desenvolver o Diabetes Mellitus tipo1.

**Quais são os seus direitos?**

Os seus dados pessoais são confidenciais e os resultados deste estudo serão usados para fins científicos. Você não será identificado por nome e terá acesso aos resultados da pesquisa através do seu contacto. Sua participação é voluntária, podendo retirar o seu consentimento a qualquer momento.

Eu, \_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_, abaixo assinado, concordo em participar do estudo \_\_\_\_\_, como sujeito. Fui devidamente informado e esclarecido pelo pesquisador \_\_\_\_\_ sobre a pesquisa, os procedimentos envolvidos, assim como os possíveis riscos e benefícios decorrentes de minha participação. Foi-me garantido o sigilo das informações e que posso retirar meu consentimento a qualquer momento, sem que isto leve à qualquer penalidade ou interrupção de meu acompanhamento/ assistência/tratamento.

Local e data \_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_

Nome: \_\_\_\_\_

Assinatura do sujeito ou responsável: \_\_\_\_\_

Declaro (a) que fui informado (a) dos objectivos e da justificativa desta pesquisa, todas as minhas dúvidas foram respondidas com clareza.

Declaro (a) ser de livre vontade minha participação nesta pesquisa.

Assinaturas:

Participante: \_\_\_\_\_

Testemunha (nos casos especiais): \_\_\_\_\_

Pesquisador: \_\_\_\_\_

Local e Data: \_\_\_\_\_

## Apêndice B. Questionario para os voluntários



### **UNIVERSIDADE AGOSTINHO NETO** **FACULDADE DE MEDICINA**

1. Nome Completo: \_\_\_\_\_
2. Endereço \_\_\_\_\_
3. Contacto Telefónico \_\_\_\_\_
4. Idade: \_\_\_\_\_. Sexo:  F  M
5. A quanto tempo foi diagnosticado a doença:  
\_\_\_\_\_
6. Qual foi teste realizado para o diagnóstico  
\_\_\_\_\_
7. Apresenta antecedentes familiares com DM – I?  Sim  não.  
Se sim, qual o grau de parentesco?  
\_\_\_\_\_
8. Utiliza alguma medicação para o controlo da doença?  Sim  não.  
Se sim, qual?  
 Oral  injectável  outras Especifique: \_\_\_\_\_
9. Faz algum acompanhamento médico?  Sim  não. Se sim, com que frequência?  
\_\_\_\_\_  
Com que frequência o paciente mede a glicemia?  
 Diariamente  semanalmente  mensalmente  raramente

10. Realiza alguma actividade física?  Sim  não. Se sim, com que frequência:

\_\_\_\_\_

11. O seus avos / pais são natural de

\_\_\_\_\_

12. Você é natural de

\_\_\_\_\_

13. Actualmente reside em

Observações: \_\_\_\_\_

Local e Data: \_\_\_\_\_



## Apêndice D: Mapa para análise dos alelos HLA-DR

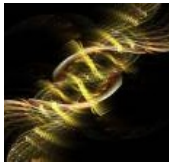
**AllSet+™ Gold SSP  
HLA-DR4T WORKSHEET  
Code no.: 54370D**

<b>Institution</b> _____	<b>Purpose of Test</b> _____	<b>Taq Lot#</b> _____
<b>Sample I.D.</b> _____	<b>DNA Extraction Method</b> _____	<b>Lot#</b> <u>020</u> <b>Batch#</b> _____
<b>Name</b> _____	<b>DNA Conc. (ng/ul)</b> _____	<b>Expiration Date</b> _____
<b>Ethnic Origin</b> _____	<b>Tested by</b> _____	<b>Test Date</b> _____
<b>Donor/Patient</b> _____	<b>Reviewed by</b> _____	<b>Review Date</b> _____

**Allele Assignment** \_\_\_\_\_

Serological Equivalent	Allele Specificity	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23		
DR1, -	DRB1*01:01:01-01:05/01:07-01:10/01:12-02:08/04-07/09-13/15-17/19-23/25-32/34-38/40N-43/45-49	1	2																							
-	DRB1*01:01:06/01:11/08/33N	1																								
DR103, -	DRB1*01:03/24/39N		2																							
-	DRB1*01:14	1	2				6												18							
-	DRB1*01:18/44	1	2										13													
-	DRB1*03:01:01-01:01-01:05/01:07-01:20/04-01-07/09/11-01-28/30-34/36-37/39/43-45/47-48/50-51/54-59/61-63/66-68N/70-73/77-78/80-84					5						11										21				
-	DRB1*03:01:06/46/64					6																21				
DR18, -	DRB1*03:02:01-03/29/53/74					5	6					11														
-	DRB1*03:08/65					5	6		8											19	21					
DR17	DRB1*03:10					5	6				11	12										21				
-	DRB1*03:35					5	6				11											20	21			
-	DRB1*03:38					5	6				11														22	
-	DRB1*03:40-41/49/52/75					5	6				11									19						
-	DRB1*03:42, DRB3*02:26			3																				22		
-	DRB1*03:60/69					5					11															
- DR6, DR14	DRB1*03:76, DRB1*13:56, DRB1*14:11/21/30/33					11					13	14										21				
-	DRB1*03:79, DRB3*01:14					5					11												21	22		
DR4, -	DRB1*04:01:01-02:01/02:03-11:02/13-14/16-17:02/19-21/23/26-27/29-34/36-41/44-53/55-57/60/63-68/70-77/79-81N/83-85/87-98:01/100/102-109/111-124							7																		
-	DRB1*04:02:02			2				7																		
- DR4	DRB1*04:12/18/25/58	1						7														20				
DR4, -	DRB1*04:15/61							7	8																	
DR4(3),	DRB1*04:22/24/78/82/98:02-99/101							7															18			
DR4, -	DRB1*04:28/35/42-43/59							7					10													
-	DRB1*04:54/86							7												18		20				
	<b>Product sizes</b>					80/90/105/110/159/170/186/195/200/225	140/145/155/200/205	200																		
	<b>Lane Number</b>	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23		
	<b>Positive Lanes</b>																									
	<b>1st match:</b>																									
	<b>2nd match:</b>																									
	<b>Failed Controls</b>																									
	<b>False Positive</b>																									
	<b>False Negative</b>																									

## Apêndice E. Exemplos de tipagem do HLA-DQ para DM 1



### Ficha de Resultados

**Tipo de Estudo:** Tipagem Molecular do HLA-DQB

**Nome:** Sexo: M

**Idade:** 43

**Amostra:** 38

**Código:** A-38

**Data da colheita:**

**Data da Extração:** 08/07/13

**Protocolo:** InstaGene™ Whole Blood Kit

**Operador:** Tatiana Ramos

**Data do PCR:**

**Protocolo:** AllSet+™ Gold SSP

**Lote do kit:** 004

**Operador:** Tatiana Ramos

Ramos

**Diluição:** sem diluição.

**Data da Electroforese:** 22.11.2013

**Protocolo:** AllSet+™ Gold SSP

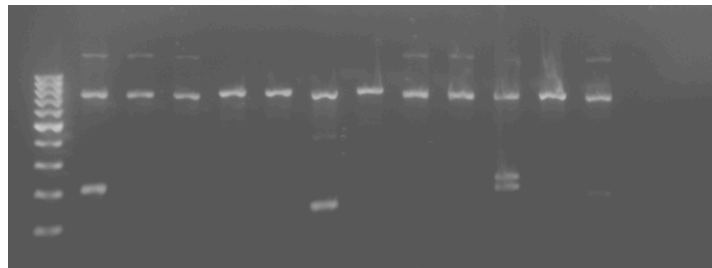
**Operador:** Tatiana Ramos

**Data do PCR (repetição):** **Protocolo:** **Lote do kit:** \_\_\_ **Operador:** **Diluição:**

**Data da Electroforese (repetição):** **Protocolo:** **Operador:**

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12

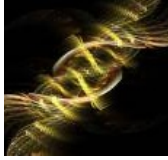
CN



1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	CN	
205					150				205				pb
									235				

ALELOS : HLA- DQB1\*03:01/02

\* 04:01/02



## Ficha de Resultados

**Tipo de Estudo:** Tipagem Molecular do HLA-DQB

**Nome:**                      **Sexo:** F                                      **Idade:** 12  
**Amostra:** 13              **Código:** A-13                                      **Data da colheita:**

**Data da Extracção:** 08/0713              **Protocolo:** InstaGene™ Whole Blood Kit              **Operador:**  
Tatiana Ramos

**Data do PCR:**                                      **Protocolo:** AllSet+™Gold SSP              **Lote do kit:** 004              **Operador:**  
Tatiana Ramos

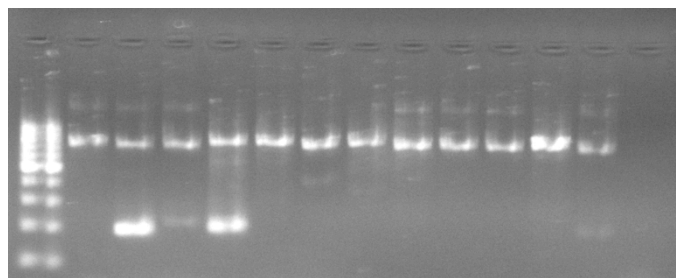
**Diluição:** sem diluição.

**Data da Electroforese:**              **Protocolo:** AllSet+™Gold SSP              **Operador:** Tatiana Ramos

**Data do PCR (repetição):**              **Protocolo:**              **Lote do kit:** \_\_              **Operador:**              **Diluição:**

**Data da Electroforese (repetição):**              **Protocolo:**              **Operador:**

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11  
12 CN

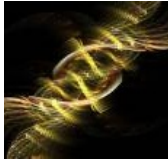


1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	CN	
---	---	---	---	---	---	---	---	---	----	----	----	----	--

	195		205									pb
--	-----	--	-----	--	--	--	--	--	--	--	--	----

ALELOS : HLA- DQB1\*02:01

\* 06



## Ficha de Resultados

**Tipo de Estudo:** Tipagem Molecular do HLA-DQB

**Nome:**                      **Sexo:** F

**Idade:** 9

**Amostra:** 16

**Código:** A16

**Data da colheita:**

**Data da Extracção:** 08/07/13    **Protocolo:** InstaGene™ Whole Blood Kit    **Operador:** Tatiana Ramos

**Data do PCR:**                      **Protocolo:** AllSet+™Gold SSP    **Lote do kit:** 004    **Operador:** Tatiana Ramos

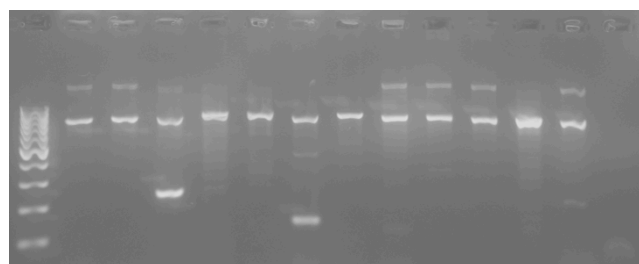
**Diluição:** sem diluição.

**Data da Electroforese:**            **Protocolo:** AllSet+™Gold SSP                      **Operador:** Tatiana Ramos

**Data do PCR (repetição):**            **Protocolo:**    **Lote do kit:**\_\_\_ **Operador:** **Diluição:**

**Data da Electroforese (repetição):**            **Protocolo:**    **Operador:**

1    2    3    4    5    6    7    8    9    10    11  
12 CN



1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	CN	
		230			150								pb

ALELOS : HLA- DQB1\*03:03

\* 05:01



## Ficha de Resultados

**Tipo de Estudo:** Tipagem Molecular do HLA-DQB

**Nome:**                      **Sexo:** F                                      **Idade:** 14  
**Amostra:** 06              **Código:** A-6                                      **Data da colheita:**

**Data da Extracção:** 10/07/13      **Protocolo:** InstaGene™ Whole Blood Kit      **Operador:** Tatiana Ramos

**Data do PCR:**                      **Protocolo:** AllSet+™Gold SSP      **Lote do kit:** 004      **Operador:** Tatiana Ramos

**Diluição:** sem diluição.

**Data da Electroforese:**      **Protocolo:** AllSet+™Gold SSP      **Operador:**

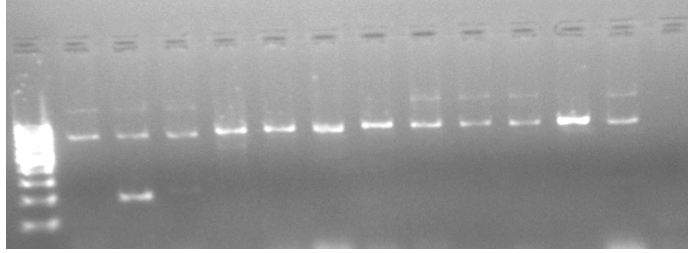
**Data do PCR (repetição):**      **Protocolo:**      **Lote do kit:** \_\_\_\_\_      **Operador:**

**Diluição:**

**Data da Electroforese (repetição):**      **Protocolo:**      **Operador:**

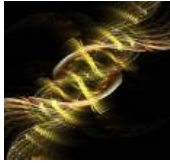
1   2   3   4   5   6   7   8   9   10

11 12 CN



1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	CN	
	195												pb

ALELOS : HLA- DQB1\*02:01



## Ficha de Resultados

**Tipo de Estudo:** Tipagem Molecular do HLA-DQB

**Nome:** **Sexo:** F **Idade:** 13  
**Amostra:** 08 **Código:** A-8 **Data da colheita:**

**Data da Extracção:** 10/07/13 **Protocolo:** InstaGene™ Whole Blood Kit **Operador:** Tatiana Ramos

**Data do PCR:** **Protocolo:** AllSet+™Gold SSP **Lote do kit:** 004 **Operador:** Tatiana Ramos

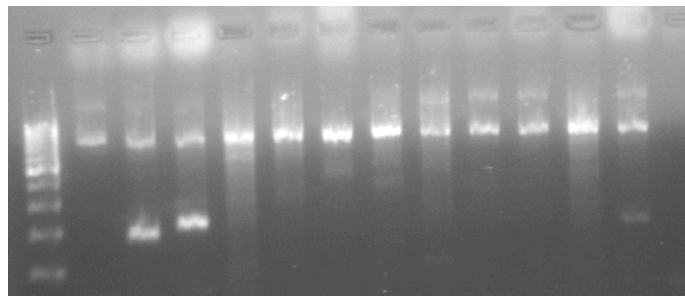
**Diluição:** sem diluição.

**Data da Electroforese:** **Protocolo:** AllSet+™Gold SSP **Operador:** Tatiana Ramos

**Data do PCR (repetição):** **Protocolo:** **Lote do kit:** \_\_\_ **Operador:** **Diluição:**

**Data da Electroforese (repetição):** **Protocolo:** **Operador:**

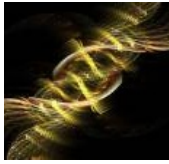
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10  
 11 12 CN



1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	CN	
	195	205											pb

**ALELOS : HLA- DQB1\*02:01**

\*05:0



## Ficha de Resultados

**Tipo de Estudo:** Tipagem Molecular do HLA-DQB

**Nome:**                      **Sexo:** M                      **Idade:**29  
**Amostra:**05              **Código:** A5                      **Data da colheita:**

**Data da Extracção:**              **Protocolo:** InstaGene™ Whole Blood Kit              **Operador:** Tatiana Ramos

**Data do PCR:**                      **Protocolo:** AllSet+™Gold SSP    **Lote do kit:**004    **Operador:** Tatiana Ramos

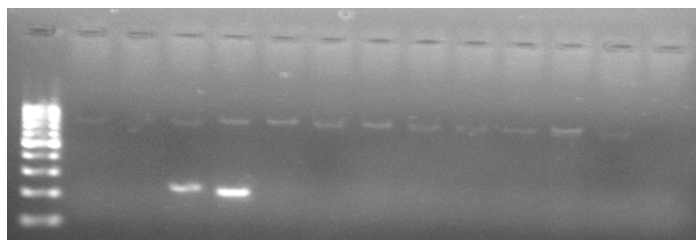
**Diluição:** sem diluição.

**Data da Electroforese:**    **Protocolo:** AllSet+™Gold SSP              **Operador:** Tatiana Ramos

**Data do PCR (repetição):**    **Protocolo:**    **Lote do kit:**\_\_\_    **Operador:**    **Diluição:**

**Data da Electroforese (repetição):**    **Protocolo:**              **Operador:**

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11  
 12 CN

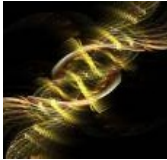


1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	CN	
		230	205										pb

ALELOS : HLA- DQB1\*05:01

\*06

## Apêndice F. Exemplos de tipagem do HLA-DR para DM 1



### Ficha de Resultados

**Tipo de Estudo:** Tipagem Molecular do HLA-DRB

**Nome:**                      **Sexo:** M                      **Idade:**14  
**Amostra:**10              **Código:** A10                      **Data da colheita:**

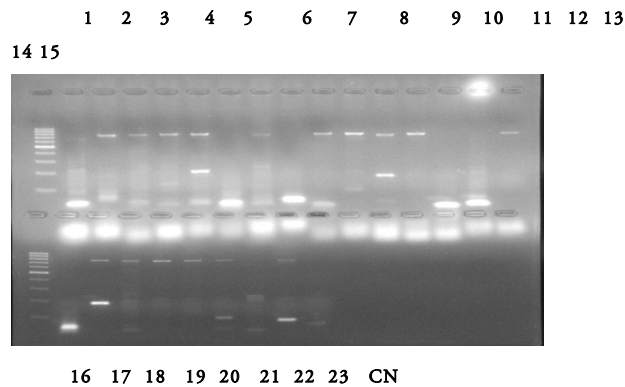
**Data da Extracção:**      **Protocolo:** InstaGene™ Whole Blood Kit              **Operador:** Tatiana Ramos

**Data do PCR:**              **Protocolo:** AllSet+™Gold SSP    **Lote do kit:**004    **Operador:** Tatiana Ramos  
**Diluição:** sem diluição.

**Data da Electroforese:**    **Protocolo:** AllSet+™Gold SSP              **Operador:** Tatiana Ramos

**Data do PCR (repetição):**    **Protocolo:**    **Lote do kit:**\_\_    **Operador:**    **Diluição:**

**Data da Electroforese (repetição):**    **Protocolo:**              **Operador:**

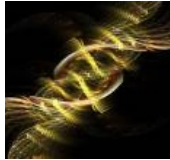


1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	
---	---	---	---	---	---	---	---	---	----	----	----	----	----	----	--

80				210											Pb
16	17	18	19	20	21	22	23	CN							
	150				95										Pb

ALELOS : HLA- DQR1\*03:0

\*09:04/06



## Ficha de Resultados

**Tipo de Estudo:** Tipagem Molecular do HLA-DRB

**Nome:**                      **Sexo:** F                      **Idade:**13

**Amostra:**8              **Código:** A8                      **Data da colheita:**

**Data da Extracção:** 10/07/13                      **Protocolo:** InstaGene™ Whole Blood Kit

**Operador:** Tatiana Ramos

**Data do PCR:**              **Protocolo:** AllSet+™Gold SSP    **Lote do kit:** 004    **Operador:** Tatiana Ramos

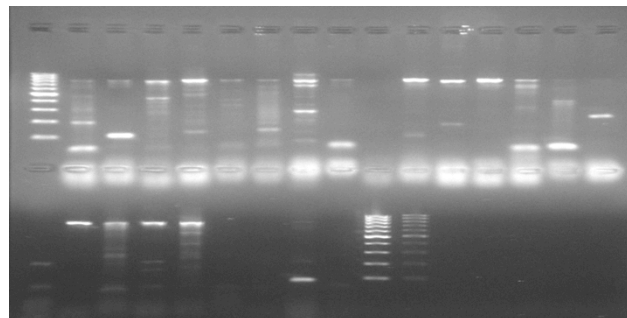
**Diluição:** sem diluição.

**Data da Electroforese:**    **Protocolo:** AllSet+™Gold SSP              **Operador:** Tatiana Ramos

**Data do PCR (repetição):**    **Protocolo:**    **Lote do kit:**\_\_    **Operador:**    **Diluição:**

**Data da Electroforese (repetição):**    **Protocolo:**              **Operador:**

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12  
13 14 15

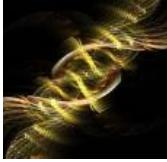


16 17 18 19 20 21 22 23 CN

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	
80	105													235	pb
16	17	18	19	20	21	22	23	CN							
															pb

ALELOS : HLA- DQR1\*01:01/02

\*07:01



## Ficha de Resultados

**Tipo de Estudo:** Tipagem Molecular do HLA-DRB

**Nome:**                      **Sexo:** M

**Idade:**10

**Amostra:**14              **Código:** A14

**Data da colheita:**

**Data da Extracção:** 10/07/13      **Protocolo:** InstaGene™ Whole Blood Kit      **Operador:** Tatiana Ramos

**Data do PCR:**                      **Protocolo:** AllSet+™Gold SSP      **Lote do kit:** 004      **Operador:** Tatiana Ramos

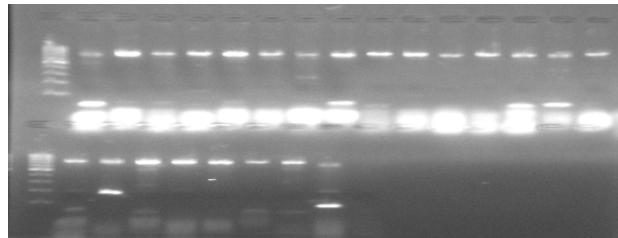
**Diluição:** sem diluição.

**Data da Electroforese:**      **Protocolo:** AllSet+™Gold SSP              **Operador:** Tatiana Ramos

**Data do PCR (repetição):**      **Protocolo:**      **Lote do kit:**\_\_      **Operador:**      **Diluição:**

**Data da Electroforese (repetição):**      **Protocolo:**              **Operador:**

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11  
12 13 14 15



16 17 18 19 20 21 22 23 CN

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	
80						95									pb
16	17	18	19	20	21	22	23	CN							
	190														pb

ALELOS : HLA- DQR1\*04:01/02

\*09:04/06



## Ficha de Resultados

**Tipo de Estudo:** Tipagem Molecular do HLA-DRB

**Nome:**                      **Sexo:** M                      **Idade:**14  
**Amostra:**12              **Código:** A12                      **Data da colheita:**

**Data da Extracção:**              **Protocolo:** InstaGene™ Whole Blood Kit              **Operador:** Tatiana Ramos

**Data do PCR:**                      **Protocolo:** AllSet+™Gold SSP    **Lote do kit:** 004    **Operador:** Tatiana Ramos

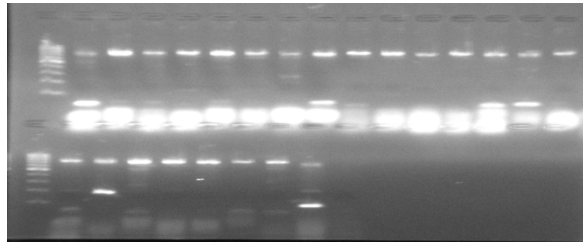
**Diluição:** sem diluição.

**Data da Electroforese:**    **Protocolo:** AllSet+™Gold SSP              **Operador:** Tatiana Ramos

**Data do PCR (repetição):**    **Protocolo:**    **Lote do kit:**\_\_\_ **Operador:**    **Diluição:**

**Data da Electroforese (repetição):**    **Protocolo:**              **Operador:**

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11  
 12 13 14 15



16 17 18 19 20 21 22 23 CN

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	
80															pb
16	17	18	19	20	21	22	23	CN							
	190						80								pb

ALELOS : HLA- DQR1\*09:04/06

DRB4\*01:01/03

DRB5\*01:01/02

## Apêndice G – Exemplos do ELISA /anti-GAD



### ELISA

### Ficha de Resultados

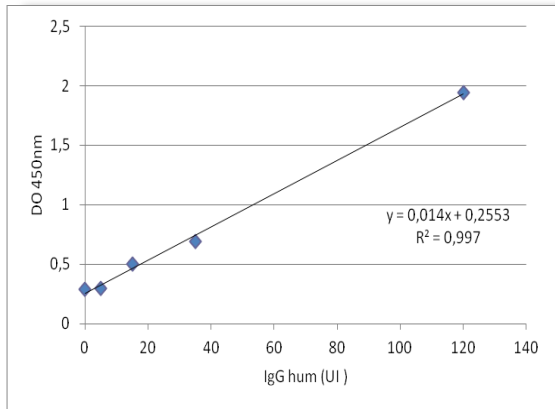
**Tipo de Estudo:** Determinação de anticorpos (anti-GAD)

**Protocolo :** anti-GAD ELISA , EA 1022-9601 G da EUROIMMUN

**Data de processamento:** 12.08.2013

#### Curva de Calibração

Calibradores	IgG hum (UI )	DO <sub>450 nm</sub>
C1	2000	-



<b>C2</b>	250	-
<b>C3</b>	120	1,941
<b>C4</b>	35	0,6945
<b>C5</b>	15	0,5
<b>C6</b>	5	0,296
<b>CN</b>	0	0,287
<b>CP</b>		0,985

## Resultados

UI IgG hum < 10 negativos

UI IgG hum >= 10 positivos

Amostras	DO <sub>450 nm</sub>	IgG hum (UI)
DM-6	3,1125	204
DM-9	0,6875	31
DM-14	2,894	189



## ELISA

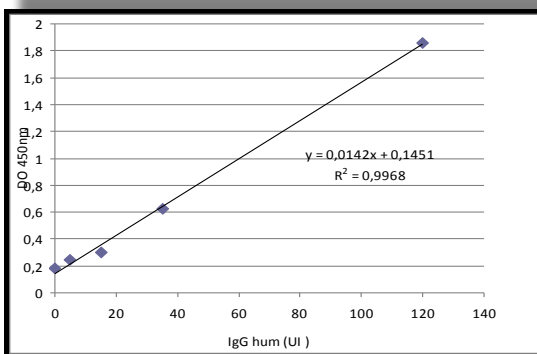
### Ficha de Resultados

**Tipo de Estudo:** Determinação de anticorpos (anti-GAD)

**Protocolo :** anti-GAD ELISA , EA 1022-9601 G da EUROIMMUN

**Data de processamento:** 18.12.2013

#### Curva de Calibração



Calibradores	IgG hum (UI)	DO <sub>450nm</sub>
C1	2000	-
C2	250	-
C3	120	1,861
C4	35	0,627
C5	15	0,297
C6	5	0,249
CN	0	0,178
CP		0,749

## Resultados

UI IgG hum < 10 negativos

UI IgG hum >= 10 positivos

Amostras	DO <sub>450nm</sub>	IgG hum (UI)	Controlos	DO <sub>450nm</sub>	IgG hum (UI)
DM-2	0,116	-2	C-16	0,144	0
DM-5	0,149	0	C-17	0,158	1
DM-15	0,185	3	C-18	0,141	0
DM-10	0,517	27	C-19	0,163	1
DM-36	0,23	6	C-20	0,085	-4
DM-18	0,734	42	C-2	0,139	0
DM-37	0,204	4	C-3	0,158	1
DM-43	0,14	0			
DM-45	0,193	3			
DM-44	0,143	0			
DM-39	0,184	3			
DM-42	2,184	146			

## Apêndice H. Resultados globais dos pacientes DM-I

Nº	ID	SEXO	IDADE	TEMPO	anti-GAD	Ig hum	DQB1*	DRB1*	DRB4*	DRB5*
				Diagnóstico		( UI)				
1	A5	M	29	14anos	negativo	<10	05:01 06	01:01 13:74		
2	A6	F	14	3anos	positivo	204	02:01	01:01 03:38		
3	A8	F	13	8anos	positivo	37	02:01 05:01	01 :01/02 07:01		
4	A9	M	15	7anos	positivo	31	02:01	09:04/06		
5	A10	F	14	3anos	positivo	27	02:01	03:01 09:04/06		
6	A11	M	13	3anos	negativo	<10	NR	03:01 13		
7	A12	M	14	1ano	positivo	79	02:01	09:04/06	01:01/03	01:01/02
8	A13	F	12	3anos	positivo	204	02:01 06:01	03:38		
9	A14	F	10	3anos	positivo	189	02:01	04:01/02 09:04/06		
10	A15	M	27	1	negativo	<10	03:01 06:01	01:01/02 10:01		
11	A16	F	9	4anos	negativo	<10	05:01 03:03	01:01/02		
12	A18	M	14	3anos	positivo	42	02:01	01:01		
13	A21	F	17	2anos	negativo	<10	NR	03:02 11	01:01	01:01
14	A23	M	32	9anos	negativo	<10	NR	NR		
15	A37	M	56	3dias	negativo	<10	NR	NR		
16	A38	F	43	3dias	negativo	<10	03:01/02 04:01/02	03:01 11		
17	A40	M	53	3anos	negativo	<10	NR	10:01 16:01		
18	A41	M	9	1 mês	positivo	67	02:01	03:01 13		
19	A42	F	14	3 anos	positivo	146	NR	01:01/02		
20	A45	M	20	2anos	negativo	<10	05:01 06:01	01:01/02 09:04/06		
21	A49	M	28	2anos	negativo	<10	NR	NR		
22	A50	M	24	3anos	negativo	<10	NR	NR		
23	A51	F	14	1ano	negativo	<10	NR	01:01/02 13		
24	A52	M	25	1ano	negativo	<10	05:01 04:01/02	03:02 11		

Análises do polimorfismo HLA/DR-DQ em Angolanos portadores de Diabetes *Mellitus* tipo 1

25	A53	M	21	5anos	negativo	<10	NR	NR		
26	A54	F	23	4anos	negativo	<10	NR	NR		
27	A55	M	23	3anos	negativo	<10	NR	NR		
28	A56	M	35	8anos	negativo	<10	NR	NR		
29	A57	M	17	1ano	negativo	<10	NR	NR		
30	A43	F	22	2anos	negativo	<10	NR	NR		
31	A44	F	17	3anos	negativo	<10	NR	NR		
32	A2	F	33	5anos	negativo	<10	06:01 05:01	01:01/02 15:10		
33	A46	M	29	3anos	NR	<10	NR	08:04 13		
34	A48	F	23	3anos	NR	<10	NR	03:01		
35	A39	M	8	8 dias	negativo	<10	NR	01:01/02 04:01/02		
36	A36	F	36	4anos	negativo	<10	NR	01:01/02 13		
37	A62	F	12	2 meses	positivo	48	02:01	03:01 09:04/06		
38	A61	M	34	2anos	positivo	367	02:01 03:02	04:01		
39	A59	M	61	2anos	positivo	14	03:02	NR		
40	A58	M	52	1ano	positivo	13	NR	NR		
41	A60	F	7	3meses	positivo	401	02:01	01:01 03:01		
42	A63	M	42	2anos	positivo	153	NR	NR		
43	A64	M	59	6anos	positivo	177	NR	NR		
44	A65	M	55	5anos	positivo	25	NR	NR		
45	A66	M	24	13anos	positivo	150	02:01 05:01	01:01 07:01		
46	A67	M	13	1ano	positivo	207	02:01	NR		
47	A68	M	37	5 meses	positivo	10	03:02 02:01	NR		
48	A69	F	12	1ano	positivo	157	02:01	03:01		
49	A70	F	10	8 meses	positivo	150	02:01	NR		
50	A71	F	22	10anos	positivo	153	02:01 06:01	01:01 03:38		
51	A72	M	64	10anos	positivo	54	NR	NR		
52	A73	M	59	6anos	positivo	19	NR	NR		