

## *Distribuição e Frequência de Alelos e Haplotipos HLA em Brasileiros Com Diabetes Melito Tipo 1*

*Crésio Alves  
Isadora Meyer  
Nara Vieira  
Maria Betânia P. Toralles  
Denise LeMaire*

*Faculdade de Medicina,  
Universidade Federal da  
Bahia, Salvador, BA.*

*Recebido em 26/04/05  
Revisado em 13/12/05  
Aceito em 22/03/06*

### RESUMO

A predisposição genética ao diabetes melito tipo 1 (DM1) é associada a múltiplos genes do sistema de histocompatibilidade humano (HLA) de classe II. Em caucasianos, os antígenos HLA-DR3 e -DR4 são associados à susceptibilidade e o -DR2, à proteção. No Brasil, um país constituído por grande miscigenação entre caucasianos europeus, índios nativos e negros africanos, a base genética do DM1 tem sido pouco estudada. O objetivo desse trabalho foi apresentar uma revisão crítica dos artigos indexados nos bancos de dados MEDLINE e LILACS-BIREME sobre a associação do HLA com DM1 em brasileiros. Todos os oito estudos encontrados foram realizados no sudeste do país. A susceptibilidade imunogenética para o DM1 em brasileiros foi associada com os alelos *HLA-DRB1\*03*, *-DRB1\*04*, *-DQB1\*0201*, *-DQB1\*0302* e a proteção com os alelos *-DQB1\*0602* e *-DQB1\*0301* e os antígenos -DR2 e -DR7. Por ser o Brasil constituído por grande miscigenação, não se pode extrapolar para todo o país estudos realizados em apenas uma região. Faz-se necessário pesquisar populações de várias regiões, analisando sua diversidade alélica para identificar novas associações ou reforçar aquelas já existentes. Esse conhecimento contribuirá para futuras intervenções profiláticas e terapêuticas nos grupos de brasileiros com maior risco de desenvolver DM1. (Arq Bras Endocrinol Metab 2006;50/3:436-444)

**Descritores:** Diabetes melito tipo 1; Diabetes melito insulino-dependente; HLA; Complexo principal de histocompatibilidade; Brasil; População brasileira

### ABSTRACT

#### **Distribution and Frequency of HLA Alleles and Haplotypes in Brazilians With Type 1 Diabetes Mellitus.**

The genetic predisposition to type 1 diabetes (DM1) is associated with genes of the human leukocyte antigen (HLA) system, specially the HLA-DR and -DQ. In Caucasians, the HLA-DR3 and -DR4 antigens are associated with susceptibility and the -DR2, with protection. In Brazil, a country with a large miscegenation of Europeans Caucasians, Native Amerindians and African Blacks, the genetic basis of DM1 has not been adequately studied. The aim of this paper is to present a critical review of articles indexed in the MEDLINE and LILACS-BIREME data basis about the association of HLA with DM1 in Brazilians. Eight papers, all of them from the Southeast region, were found. Immunogenetic susceptibility to DM1 in Brazilians was associated with *HLA-DRB1\*03*, *-DRB1\*04*, *-DQB1\*0201*, *-DQB1\*0302* alleles, and protection against DM1 was associated with *HLA-DQB1\*0602*, *-DQB1\*0301* alleles and -DR2 and -DR7 antigens. Since the Brazilian population is not racially homogeneous, it is not possible to extrapolate studies from a single region to the remaining of the country. It is necessary to study populations from different regions to identify new associations or to strengthen associations with the ones already identified. This knowledge will con-

tribute to future prophylactic or therapeutic interventions in the group of Brazilians at risk of developing DM1. (Arq Bras Endocrinol Metab 2006;50/3:436-444)

**Keywords:** Type 1 diabetes; Insulin-dependent diabetes mellitus; HLA; Major histocompatibility complex; Brazil; Brazilian population

**A**SSOCIAÇÃO DOS ALELOS DE CLASSE II do complexo principal de histocompatibilidade (MHC=*major histocompatibility complex*) com o diabetes melito tipo 1 (DM1) está bem definida, sendo responsável por 30-40% da agregação familiar da doença (1,2). Determinadas combinações de alelos do HLA estão associadas à susceptibilidade ou resistência ao DM1. As regiões HLA-DR e -DQ são associadas com o DM1 em todos os grupos étnicos estudados, principalmente os alelos HLA-DQB1\*0302 e/ou -DQB1\*0201 (3). Porém, a susceptibilidade ao desenvolvimento do DM1 é mais relacionada a determinados haplotipos HLA de classe II específicos ao invés de alelos isolados (4). Em caucasianos, o maior risco de desenvolver a doença está relacionado ao genótipo HLA-DR3-DQA1\*0501-DQB1\*0201/DR4-DQA1\*0301-DQB1\*0302 (5) e a associação negativa mais forte está relacionada ao genótipo HLA-DRB1\*1501-DQA1\*0102-DQB1\*0602 (6).

Na região do HLA de classe II estão situados os *loci* HLA-DR, -DQ e -DP, que codificam as moléculas HLA de classe II clássicas. A família gênica HLA-DR compreende um único gene que codifica a cadeia  $\alpha$  (-DRA), quatro genes que codificam a cadeia  $\beta$  (-DRB1, -DRB2, -DRB4 e -DRB5) e cinco pseudogenes. As famílias HLA-DQ e -DP possuem um gene  $\alpha$  e um gene  $\beta$  e um outro par de genes que pode ou não ser funcional. Estes são os principais genes associados à proteção ou à susceptibilidade ao DM1. O mecanismo pelo qual os alelos do HLA predispõem ou protegem contra o DM1 ainda não está completamente esclarecido, mas provavelmente relaciona-se com diferenças quanto à afinidade de peptídeos autólogos com moléculas distintas, um processo complexo envolvendo diversas combinações de alelos de classe II, que interagem entre si e participam da resposta imune resultando em efeito (7).

O polimorfismo das especificidades HLA pode ser detectado por métodos celulares ou de biologia molecular (8,9). Os métodos celulares mais usados são o da microlinfocitotoxicidade de Terasaki (10) e a cultura mista de linfócitos. O primeiro método detecta os antígenos leucocitários através de citotoxicidade mediada por anticorpo e dependente do complemento. São

utilizados linfócitos T para a tipificação de antígenos HLA-A, -B e -C, e linfócitos B para antígenos HLA-DR e -DP. Não há anti-soros específicos para a tipificação de antígenos HLA-DP através desse método. A cultura mista de linfócitos utiliza células com fenótipo conhecido para definir as especificidades HLA. Os métodos moleculares mais usados são o SSP (*sequence-specific primers*) e o SSOP (*sequence-specific oligonucleotides probes*). Ambos utilizam o DNA amplificado pela reação em cadeia da polimerase (PCR= *polymerase chain reaction*) (11,12). O método SSP utiliza iniciadores (*primers*) de oligonucleotídeos com seqüências específicas, capazes de detectar um alelo ou um grupo deles. Já o SSOP utiliza sondas (*probes*) de oligonucleotídeos com seqüências específicas, desenhadas para reconhecer um ou alguns alelos de um determinado grupo (8).

É bastante conhecida a diversidade dos haplotipos HLA-DRB1-DQA1-DQB1 em populações racialmente e etnicamente distintas, o que pode explicar, em parte, a diferença nas taxas de ocorrência da doença. Por exemplo, a incidência de DM1 varia de 36,6/100.000 habitantes/ano na Sardenha, a 5/100.000 habitantes/ano nas regiões centrais da Itália continental, tendo sido sugerido que essa diferença se deva à baixa freqüência dos haplotipos associados ao DM1 na população da Itália continental (3). Essa diversidade de haplotipos HLA é pequena em caucasianos (13) e acentuada em negros (14). A maioria dos estudos nessa área tem sido realizada em caucasianos europeus e norte-americanos (1,4,15,16). Outras populações estudadas tem sido as da África do Sul (17), Jamaica (18), Camarões (19) e Japão (20-22), apenas para citar alguns exemplos.

A população brasileira é geneticamente muito diversa, resultante da contribuição de três grandes grupos: caucasianos, africanos e índios americanos. A maioria dos caucasianos veio de Portugal, Espanha, Itália e Alemanha. Os africanos trazidos para o Brasil na época colonial pertencem principalmente aos grupos de língua Bantu, provenientes da África Equatorial, enquanto os índios se originam predominantemente das tribos Tupi e Tapuia (23). A população brasileira é, portanto, formada pela mistura dessas três raças, gerando uma população "mestiça", onde a mistura de caucasianos com índios gera um subtipo denominado caboclo, a de caucasianos com africanos forma o subtipo dos mulatos e a mistura de africanos com índios forma o subtipo dos cafusos. Devido ao grande tamanho territorial do Brasil e as diversidades da sua colonização, diferentes regiões do país apresentaram predominância maior ou menor de cada um dos subtipos populacionais descritos (24-26).

O objetivo do presente estudo é revisar todos os artigos publicados na literatura médica sobre a associação do HLA com DM1 em brasileiros, a fim de verificar a distribuição e frequência de alelos e haplotipos HLA nestes pacientes e compará-la com a de outras populações estudadas.

A tabela 1 apresenta um glossário descrevendo as definições dos principais termos usados na literatura relacionada ao HLA.

## METODOLOGIA

Revisão de todos os trabalhos publicados na literatura médica, nas línguas portuguesa, inglesa ou espanhola, entre 1980–2005, que abordassem a associação de HLA e DM1 em brasileiros. Os artigos foram pesquisados através dos bancos de dados MEDLINE (PubMed: *Cumulative Index Medicus*) e LILACS–BIREME (Literatura Latino-Americana e do Caribe em Ciências da Saúde). Na pesquisa bibliográfica, foram utilizados, em várias combinações, os seguintes termos de pesquisa (palavras-chave): “type 1 diabetes mellitus”; “insulin-dependent diabetes”; “Brazil”; “Brazilian population”; “HLA”; “diabetes melito tipo 1”; “diabetes melito insulino-dependente”; “Brasil”; e “população brasileira”. Além disso, foi feita uma revisão das referências bibliográficas de todos os artigos encontrados, com o objetivo de ampliar a busca.

Foram incluídos consensos, editoriais, artigos originais e de revisão. Foram excluídos artigos sob a forma de relatos de casos e que não fossem escritos nas línguas citadas nos critérios de inclusão.

## RESULTADOS

Foram identificados na literatura apenas 8 referências sobre a associação do HLA com diabetes melito tipo 1 em brasileiros: 6 artigos completos (7,27-31) e 2 resumos de trabalho publicados em evento científico (32,33).

Em 1981, no Rio de Janeiro, Gomes e cols. (27) estudaram a associação entre HLA e DM1 utilizando o método de microlinfocitotoxicidade para a fenotipagem do HLA. A frequência relativa dos antígenos HLA e o risco relativo (RR) para desenvolvimento do DM1 foram determinados pelo estudo de 20 famílias contendo 82 indivíduos, dos quais 23 eram portadores da doença. O grupo controle foi constituído por 102 indivíduos sadios que estavam sendo submetidos à triagem como doadores para transplante renal. Os antígenos HLA-B8, -B13 e -B15 apresentaram as mais altas frequências relativas no grupo dos pacientes diabéticos, enquanto os antígenos HLA-B5, -B7 e -B12 apresentaram as mais baixas. Não houve diferença estatisticamente significativa na distribuição de frequência relativa dos antígenos do

**Tabela 1.** Glossário de alguns dos principais termos usados nos estudos sobre HLA.

**CPH (Complexo Principal de Histocompatibilidade), do inglês MHC (Major Histocompatibility Complex):** região cromossômica onde estão localizados genes que codificam as moléculas de histocompatibilidade em uma espécie.

**HLA (Human Leukocyte Antigen):** denominação do CPH em seres humanos.

**Haplotipo:** informação genética presente em um cromossomo (origem paterna ou materna).

**Genótipo:** informação genética contida nos dois cromossomos (origem paterna e materna).

**Fenótipo:** característica física determinada por um ou mais genes.

**Alelo:** variante de um gene polimórfico.

**Locus:** local ocupado por um gene no cromossomo. Plural: loci.

**Polimorfismo genético:** existência de dois ou mais alelos de um determinado gene na população.

**PCR-SSP (sequence-specific primers):** método de Biologia Molecular que utiliza o DNA amplificado e iniciadores (primers) de oligonucleotídeos com seqüências específicas, capazes de detectar um alelo ou um grupo deles.

**PCR-SSOP (sequence-specific oligonucleotides probes):** método de Biologia Molecular que utiliza o DNA amplificado e sondas (probes) de oligonucleotídeos com seqüências específicas, desenhadas para reconhecer um ou alguns alelos de determinado grupo.

**AFBAC (affected family-based controls):** desenho de estudo no qual os alelos parentais não transmitidos para os pacientes são utilizados como grupo controle. Ao retirar a interferência causada pela estratificação, mistura e efeitos migratórios, esse modelo epidemiológico é um dos mais indicados no estudo de populações etnicamente heterogêneas.

HLA-A. Houve uma predominância dos haplotipos HLA-A2B8, -A2B15 e -A9B15 no grupo de diabéticos, sendo que esses haplotipos também foram predominantes nos irmãos dos diabéticos. O oposto aconteceu com os haplotipos HLA-A2B5 e -A2B12.

Em 1987, em Ribeirão Preto, São Paulo, Eizirik e cols. (28) analisaram, pelo mesmo método de tipagem do HLA do estudo anterior, os antígenos HLA-A, -B, -C e -DR de 65 pacientes com DM1 e de 100 indivíduos saudáveis todos da mesma área geográfica e mesmo grupo étnico. Frequências significativamente mais altas dos antígenos HLA-A2, -B15, -DR3 e -DR4 foram encontradas nos pacientes diabéticos em relação aos controles. Em contraste, antígenos HLA-DR2 e -DR7 foram menos frequentes em diabéticos, mas a diferença não foi significativa. Neste estudo, os antígenos HLA-DR3 e -DR4 mostraram associação positiva com DM1 (RR= 3,4).

Em 1998, Marques e cols. (29), em Campinas, São Paulo, avaliaram a distribuição da frequência dos alelos HLA-DRB1 em 41 pacientes com diabetes e 99 controles utilizando a técnica de PCR-SSOP (*polymerase chain reaction, sequence-specific oligonucleotides probes*). A ancestralidade dos pacientes foi descrita como mista. Os alelos *HLA-DRB1\*03* e *-DRB1\*04* foram encontrados em frequências relativamente maiores nos pacientes diabéticos quando comparados com os controles, sendo, portanto, associados à susceptibilidade à doença. Os heterozigotos *HLA-DRB1\*03/\*04* apresentaram forte risco para DM1 (RR= 5,44). A frequência do alelo *HLA-DRB1\*11* foi mais baixa nos pacientes diabéticos, mas essa diferença não foi significativa. Também não houve diferença estatisticamente significativa na frequência do alelo *-DRB1\*15* entre pacientes e controles.

Em 2000, Nahas e cols. (30) realizaram um estudo em Ribeirão Preto, São Paulo, com o objetivo de avaliar a distribuição da frequência dos antígenos HLA de classe II, especificamente os pertencentes aos *loci* HLA-DQ e -DR, em uma amostra composta de 58 pacientes com DM1 procedentes do nordeste do estado de São Paulo e do sudeste de Minas Gerais. Segundo a classificação étnico-racial utilizada por estes pesquisadores, todos os indivíduos eram miscigenados, originados de europeus caucasianos, índios brasileiros e negros africanos. O grupo controle foi formado por 102 não-diabéticos (22 mulheres e 80 homens) provenientes da mesma região geográfica do grupo de pacientes diabéticos e com miscigenação racial semelhante. Os antígenos avaliados foram HLA-DR1, -DR2, -DR3, -DR4, -DR5, -DR6, -DR7, -DR8, -DR9, -DR11, -DR13, -DR14, -DR52, -DR53,

-DQ1, -DQ2, -DQ3 e -DQ7, tendo sido identificados sorologicamente pelo método de microlinfocitotoxicidade. Nos diabéticos foi observada maior frequência dos antígenos HLA-DR3 (60,3%, comparado com 18,6% nos controles,  $p < 0,05$ ), HLA-DR4 (53,4%, comparado com 27,4% nos controles,  $p < 0,05$ ) e do genótipo heterozigoto HLA-DR3/DR4 (27,6%, comparado com 1,97% nos controles,  $p < 0,05$ ). Também foi descrita maior frequência dos haplotipos HLA-DR3/DQw3 (39,6%, comparado com 0,98% nos controles,  $p < 0,05$ ) e HLA-DR3/DR4/DQ3 (24,1%, comparado com 0,98% nos controles,  $p < 0,05$ ). Em 39,6% dos pacientes com DM1 e 18,6% dos controles, foi detectado o haplotipo HLA-DR4-DQ3 ( $p < 0,05$ ). Em contraste, os antígenos HLA-DR2 e -DR7 foram detectados com menor frequência em pacientes com DM1 quando comparados com o grupo controle (13,8% vs. 31,4%, e 5,2% vs. 20,6%, respectivamente).

Em 2001, Volpini e cols. (7), em Campinas, São Paulo, estudaram a associação dos alelos e haplotipos HLA de classe II com DM1 em 56 famílias, com 70 diabéticos e 111 parentes saudáveis de primeiro grau, utilizando o método de controle com as próprias famílias afetadas (*affected family-based controls — AFBAC*). Oitenta e nove por cento tinham origem étnica mista (caucasianos europeus, negros africanos e ameríndios), sendo a ancestralidade caucasiana preponderante (relatada em 93% das famílias). Origens indígena ou negra foram relatadas, respectivamente, por 66,7% e 33,3% das famílias. Quarenta por cento das famílias não foram capazes de definir sua origem étnica, sendo, então, referidos como “brasileiros”. Em nenhum caso a origem étnica foi deduzida baseada apenas no fenótipo. Neste trabalho, os alelos dos *loci* HLA-DRB1, -DQA1 e -DQB1 foram determinados pelo método PCR-SSOP. Os resultados revelaram maior frequência dos haplotipos *HLA-DRB1\*03-DQA1\*0501-DQB1\*02* e *DRB1\*0401-DQA1\*03-DQB1\*0302* no grupo de diabéticos. O maior risco para DM1 foi associado com o genótipo heterozigoto *HLA-DRB1\*03/\*04*. Os genótipos *HLA-DRB1\*03/X* e *-DRB1\*04/Y* (sendo X e Y representações de qualquer outro alelo HLA-DRB1 em associação com os alelos citados) também conferiram uma significativa, porém menor, susceptibilidade à doença. Quando considerados alelos individuais em cada *locus*, foram observadas associações positivas do DM1 com os alelos *HLA-DRB1\*03* (RR= 5,5), *-DRB1\*04* (RR= 3,4), *-DQB1\*0302* (RR= 4,9), *-DQB1\*02* (RR= 2,6) e *-DQA1\*0303* (RR=3,3). Além disso, alguns alelos conferiram proteção contra a doença: *HLA-DRB1\*15*

(RR= 0,1), *-DRB1\*11* (RR= 0,3), *-DRB1\*01* (RR= 0,3), *-DRB1\*13* (RR= 0,4), *-DQB1\*0301* (RR= 0,2), *-DQB1\*06* (RR= 0,3) e *-DQB1\*05* (RR= 0,5).

O último artigo completo sobre DM1 e HLA em brasileiros foi realizado em Ribeirão Preto, São Paulo, em 2002 por Fernandes e cols. (31). Os alelos HLA de classe II (*HLA-DRB1*, *-DQB1* e *-DQA1*) foram analisados em 64 diabéticos e 181 controles sadios, selecionados de forma randomizada entre doadores de sangue da região. Os alelos *HLA-DRB1\*0301* (RR= 3,1), *-DRB1\*04* (RR= 1,7), *-DQB1\*0302* (RR= 4,92) e *-DQB1\*0201* (RR= 4,45) foram associados ao desenvolvimento de DM1. A proteção contra o DM1 associou-se aos alelos *HLA-DRB1\*15*, *-DRB1\*11*, *-DRB1\*13*, *-DQB1\*0602/0603*, *-DQB1\*0301*, *-DQB1\*05* e *-DQA\*01*. O haplotipo *HLA-DRB1\*03/DQB1\*0201/DQA1\*0501* foi encontrado em 38% dos pacientes e em 11% dos controles, (RR= 2,07). O haplotipo *HLA-DRB1\*04/DQB1\*0302/DQA1\*0301* foi encontrado de forma similar em pacientes e controles.

Os dois trabalhos publicados de forma reduzida em eventos científicos foram realizados por Rodacki e cols. (32,33), no Rio de Janeiro. O primeiro foi um estudo transversal com 62 diabéticos, 42 brancos e 20

não brancos, nos quais foram estudados os alelos *HLA-DRB1* (32). Os alelos *HLA-DRB1\*03* e/ou *-DRB1\*04* foram encontrados em 85,5% dos pacientes. Os antígenos *-DR3* e *-DR4*, isoladamente, foram encontrados na frequência de 58% em cada grupo. Os pacientes não brancos apresentaram maior frequência dos alelos *HLA-DRB1\*01* e *-DRB1\*11* do que os brancos. O segundo trabalho comparou a distribuição e frequência dos alelos *HLA-DRB1* em dois grupos de pacientes com DM1 (33). O primeiro grupo era constituído por 42 pacientes com início da doença antes dos 20 anos; e o segundo por 41 pacientes cuja enfermidade teve início após os 20 anos. A frequência dos alelos *HLA-DRB1\*03* e *-DRB1\*04* foi semelhante nos dois grupos, enquanto o *HLA-DRB1\*13* foi mais frequente naqueles com DM1 de início precoce.

A tabela 2 resume as associações mais importantes entre HLA e diabetes melito tipo 1 em brasileiros.

## DISCUSSÃO

Observamos que, com o aprimoramento das pesquisas nessa área, os estudos foram direcionados para a avali-

**Tabela 2.** Alelos, antígenos, haplotipos e genótipos HLA associados à proteção ou à susceptibilidade ao diabetes melito tipo 1 em populações de brasileiros.

| Trabalhos               | ↑ Proteção |      |                   |    | ↓ Susceptibilidade |            |                                 |                |
|-------------------------|------------|------|-------------------|----|--------------------|------------|---------------------------------|----------------|
|                         | Alelo/Ag   | RR   | Haplotipo         | RR | Alelo/Ag           | RR         | Haplotipo/Genótipo              | RR             |
| Gomes e cols., 1981     | B5         | 0,16 | A2B2              | NE | B8                 | 2,21       | A2B8                            | NE             |
|                         | B7         | 0,22 | A2B12             | NE | B13                | 3,67       | A2B15                           | NE             |
|                         | B12        | 0,25 |                   |    | B15                | 3,61       | A9B13<br>A9B15                  | NE<br>NE       |
| Eizirick e cols., 1987  | DR2        | 0,27 |                   |    | A2                 | 3,42       | DR3/4                           | 20,2           |
|                         | DR7        | 0,12 |                   |    | B15                | 12         |                                 |                |
|                         |            |      |                   |    | DR4                | 3,40       |                                 |                |
|                         |            |      |                   |    | DR3                | 3,40       |                                 |                |
| Marques e cols., 2000   | DR2        | NE   |                   |    | DR3                | NE         | DR3/DQ3                         | NE             |
|                         | DR7        | NE   |                   |    | DR4                | NE         | DR3/DQ4/DQ3<br>DR4/DQ3<br>DR3/4 | NE<br>NE<br>NE |
| Volpini e cols., 2001   | DRB1*15    | 0,10 | DRB1**15-         |    | DRB1*03            | 5,50       | DRB1*0401-DQA1*03-              | 7,40           |
|                         | DRB1*11    | 0,30 | DQA1*0102-        |    | DRB1*04            | 3,40       | DQB1*0302                       | 26,2           |
|                         | DRB1*01    | 0,30 | DQB1*0602         |    | DRB1*0302          | 4,90       | DRB1*03/04                      | 43,3           |
|                         | DRB1*13    | 0,40 | DRB1*13-DQB1*0301 |    | DQB1*02            | 2,60       | DRB1*03/X                       | 3,70           |
|                         | DQB1*0301  | 0,20 | DRB1*11-DQB1*0301 |    | DQA1*0303          | 3,30       | DRB1*04/Y                       |                |
|                         | DQB1*06    | 0,30 | DRB1*01-DQB1*0501 |    |                    |            |                                 |                |
|                         | DQB1*05    | 0,50 |                   |    | DRB1*0301          | 3,10       | DRB1*03/DQB1*0201/DQA1*0501     | 2,07           |
| DRB1*15                 | 0,39       |      |                   |    |                    | DRB1*03/04 | 8,5                             |                |
| Fernandes e cols., 2002 | DQB1*0602  | 0,20 |                   |    | DRB1*04            | 1,70       |                                 |                |
|                         | DRB1*11    | 0,21 |                   |    | DQB1*0302          | 4,92       |                                 |                |
|                         | DRB1*13    | 0,31 |                   |    | DQB1*0201          | 4,45       |                                 |                |
|                         | DQA1*01    | 0,58 |                   |    |                    |            |                                 |                |
|                         | DQB1*05    | 0,31 |                   |    |                    |            |                                 |                |
| DQB1*0301               | 0,24       |      |                   |    |                    |            |                                 |                |

(RR): risco-relativo; (NE): dado não especificado; (Ag): antígeno; (↑): aumento.

ação do HLA de classe II, cuja associação com o DM1 mostrou-se mais significativa que os demais tipos de HLA. Por esse motivo, o trabalho de Gomes e cols. (27) foi excluído da discussão, desde que esse artigo analisou apenas antígenos HLA-A, -B e -C (classe I), enquanto os demais enfatizaram a região de classe II (HLA-D), a qual parece ser mais associada ao DM1. Os trabalhos publicados de forma resumida por Rodacki e cols. (32,33) também não foram incluídos na discussão por não permitirem uma avaliação detalhada de sua metodologia.

O método pelo qual o HLA foi analisado também sofreu mudanças: inicialmente, microlinfocitotoxicidade; posteriormente, PCR. Com isso, tornou-se possível determinar os vários alelos HLA presentes nos indivíduos estudados e não apenas antígenos (os quais representam vários alelos) expressos pelos genes HLA. Esta mudança, além de refletir a variação da nomenclatura utilizada para descrição dos dados, contribuiu para maior entendimento dos alelos HLA associados ao DM1.

Em relação ao desenho de estudo, o trabalho de Volpini e cols. (7) foi o único a utilizar o método de controle com as próprias famílias afetadas (*affected family-based controls* — AFBAC). Dessa forma, alelos ou haplotipos parentais não transmitidos à criança afetada formaram a população controle, contornando vieses de migração, estratificação ou miscigenação populacional. Pelo fato de os haplotipos HLA serem bastante diversos entre os diferentes grupos étnicos, e sendo a população brasileira bastante miscigenada, esse parece ser o método mais adequado para o estudo genético dessas populações (7).

O alelo *HLA-DRB1\*11* foi associado à proteção para o DM1 em três dos estudos apresentados: Marques e cols. (29), Volpini e cols. (7) e Fernandes e cols. (31), com riscos-relativos de 0,22, 0,3 e 0,21, respectivamente, embora no primeiro estudo esse risco tenha sido considerado não estatisticamente significativo. O alelo *HLA-DRB1\*15* foi relatado como protetor nos trabalhos de Volpini e cols. (7) e Fernandes e cols. (31), com riscos-relativos de 0,1 e 0,39 respectivamente. No estudo de Eizirik e cols. (28), quanto aos antígenos protetores, a tendência não significativa à baixa prevalência do antígeno HLA-DR2 (equivalente sorológico dos alelos *HLA-DRB1\*1501* e *-DRB1\*1502*) nos pacientes com DM1 foi um dado que contrastou com a maioria das populações de caucasianos já estudadas, nas quais esta diferença foi estatisticamente significativa (6). Proteção contra o DM1 também foi conferida pelo alelo *HLA-DRB1\*13* com RR= 0,4 na pesquisa realizada por Volpini e cols. (7),

e 0,31 na realizada por Fernandes e cols. (31). Os dados obtidos ainda sugerem que o alelo *HLA-DQB1\*06* seja protetor na população estudada por Volpini e cols. (7), com RR= 0,3, sendo que este alelo apareceu descrito de forma mais específica (*HLA-DQB1\*0602*) e também com papel protetor (RR= 0,20) no estudo de Fernandes e cols. (31).

A proteção ao DM1 associada ao HLA revelou algumas particularidades na população do Sudeste brasileiro, quando comparada com estudos realizados em outras partes do mundo: houve ausência de efeito protetor significativo do haplotipo *HLA-DRB1\*1501-DQA1\*0102-DQB1\*0602* e uma aparente proteção conferida pelos haplotipos *HLA-DRB1\*13-DQB1\*0301*, *-DRB1\*11-DQB1\*0301* e *-DRB1\*01-DQB1\*0501* (7).

Em relação aos alelos associados à susceptibilidade ao DM1, o *HLA-DRB1\*03* mostrou significância nos trabalhos de Eizirik e cols. (28) (RR= 3,4), Marques e cols. (29) (RR= 4,27), Nahas e cols. (30) (60,3% nos diabéticos vs. 18,6% nos controles) e Volpini e cols. (7) (RR= 5,5). Nos trabalhos de Eizirik e cols. (28) e Nahas e cols. (30) não se fez referência ao alelo *HLA-DRB1\*03*, mas ao antígeno HLA-DR3, por ter sido utilizado o método de microlinfocitotoxicidade em vez de PCR. No entanto, o alelo *HLA-DRB1\*03* codifica a cadeia  $\beta$  de uma molécula do HLA-DR sorologicamente fenotipada como HLA-DR3. Nos dados obtidos por Fernandes e cols. (31), os alelos *HLA-DRB1\*0301* e *-DRB1\*0302* apresentaram RR para susceptibilidade ao DM1 respectivamente iguais a 3,1 e 4,92. Susceptibilidade também foi conferida pelo alelo *HLA-DRB1\*04* nos trabalhos de Eizirik e cols. (28) (RR= 3,4), Marques e cols. (29) (RR= 4,37), Nahas e cols. (30) (53,4% nos diabéticos vs. 27,4% nos controles), Volpini e cols. (7) (RR= 3,4) e Fernandes e cols. (31) (RR= 1,7). Nos artigos de Eizirik e cols. (28) e Nahas e cols. (30) foi feita referência ao antígeno HLA-DR4. Já o alelo *HLA-DQB1\*02* apareceu como fator que predispõe ao DM1 com RR= 2,6 na pesquisa de Volpini e cols. (7) e o *-DQB1\*0201*, em Fernandes e cols. (31), apresentando RR= 4,45 para essa mesma predisposição. Os alelos de susceptibilidade detectados na população brasileira proveniente da região sudeste foram concordantes com os alelos encontrados nas diversas outras populações estudadas em todo o mundo.

Quanto aos haplotipos e genótipos, só foi possível estabelecer associação entre aqueles associados à susceptibilidade ao DM1. Como tem sido largamente reportado, o genótipo heterozigoto *HLA-DRB1\**

03/\*04 foi associado à susceptibilidade no trabalho de Eizirik e cols. (28) (RR= 20,2) e também no de Nahas e cols. (30), que se referiram aos antígenos HLA-DR3/4. Nos trabalhos de Marques e cols. (29), Volpini e cols. (7) e Fernandes e cols. (31), o RR para esse genótipo foi respectivamente de 5,44, 43,3 e 8,5. Volpini e cols. (7) ainda destacaram que o risco-relativo equivaliu a 3,7 para o genótipo *HLA-DRB1\*03/X* e 11,3 para o genótipo *HLA-DRB1\*04/Y*. O haplotipo *HLA-DRB1\*03/DQA1\*0501/DQB1\*02* apresentou risco relativo para susceptibilidade ao DM1 igual a 7,4 na pesquisa de Volpini e cols. (7) e de 2,07 por Fernandes e cols. (31), sendo que neste último o alelo da região -DQ foi especificado como *-DQB1\*0201*. Em contraste com os dados da literatura em que o haplotipo *HLA-DRB1\*04/DQB1\*0302/DQA1\*0301* está associado a um maior risco de desenvolver DM1, no estudo de Fernandes e cols. ele foi encontrado de forma similar em pacientes e controles, concluindo-se que esse haplotipo não se associa nem com a susceptibilidade, nem com a proteção à doença em brasileiros.

Um aspecto não examinado em qualquer dos trabalhos revisados foi a heterogeneidade do risco genético, quando se associa o HLA com a presença de auto-anticorpos contra as células beta. Tem sido demonstrado que a idade ao diagnóstico é inversamente proporcional à presença e/ou titulação desses anticorpos, e que a evolução do DM1 é muito mais rápida nos indivíduos com positividade para os auto-anticorpos e presença de alelos HLA de susceptibilidade (21,34).

Mais recentemente, Fernandes e cols. começaram a investigar a expressão de moléculas HLA de classe I (35) e classe II (36) em células linfomononucleares de brasileiros com DM1. Essa linha de pesquisa contribui para o melhor entendimento do perfil inflamatório da doença e sua relação com a presença de alelos de susceptibilidade para o DM1.

Vale ressaltar que, por nossa busca ter sido realizada nos bancos de dados MEDLINE e LILACS, é possível que artigos não inclusos nesses bancos tenham sido omitidos.

## CONCLUSÃO

Os poucos trabalhos sobre o tema HLA e DM1 em brasileiros foram todos realizados na região Sudeste. Nesses estudos, foi observado que os antígenos, alelos e haplotipos HLA associados à susceptibilidade e à proteção para o DM1 apresentaram distribuições parecidas com as encontradas em outras populações de caucasianos descritas na literatura (37). Como existem

inúmeras combinações de grupos étnico-raciais no Brasil, a interpretação de estudos nessa área e sua aplicabilidade regional devem ser levadas em consideração na interpretação e universalização dos dados (38). As definições dos grupos étnico-raciais e dos subtipos resultantes de sua miscigenação devem ser adequadamente descritas e não deduzidas baseadas apenas no fenótipo, já que fenótipos semelhantes podem possuir diferentes ancestralidades, e ancestralidades próximas podem apresentar diferentes fenótipos (38). Do mesmo modo que não se podem extrapolar resultados de estudos imunogenéticos de caucasianos europeus e norte-americanos para a população brasileira, também não se pode fazê-lo para todo o país a partir de estudos realizados em apenas uma região. No trabalho de Volpini e cols. (7), a presença de grande diversidade dos haplotipos *HLA-DRB1-DQA1-DQB1* (65 diferentes haplotipos) foi atribuída à importante miscigenação e diversidade étnica da população.

Como proposição final, sugerimos um estudo nacional onde fossem analisadas características de populações de várias regiões, tentando contornar vieses de migração, estratificação ou miscigenação populacional. A análise da sua diversidade alélica permitiria identificar novas associações ou reforçar aquelas já existente. Por exemplo, será que o padrão de distribuição e frequência do HLA de classe II em brasileiros com DM1 é o mesmo em populações com forte ancestralidade negra (região Nordeste) ou acentuada ancestralidade indígena (região Norte)? Na pesquisa proposta, a tipificação do HLA seria feita numa única instituição analisando o maior número de alelos possível; a definição de raça/etnia seria feita por auto-declaração e por marcadores genéticos de ancestralidade; os auto-anticorpos pancreáticos (*e.g.* anti-ilhota [ICA], anti-descarboxilase do ácido glutâmico [GAD], anti-tirosina-fosfatase [IA2]) seriam titulados seguindo um padrão uniforme; e análises genéticas de outros *loci* associados a maior risco de desenvolver DM1 (*e.g.* IDDM2) seriam também realizadas. A associação desses marcadores com dados clínicos, demográficos e epidemiológicos obtidos de maneira padronizada (*e.g.* criação de um Registro Nacional de DM1) poderiam fornecer um verdadeiro retrato dos aspectos imunogenéticos do DM1 no Brasil. Ainda mais ambicioso seria complementar esse projeto estudando familiares de primeiro grau afetados ou não pelo DM1, especialmente as famílias com mais de um filho com diabetes.

Pesquisas que visem a responder a essas perguntas serão fundamentais para o melhor entendimento da associação dos antígenos de histocompatibilidade com

o DM1 em brasileiros, e assim contribuirão na identificação de indivíduos que possam vir a se beneficiar de futuras intervenções profilático-terapêuticas.

### AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi parcialmente financiado pela Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB).

### REFERÊNCIAS

1. Todd JA. Genetic analysis of type 1 diabetes using whole genomics approaches. **Proc Natl Acad Sci USA** 1995;92:8560-5.
2. Davies JL, Kawachi Y, Bennet SY, et al. A genome-wide search for human type 1 diabetes susceptibility genes. **Nature** 1994;371:130-6.
3. Petrone A, Bugawan TL, Mesturino CA, Nistico L, Galgani A, Giorgi G, et al. The distribution of HLA class II susceptible/protective haplotypes could partially explain the low incidence of type 1 diabetes in continental Italy (Lazio region). **Tissue Antigens** 2001;58:385-94.
4. Sheehy MJ, Scharf SJ, Rowe JR, Neme de Gimenez MH, Meske LM, Erlich HA, et al. A diabetes-susceptible HLA haplotype is best defined by a combination of HLA-DR and -DQ alleles. **J Clin Invest** 1989;83:830-5.
5. Caillat-Zucman S, Djilali-Saiah I, Timsit J, et al. Insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM). 12<sup>th</sup> International Histocompatibility Workshop Study. In: Charron D (ed). **Genetic diversity of HLA. Functional and medical implications**, vol. 1. Paris: EDK; 1997. pp. 389-98.
6. Thorsby E, Ronningen KS. Particular HLA DQ molecules play a dominant role in determining susceptibility or resistance to type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus. **Diabetologia** 1993;36:371-6.
7. Volpini WMG, Testa GV, Marques SBD, Alves LI, Silva MER, Dib SA, et al. Family-based association of HLA class II alleles and haplotypes with type I diabetes in Brazilians reveals some characteristics of a highly diversified population. **Hum Immunol** 2001;62:1226-33.
8. Fernandes APM, Maciel L, Foss M, Donadi EA. Como entender a associação entre o sistema HLA e as doenças auto-imunes endócrinas. **Arq Bras Endocrinol Metab** 2003;47(5):601-11.
9. Alves C, Meyer I, Vieira N, Toralles MB. Associação dos antígenos de histocompatibilidade (HLA) com doenças endócrinas auto-imunes. **Rev Baiana Saúde Pública** 2005;29(1):105-10.
10. Terasaki PI, McClelland JD. Microdroplet assay of human serum cytotoxins. **Nature** 1964;204:998-1000.
11. Olerup O, Zetterquist H. HLA-DR typing by PCR amplification with sequence-specific primers (PCR-SSP) in two hours: an alternative to serological typing in clinical practice including donor-recipient matching in cadaveric transplantation. **Tissue Antigens** 1992;39:225-35.
12. Mickelson E, Smith A, McKinney S, Anderson G, Hansen JA. A comparative study of HLA-DRB1 typing by standard serology and hybridization of non-radioactive sequence-specific oligonucleotides probes to PCR-amplified DNA. **Tissue Antigens** 1993;41:86-93.
13. Begovich AB, McClure GR, Suraj VC, Helmuth RC, Fildes N, Bugawan TL, et al. Polymorphism, recombination, and linkage disequilibrium within the HLA class II region. **J Immunol** 1992;48(1):249-58.
14. Just JJ, King MC, Thomson G, Kliz W. African-American HLA II allele and haplotype diversity. **Tissue Antigens** 1997;49:547.
15. Noble JA, Valdes AM, Cook M, Thomson G, Erlich HA. The role of class II genes in insulin-dependent diabetes mellitus: molecular analyses of 180 Caucasian multiplex families. **Am J Hum Genet** 1996;59(5):1134-48.
16. Ronningen KS, Keiding N, Green A; The EURODIAB ACE Study Group. Correlations between the incidences of childhood-onset type 1 diabetes in Europe and HLA genotypes. **Diabetologia** 2001;44(suppl. 3):B51-9.
17. Pirie FJ, Hammond MG, Motala AA, Omar MAK. HLA class II antigens in South African blacks with type 1 diabetes. **Tissue Antigens** 2001;57:348-52.
18. Heward JM, Mijovic CH, Morrison E, Barnett AH. HLA-DQ and DRB1 polymorphism and susceptibility to type 1 diabetes in Jamaica. **Eur J Immunogenet** 2002;29:47-52.
19. Mbanya JC, Sobngwi E, Mbanya DNS. HLA-DRB1, DQA1, DQB1 and DBP1 susceptibility alleles in Cameroonian type 1 diabetes patients and controls. **Eur J Immunogenet** 2001;28:459-62.
20. Kida K, Mimurza G, Kobayashi T, Nakamura K, Sonoda S, Inoue H, et al. Immunogenetic heterogeneity in type 1 insulin-dependent diabetes mellitus among Japanese HLA antigens and organ-specific autoantibodies. **Diabetologia** 1989;32:34-9.
21. Murao S, Makino H, Kaino Y, Konoue E, Ohashi J, Kida K, et al. Differences in the contribution of HLA-DR and -DQ haplotypes to susceptibility to adult- and childhood-onset type 1 diabetes in Japanese patients. **Diabetes** 2004;53(10):2684-90.
22. Liu CL, Yu YR, Liu H, Zhang XX, Zhao GZ. The associations of HLA-DQB1 gene with onset age and autoantibodies in type 1 diabetes. **Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi** 2004;21(4):368-71.
23. Moraes ME, Fernandez-Vina M, Salatiel S, Tsai S, Moraes JR, Stastny P. HLA class II DNA typing in two Brazilian populations. **Tissue Antigens** 1993;41:238-42.
24. Alves-Silva J, Santos MS, Guimarães PEM, Ferreira ACS, Bandelt H, Pena SDJ, et al. The ancestry of Brazilian mtDNA lineages. **Am J Hum Genet** 2000;67:444-61.
25. Carvalho-Silva DR, Santos FR, Pena SDJ. The phylogeography of Brazilian Y-chromosomes lineages. **Am Hum Med Genet** 2001;68:281-6.
26. Alves C, Fortuna MMC, Toralles MB. A aplicação e o conceito de raça em saúde pública: definições, controvérsias e sugestões para uniformizar sua utilização nas pesquisas biomédicas e na prática clínica. **Gazeta Médica da Bahia** 2005;75(1):92-115.
27. Gomes MB, Ruzany F, Quadra AA, Sarno EN, Arduíno F. Histocompatibility antigens and insulin-dependent dia-

- betes: a study of 20 Brazilian families. **Braz J Med Biol Res** **1981**;14:379-81.
28. Eizirik DL, Monteiro CMC, Voltarelli JC, Foss MC. Frequency of HLA antigens in a Brazilian type 1 diabetic population. **Braz J Med Biol Res** **1987**;20:533-7.
29. Marques SBD, Volpini W, Caillat-Zucman S, Lieber SR, Pavin EJ, Persoli LB. Distribution of HLA-DRB1 alleles in a mixed population with insulin-dependent diabetes mellitus from the Southeast of Brazil. **Braz J Med Biol Res** **1998**;31:365-8.
30. Nahas R, Deghaide NHS, Donadi EA, Foss MC. Frequency of HLA class II -DR and -DQ antigens in Brazilian patients with type 1 diabetes. **Medicina (Ribeirão Preto)** **2000**;33:37-41.
31. Fernandes APM, Louzada Jr. P, Foss MC, Donadi EA. HLA-DRB1, -DQB1, and -DQA1 allele profile in Brazilian patients with type 1 diabetes mellitus. **Ann NY Acad Sci** **2002**;958:305-8.
32. Rodacki M, Zajdenverg I, Tortora RP, Reis FA, Bencke-Gonçalves MR, Albernaz MS, et al. Diferenças na tipagem HLA-DRB1 em indivíduos brancos e não brancos com DM tipo 1. In: Resumos do 14º Congresso Brasileiro de Diabetes; 26 a 30 de novembro de 2003, Goiânia, Goiás, p. S528. **Arq Bras Endocrinol Metab** **2003**;47(1):S528.
33. Rodacki M, Zajdenverg I, Reis FA, Tortora RP, Bencke-Gonçalves MR, Albernaz MS, et al. Estudo comparativo do DM tipo 1 clássico diagnosticado em crianças e adultos: forma de apresentação, anti-GAD e HLA-DRB1. In: Resumos do 14º Congresso Brasileiro de Diabetes; 26 a 30 de novembro de 2003, Goiânia, Goiás, p. S543. **Arq Bras Endocrinol Metab** **2003**;47(1):S543.
34. Sabbah E, Savola K, Ebeling T, Kulmala P, Vähäsalo P, Ilonen J, et al. Genetic, autoimmune, and clinical characteristics of childhood and adult-onset type 1 diabetes. **Diabetes Care** **2000**;23(9):1326-32.
35. Fernandes APM, Foss MC, Ramos SBV, Donadi EA. Overexpression of HLA class II molecules on T cells among type 1 diabetes Brazilian patients. **Mol Immunol** **2004**;41:1047-50.
36. Fernandes APM, Foss MC, Donadi EA. HLA-DQB1 alleles may influence the surface expression of DQ molecules in lymphomononuclear cells of type 1 diabetes mellitus patients. **Scand J Immunol** **2004**;59:305-9.
37. Alves C, Souza T, Veiga S, Alves CO, Toralles MB, Lemaire D. A importância do sistema de histocompatibilidade humano (HLA) em Pediatria. **Pediatria (São Paulo)** **2005**;27(4):24-86.
38. Alves C, Fortuna MMC, Toralles MB. A aplicação e o conceito de raça em saúde pública: definições, controvérsias e sugestões para uniformizar sua utilização nas pesquisas biomédicas e na prática clínica. **Gazeta Médica da Bahia** **2005**;75(1):92-115.

**Endereço para correspondência:**

Crésio Alves  
Rua Plínio Moscoso 222, apto. 601  
40157-190 Salvador, BA  
E-mail: cresio.alves@uol.com.br