

RELAÇÃO DO DM TIPO 1 COM GENÓTIPOS DO SISTEMA HLA DO LÓCUS DR DE RECEPTORES DE TRANSPLANTE RENAL E PANCREÁTICO DO ESTADO DE SANTA CATARINA

Jéssica Hanser Nunes Kahl¹

Marcos Oliveira Machado²

Resumo:

Diabetes é um grupo de doenças metabólicas que ocorrem no organismo quando há a falta ou a incapacidade da insulina desempenhar sua função, ocasionando alterações no nível glicêmico. A Diabetes Mellitus tipo 1 é caracterizada pela destruição autoimune das células beta pancreáticas. As principais complicações dessa doença estão ligadas principalmente a lesões de vasos que acabam comprometendo as estruturas de alguns órgãos, nesse caso, o transplante de órgãos pode fazer-se necessário.

Existem alguns genótipos do sistema HLA de classe II que foram associados a suscetibilidade a essa doença. Os mais comumente citados são DRB1*0301 (DR3) e DRB1*0401 (DR4). Dessa forma, este estudo visou analisar o genótipo do sistema HLA, Locus DR, de diabéticos tipo I candidatos a recepção de transplante renal e pancreático do estado de Santa Catarina.

Palavras-chave:

Diabetes mellitus, tipo 1, HLA, transplante, renal, pancreático.

Introdução:

A Diabetes Mellitus (DM) é uma das doenças crônicas mais comuns em quase todos os países do mundo e continua aumentando seus números, tendo forte relevância no ângulo de vista social e econômico, devido a altas taxas de morbidade, mortalidade e incapacitação para o trabalho (SHAWISICKETE; ZIMET, 2009; SEMZEZEM; OLIVEIRA, 2009).

¹Jéssica Hanser Nunes Kahl, Farmacêutica Bioquímica pela Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC, pós-graduanda no curso de Hematologia e Hemoterapia Laboratorial da Universidade do Sul de Santa Catarina- UNISUL.

² Marcos Oliveira Machado, professor da Universidade do Sul de Santa Catarina - UNISUL, graduado em Farmácia e análises clínicas pela Universidade Federal do Estado de Santa Catarina - UFSC, mestre e doutor em farmácia (análises clínicas) pela Universidade de São Paulo.

A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que globalmente a glicemia elevada seja o terceiro maior fator de risco para mortalidade prematura seguida posteriormente pela hipertensão e o uso do tabaco. Em 2015, o Atlas Global da Diabetes, levantou a prevalência de 8,8%, o que em termos numéricos aponta que mundialmente havia aproximadamente 415 milhões de indivíduos com diabetes. E ainda mostrou que houve aproximadamente 5 milhões de mortes causadas pela doença. O estudo também indicou que no Brasil, em 2015, haviam em torno de 14,3 milhões de pessoas com essa doença. Outro estudo realizado por Freitas e Garcia em 2008 estimou a prevalência desta patologia em algumas regiões do território brasileiro, e mostrou que o coeficiente bruto de prevalência de diabetes foi de 5,8 na região sudeste, sendo o coeficiente mais elevado, seguido da região sul, 5,3% e centro oeste, 4,6%. A região norte apresentou o menor coeficiente 3,7%. Ainda no período de 1996 a 2013 foram relatos no Estado de Santa Catarina 20,7 óbitos/ 100.000 habitantes devido a DM (LOPES,2013).

Segundo a American Diabetes Association, a Diabetes é um grupo de doenças metabólicas que ocorrem no organismo quando há a falta ou a incapacidade da insulina desempenhar sua função, ocasionando alterações no nível glicêmico, caracterizando o quadro pela hiperglicemia. Esta deficiência na produção da insulina está relacionada a destruição autoimune das células pancreáticas. Os principais sintomas são perda inexplicável de peso, polifagia, poliúria, polidipsia e infecções. Quando na fase crônica pode levar a disfunções e falência de vários órgãos. Existem cerca de 57 classificações etiológicas diferentes para a patologia, contudo as mais frequentes são o DM do tipo 1 onde ocorre a destruição das células beta pancreáticas e o DM do tipo 2 onde existem distúrbios na secreção ou na ação da insulina. Essa patologia ocorre comumente no período da infância e da adolescência, mas também pode abranger pessoas de todas as idades até mesmo na oitava ou nona década da vida (GHELHO, et al., 2013; AMERICAN DIABETES ASSOCIATION,2010).

Os mecanismos relacionados as complicações do DM ainda não estão totalmente elucidados, contudo podem estar envolvidos aos efeitos tóxicos da alta concentração de glicose na circulação, a pressão arterial elevada e também a concentração lipídica alterada. (PEGAR ARTIGO CAMILA PEPPA). As principais complicações dessa doença estão ligadas principalmente a lesões de vasos que acabam comprometendo as estruturas de alguns órgãos. Podemos citar a retinopatia (alterações vasculares com lesões na retina), alterações cardiovasculares, respiratórias, doença cerebrovascular, macroangiopatia (compromete as artérias dos membros inferiores) e nefropatia (provoca alterações nos vasos renais culminando em proteinúria podendo levar a Insuficiência Renal Crônica. O tratamento tradicional para DM1

é realizado através da reposição exógena de insulina. Entretanto, mesmo que seguindo o tratamento corretamente, a longo prazo esses pacientes podem acabar apresentando essas complicações (MENDES, 2015).

O DM tipo 1 é dependente da interação entre a resposta imunológica, fatores ambientais e predisposição genética. A base imunopatogênica dessa doença envolve mecanismos celulares relacionados aos linfócitos T (CD4⁺ e CD8⁺), linfócitos B e células apresentadoras de antígeno (macrófagos e células dendríticas). Também envolve mecanismos humorais, havendo a participação de auto anticorpos específicos para antígenos das células pancreáticas. Ainda, neste panorama, o ambiente acaba sendo um gatilho que pode impulsionar o desenvolvimento da doença e podemos citar também as infecções virais e o tipo de alimentação (SOUSA; ALBERNAZI; SOBRINO, 2016; SALAS; SANTOS; PEREZ, 2013).

Em relação aos aspectos genéticos do DM tipo 1, foram descritos mais de vinte loci que conferem suscetibilidade ao seu desenvolvimento. A região do Sistema do Antígeno Leucocitário Humano (HLA), localiza-se no Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC), no braço curto do cromossomo 6 (p,21.3) e constitui o principal locus de suscetibilidade para esta doença (SEMZEZEM; OLIVEIRA,2009). A região MHC é dividida em três grupos. O primeiro grupo denomina-se HLA de classe I e contém 10 genes com nomenclatura oficializada porém os genes HLA A, B e C são considerados os de maior importância. O segundo grupo, denominado HLA de classe II, apresenta três principais alelos, DR, DQ e DP. O terceiro grupo, chamado HLA de classe III, é responsável por proteínas importantes na resposta imune, como TNF (fator de necrose tumoral) e HSP70 (proteína do choque térmico 70) e também por algumas das proteínas do complemento (NEUMANN et al.,2015). A associação da DM tipo 1 com o sistema imunológico se deve principalmente aos alelos do HLA de classe II. Combinações de alelos HLA podem conferir tanto suscetibilidade quanto proteção a doença. Os principais haplótipos que conferem maior risco para o desenvolvimento da doença são DQA1*80501-DQ B1*0201(DQ2), que pode ser herdado conjuntamente com alelo DRB1*0301(DR3) e o haplótipo DQA1*0301-DQB1*0302(DQ8) que pode ser herdado junto com o alelo DRB1*0401 (DR4) (SALAS; SANTOS; PEREZ, 2013).

A DM é uma das principais causas da Insuficiência Renal Crônica (IRC) no Brasil e no mundo. Aproximadamente 35% dos pacientes desenvolvem nefropatia clínica, assim faz-se necessária a terapia de diálise ou hemodiálise. A qualidade de vida desses pacientes

geralmente acaba sendo comprometida. Então o paciente portador de DM1 e que desenvolveu IRC possui a opção ou de permanecer em diálise/hemodiálise ou se candidatar a recepção de transplante renal e pancreático e melhorar sua qualidade de vida (LOPES; DALBOSCO,2013). Dessa forma, essa patologia pode ser a responsável pela necessidade de boa parte dos transplantes de rim e pâncreas dos receptores do Estado de Santa Catarina. Atualmente, encontram-se poucos estudos realizados no estado que apresentem o perfil genético da população bem como avaliem a sua variabilidade que é grande devido a miscigenação que ocorreu ao longo dos anos. Por isso o objetivo desse estudo foi avaliar o sistema HLA de pacientes com DM1 candidatos a recepção de transplante renal e pancreático do estado de Santa Catarina (SC).

Objetivos:

Geral

Analisar o genótipo do sistema HLA, Locus DR, de diabéticos tipo I candidatos a recepção de transplante renal e pancreático do estado de SC.

Específicos

Caracterização demográfica dos pacientes diabéticos tipo I candidatos a recepção de transplante renal e pancreático do estado de SC.

Caracterização genotípica do sistema HLA, locus DR, dos pacientes diabéticos tipo I candidatos a recepção de transplante renal e pancreático do estado de SC.

Correlacionar a genotipagem do sistema HLA, locus DR, com maior e menor risco de desenvolver DM tipo I.

Metodologia:

Paciente e controles

Os dados obtidos neste estudo são referentes aos pacientes Candidatos a Recepção de Transplante Renal e/ou Pancreático que possuem como doença de base o DM Tipo I e Doadores Voluntários de Medula Óssea utilizados como grupo controle. Estes originam do Laboratório de Imunogenética do HEMOSC, situado na Av. Othon Gama D'êça – Praça Dom Pedro I – Centro – Florianópolis – SC, cadastrados no período entre 2012 a 2017. Os dados utilizados referem-se a genotipagem HLA, idade, sexo e dados clínicos dos indivíduos participantes. A população em questão neste estudo, abrange a região demográfica de todo o

Estado de Santa Catarina. O estudo foi feito de acordo com o estabelecido pelo Comitê de Ética e pesquisa do HEMOSC e da UNISUL.

No período de 2012 a 2017 foram identificados 62 pacientes portadores de DM Tipo I que, ou estavam aguardando na lista de espera do estado de Santa Catarina por um transplante renal e/ou pancreático, ou já haviam sido transplantados. Esta população havia sido submetida a tipificação HLA. O grupo controle foi composto por 198 Doadores Voluntários de Medula Óssea, da mesma região demográfica que os pacientes, não aparentados e tipificados pela equipe do Laboratório de Imunogenética do HEMOSC.

Genotipagem HLA

A tipificação HLA dos pacientes e grupo controle deste estudo foi realizada pela equipe do laboratório de Imunogenética do HEMOSC. Foram genotipados o HLA de Classe I, alelos HLA-A e HLA-B, e classe II alelos HLA-DRB1. Essas tipificações foram realizadas pelas técnicas de biologia molecular PCR-SSP (polymerase chain reaction – sequence specific of primers)(One Lambda, CA, US) descrita por Visentainer (2003) e PCR-SSO (polymerase chain reaction – sequence specific oligonucleotides) (One Lambda, CA, US).

Análise Estatística

Para obter as frequências alélicas e/ou fenotípicas foi realizada contagem direta dos alelos ou antígenos observados. Através dos programas Arlequin e Convert foi possível avaliar se as frequências alélicas encontravam-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg. O teste do Qui Quadrado foi empregado para avaliar a correlação entre as variantes HLA e a ocorrência da DM tipo I, sendo que quando necessário houve correção de Yates ou teste exato de Fisher. Considerou-se os valores da probabilidade (P) significativos quando inferiores 0,05. Valores superiores a 0,05 e inferiores ou iguais a 0,09 foram considerados como tendência para a associação com a doença. Para avaliar o risco de um indivíduo desenvolver a doença possuindo um tipo de HLA foram calculados o Odds Ratio (OR) e o intervalo de confiança (IC) ao nível de 95%. Para todos esses cálculos foi utilizado o programa SISA Simple Interactive Statistical Analysis (<http://www.quantitativeskills.com/sisa/index.htm>).

Resultados:

A média de idade dos pacientes com DM tipo 1 analisados neste estudo foi de 45 anos sendo que 48,4% eram do gênero masculino e 51,60% do feminino. No grupo de pacientes

estudados os alelos com maior frequência foram DRB1*4 (27,4%), DRB1*3 (9,7%) e DRB1*1 (8,9%). Já no controle os alelos DRB1*11 (14,9%), DRB1*13(12,4%) e DRB1*7 (12,6%) foram os de maior frequência. Os resultados da análise de associação das frequências das variantes que se mostraram relevantes, estão relacionados na tabela 1.

Os alelos DRB1*11 ($P=0,05$ OR=0.50104) e DRB1*07 ($P=0,02$ OR=0.41402) apresentaram valores estatisticamente significativos na análise de associação com a DM tipo I, sendo essa uma associação negativa, enquanto que o alelo DRB1*04 ($P= 4,5$; OR=2.73889) está associado positivamente com os pacientes diabéticos.

Discussão:

O estudo da associação entre o sistema HLA e a suscetibilidade a DM1 tem chamado a atenção dos pesquisadores, uma vez que o sistema HLA possa servir como marcador genético para a predisposição a esta doença. Dessa forma, juntamente com outros testes clínicos, pode vir a auxiliar na prevenção e tratamento da patologia. No presente estudo, constatou-se que o alelo DRB1*04 foi o alelo mais frequente dentre os alelos encontrados além de apresentar associação positiva com a DM1, podendo assim ser considerado um marcador de risco.

No Brasil, encontram-se alguns estudos similares e que corroboram com este cenário. Duarte e cols. (2015) realizou estudo na região sul em 387 pacientes com DM1 e 375 controles, os resultados mostraram que o alelo DRB1*4 apresentou maior frequência, 66,7% nos pacientes e 15,3% nos controles e que estava associado positivamente (OR=11,059 95% CI 6,68-18,29 $P< 0,0001$) com o risco de desenvolvimento da doença. Nahas (2000) estudou uma população de 58 pacientes diabéticos em relação a 102 pacientes saudáveis da região sudeste do país. Encontrou valores significativos, com maior frequência para o HLA-DRB1*3 (60,3% para pacientes versus 18,6% para controles, $p < 0,05$), HLA-DRB1*4 (53,4% para pacientes versus 27,4 para controles $P< 0,05$). Silva (2013) em Natal no Rio Grande do Norte avaliou uma população de 92 pacientes Diabéticos tipo I e 100 pacientes controle e encontrou resultados parecidos. Os alelos significativamente mais frequente no estudo foram o HLA DRB1*03:01 ($P< 0,0001$; OR =8,72), DRB1*04:05 ($P=<0,0001$; OR= 8,43), DRB1*04:01 ($P=0,003$; OR=4,71), DRB1*04:02 ($P=0,03$; OR=2,65). Alves et al. (2006) fez um levantamento de todos os estudos publicados de 2002 a 2006, sobre a associação de haplótipos HLA com DM1 em brasileiros, encontrou somente 8 estudos e todos realizados na região sudeste. Estes também relataram como alelos de suscetibilidade o DRB1*03:01, DRB1*04.

No cenário global, em estudo realizado com uma população Japonesa, na qual foi subdividida em 3 grupos, os pacientes não insulino-dependentes (82), os insulino-dependentes (63) e os controles (304), o alelo DRB1*04:05 foi o mais frequente nos dois grupos casos (19,2% não insulino-dependentes e 30,6% insulino-dependentes) em comparação com os controles 12,2%. Em ambos os grupos este alelo apresentou associação positiva com a DM1 (OR=3,19 $P<0,0001$ insulino-dependentes/ OR=1,86 $P<0,05$ não insulino-dependentes). (Yasui e cols. 2016). Fekih- Mrissa e cols. (2013) realizou estudo em uma população Tunisiana de 119 pacientes e 292 controles e constatou que o alelo que demonstrou maior risco de suscetibilidade foi também o alelo HLA DRB1*04 ($P=0,001$) e o alelo DRB1*03 ($P<0,0001$).

Mas alguns estudos apresentaram resultados diferentes dos anteriormente mencionados. Em estudo realizado na Índia com população composta por 59 pacientes com DM tipo 2, 34 pacientes com DM tipo 1 e 28 pacientes controle, os resultados para o grupo dos pacientes com DM1 apresentaram o alelo DRB1*0301 (OR=2,35 $P=0,000$) como o alelo com associação positiva com a Doença. Houve um aumento significativo na frequência para este alelo (64,71%). Houve também, um aumento na frequência para o alelo DRB1*0401 (8,82%), contudo a diferença não foi estatisticamente significativa. (Singh et al., 2016). Rani e cols. (1999) também na Índia, já havia reportado não haver encontrado associação com DRB1*0401 e a DM1 em estudo anterior.

Observou-se também através dos resultados obtidos neste estudo que os alelos DRB1*11 E DRB1*07 apresentaram associação negativa com a Diabetes Mellitus tipo 1, ou seja são fatores de proteção contra a doença. Foram considerados alelos de proteção pela literatura: DRB1*15 e DRB1*11 (OLIVEIRA, 2009; SOUSA et al., 2016; GHELHO, 2013; SILVA, 2008).

Silva (2013) constatou que os alelos DRB1*11:01 ($p=0,0005$; OR=0,07) e DRB1*15:03 ($P=0,01$ OR=0,1) sugeriam um possível efeito protetor, em seu estudo realizado no Rio grande do Norte. Zhao et al. (2016) em estudo realizado em 42 clínicas pediátricas suíças, com pacientes diabéticos com o intuito de associar os anticorpos anti- insulina (IAA), GAD65 (GADA), IA-2 (IA-2A) com alelos HLA, concluiu que os alelos que foram significativamente negativos foram (h-score) HLADRB*1 15:01:01> *07:01:01> *13:01:01> *11:01:01> *11:04:01> *14:54:01. Ramos (2015) em outro estudo caso-controle realizado em hospitais na cidade de Luanda com pacientes diabéticos tipo I no período de 2012 a 2013

avaliou 52 pacientes e 20 controles. Foram associados a proteção os alelos HLA-DRB1*11 ($P=0,011$; $OR=0,14$) *13($P=0,006$ $OR=0,13$) *15 ($P=0,001$; $OR 0,04$).

O Brasil é um país que concentra raízes étnicas bastante variadas. Dessa forma há uma ampla miscigenação na população o que torna interessante o estudo genético de variantes do sistema HLA em relação a associação a determinadas doenças. A DM tipo 1 é uma patologia de incidência significativa no país. Este estudo obteve resultados significativos na associação do sistema HLA com a DM1 dos pacientes do Estado de Santa Catarina, sendo que são raros dados como este no Brasil até o presente momento.

Conclusão:

Neste estudo foi verificado que existe uma associação de variantes HLA de risco e/ou proteção em pacientes com DM1. Os alelos que apresentaram fator de proteção foram DRB1*11 e DRB1*07. Somente o alelo DRB1*04 apresentou suscetibilidade a DM1.

Tabelas:

Variantes	Pacientes N=62	%	Controles N=198	%	OR	IC (95%)	Probabilidade
DRB1*1	11	8,9	40	10,1	0.86637	0.573 >1.154> 2.324	0,68
DRB1*3	12	9,7	37	9,3	1,03958	0.485>0.962> 1.908	1,0
DRB1*4	34	27,4	48	12,1	2.73889	0.222 >0.365> 0.6	4,5 E-5
DRB1*7	7	5,6	50	12,6	0.41402	0.183 >0.414> 0.938	0,02
DRB1*8	7	5,6	28	7,1	0.78632	0.541 >1.272> 2.987	0,58
DRB1*9	2	1,6	4	1,0	1.60656	0.113 >0.622>3.44	0,58
DRB1*10	1	0,81	3	0,8	1.06504	0.097 >0.939>9.108	1
DRB1*11	10	8,1	59	14,9	0.50104	0.286 >0.541> 1.026	0,05
DRB1*12	2	1,6	11	2,8	0.57377	0.381 >1.743>7.971	0,46
DRB1*13	12	0,97	49	12,4	0.75875	0.677 >1.318> 2.566	0.415499
DRB1*14	1	0,8	11	2,8	0.28455	0.449 >3.514> 27.495	0.202012
DRB1*15	7	5,6	35	8,8	0.61709	0.267 >0.617> 1.426	0,25
DRB1*16	3	2,4	18	4,5	0.52066	0.151 >0.521> 1.798	0,29

1. Frequência variantes HLA-DR observadas

Referências:

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION (Estados Unidos). Diagnosis and Classification of DM. Diabetes Care. San Diego, 01 jan. 2010. p. 562-570. Disponível em: <http://care.diabetesjournals.org/content/33/Supplement_1/S62.full>. Acesso em: 04 mar. 2017.

INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION (Bélgica). Diabetes Atlas. 2015. Disponível em: <http://www.diabetesatlas.org> Acesso em: 10 mar. 2017.

GUELHO, Daniela et al. DM um continuum fisiopatológico. Revista Portuguesa de Endocrinologia, Diabetes e Metabolismo, Coimbra, p.1-15, 17 out. 2013. Mensal. Disponível em: <<http://www.elsevier.pt/revistas/revista-portuguesa-endocrinologia>>. Acesso em: 25 out. 2016

LOPES, Martina Sofia; BOSC, Simone Morelo dal. Paciente portador de DM tipo 1, transplantado de pâncreas e rim: Um relato de caso. Revista Destaques Acadêmicos, Lajeado, v. 5, n. 3, p.65-71, 01 jan. 2013. Mensal. Disponível em: <<http://univates.br/revistas/index.php/destaques/index>>. Acesso em: 24 abr. 2017.

MENDES, Camila Pires. Estudo do efeito do mecanismo de ação de híbridos sintéticos (glibenclamida/pioglitazona) na homeostasia da glicose. 2015. 129 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2015. Cap. 1.

NEUMANN, Jorge Milton et al. Doação e transplante de órgãos e tecidos. São Paulo: Segmento Farma, 2015. 560 p.

SALAS, Francisca; SANTOS, JoséLuís; PEREZ, Francisco. Genética de la DM tipo 1. Revista Chilena de Endocrinologia e Diabetes, Santiago, v. 1, n. 6, p.15-22, 16 nov. 2013. Mensal. Disponível em: <http://www.soched.cl/Revista_Soched/1_2013/art_3_1_2013.pdf>. Acesso em: 25 fev. 2017.

SEMZEZEM, Cintia; OLIVEIRA, Alessandra Valaria de. Associação dos Antígenos Leucocitários Humanos com o DM Tipo 1. Revista Saúde e Pesquisa, Maringá, v. 2, n. 2, p.233-239, 1 maio 2009. Mensal. Disponível em: <<http://periodicos.unicesumar.edu.br/index.php/saudpesq/article/view/969>>. Acesso em: 02 jan. 2017.

SHAW, J. E.; SICREE, R. A.; ZIMMET, P. Z. Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030. Diabetes Research and Clinical Practice, Melbourne, p.4-14, 6 nov. 2009. Mensal. Disponível em: <<https://www.journals.elsevier.com/diabetes-research-and-clinical-practice/>>. Acesso em: 15 fev. 2017

SILVA, Maria Elizabeth Rossi da; MORY, Denise; DAVINI, Elaine. Marcadores Genéticos e Auto-ímmunes do Diabetes Mellito tipo 1: Da teoria a prática. Arq Bras Endocrinol Metab, São Paulo, v. 2, n. 52, p.166-180, 21 jan. 2008. Mensal. Disponível em: <<http://www.producao.usp.br/handle/BDPI/10560>>. Acesso em: 28 fev. 2017.

SOUSA, Aucirlei Almeida de; ALBERNAZ, Alessandro Caetano; ROCHA SOBRINHO, Hermínio Mauricio da. Diabetes Mellito tipo 1 autoimune: aspectos imunológicos. Universitas: Ciências da Saúde, Brasília, v. 14, n. 1, p.53-65, 10 maio 2016. Mensal.

Disponível em:
<http://scholar.google.com.br/scholar?q=diabetes+melito+tipo+1+autoimune:+aspectos+imunologicos&btnG;=&hl=pt-BR&as_sdt=0,5&as_vis=1&oq=diabetes+melito+tipo+1+autoimune:+aspectos+imunolo>. Acesso em: 14 mar. 2017.