**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO**

EXPRESSÃO DAS MOLÉCULAS DE
HISTOCOMPATIBILIDADE DE CLASSE I E II EM
CÉLULAS LINFOMONOCITÁRIAS DE PACIENTES
COM DIABETES MELLITUS DO TIPO 1
RECENTEMENTE DIAGNOSTICADOS.

ANA PAULA MORAIS FERNANDES

Orientador: Prof. Dr. EDUARDO A DONADI

**Tese de mestrado apresentada à Faculdade de
Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de
São Paulo, para obtenção do título de Mestre
em Imunologia Básica e Aplicada**

Ribeirão Preto

1999

People of Colors (Elizabeth Rosen, 1995)

ÍNDICE

RESUMO.....	5
I-INTRODUÇÃO.....	8
I-1-DIABETES MELLITUS DO TIPO 1 (DM1).....	9
I-1.1-Etiopatogenia.....	10
I-1.1.1-Fatores ambientais.....	10
I-1.1.2-Fatores imunológicos.....	11
I-1.1.2.1-Mecanismos celulares.....	12
I-1.1.2.2-Mecanismos humorais.....	13
I-1.1.2.3-Moléculas de superfície celular.....	15
I-1.1.3-Fatores genéticos.....	16
I-2-O Complexo Principal de Histocompatibilidade (CPH).....	19
I-2.1-Estrutura gênica do CPH.....	19
I-2.2-As moléculas do CPH.....	22
I-2.3-Funções das moléculas do CPH.....	23
I-3-Associações dos genes do CPH com DM1.....	25
I-4-Papel das moléculas do CPH na patogenia do DM1.....	28
II-OBJETIVOS.....	31

III-CASUÍSTICA E MÉTODOS.....	33
III-1-População de estudo.....	34
III-1.1-Pacientes.....	34
III-1.2-Controles.....	34
III-2-Colheita de sangue.....	36
III-3-Citometria de fluxo.....	36
III-3.1-Marcação de células para análise em citometria de fluxo.....	36
III-3.2-Avaliação das populações celulares por citometria de fluxo.....	39
III-3.3-Análise do número de células mononucleares, expressando as moléculas HLA de classe I e II e a determinação da densidade de expressão dessas moléculas.....	39
III-4-Tipagem dos alelos HLA-DRB1, -DQA1 e -DQB1.....	40
III-4.1-Extração do DNA.....	40
III-4.2-Amplificação do DNA.....	41
III-4.3-Identificação dos produtos de amplificação em géis de agarose.....	42
III-4.4-Interpretação dos resultados.....	46
III-5-Análise estatística.....	48

IV-RESULTADOS.....	49
IV-1-Expressão das moléculas HLA-DR e HLA-DQ, e de classe I em diferentes populações linfomonocitárias.....	50
IV-1.1-Linfócitos T.....	50
IV-1.1.1-Linfócitos T CD3 ⁺	50
IV-1.1.2-Linfócitos T CD4 ⁺	50
IV-1.1.3-Linfócitos T CD8 ⁺	51
IV-1.2-Linfócitos B.....	64
IV-1.3-Monócitos.....	68
IV-2-Tipagens dos alelos HLA-DRB1, -DQA1 e -DQB1.....	72
IV-3-Avaliação das moléculas HLA conforme os alelos de susceptibilidade ao DM1.....	74
IV-3.1-Associação com os alelos HLA-DRB1*03.....	74
IV-3.2-Associação com os alelos HLA-DRB1*04.....	74
IV-3.3-Associação com o alelo HLA-DQB1*0201.....	74
IV-3.4-Associação com o alelo HLA-DQB1*0302.....	75
IV-3.5-Associação com os alelos HLA-DQA1*03 e -DQA1*05.....	75
V-DISSCUSSÃO.....	76
VI-CONCLUSÕES.....	88
VII-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	91
SUMMARY.....	101

RESUMO

Embora existam vários mecanismos propostos, o papel das moléculas de histocompatibilidade na susceptibilidade ao DM1 ainda não está totalmente esclarecido. Existem várias evidências de que o número de células apresentadoras de antígenos e a densidade de expressão das moléculas de histocompatibilidade nessas células pode influenciar o resultado da resposta imune. Assim, neste estudo, foram avaliadas as porcentagens das células $CD3^+$, $CD4^+$, $CD8^+$, $CD19^+$ e $CD14^+$, coexpressando as moléculas de histocompatibilidade de classe I e II, a densidade de expressão das moléculas de histocompatibilidade de classe I e II nessas populações linfomonocitárias e a correlação entre densidade de expressão dessas moléculas com o perfil imunogenético do DM1. Para esse fim, foram avaliados 20 pacientes com DM1, recentemente diagnosticados, metabolicamente compensados, sendo 12 do sexo masculino. Como controles, foram avaliados 20 indivíduos saudáveis, pareados com os pacientes em termos de idade, sexo e raça, procedentes da mesma região geográfica dos pacientes. A densidade de expressão das moléculas HLA nas diversas subpopulações linfomonocitárias foi avaliada por citometria de fluxo. Os marcadores imunogenéticos foram tipados utilizando-se iniciadores de oligonucleotídeos seqüência específicos. Os resultados foram analisados usando o teste não paramétrico de Mann Whitney U. Foi observado aumento da densidade de expressão das moléculas de histocompatibilidade de classe I em linfócitos T $CD3^+$, $CD4^+$ e $CD8^+$ de pacientes com DM1 quando comparados aos controles. Em relação às moléculas HLA de classe II, o número e a porcentagem dos linfócitos T $CD4^+$, coexpressando as moléculas HLA-DQ de pacientes estavam diminuídos em relação aos controles. Os resultados referentes à correlação do perfil genotípico dos pacientes revelam que pacientes portadores dos alelos HLA-DQB1*02 apresentaram diminuição no número e porcentagem das células $CD3^+$, $CD4^+$, $CD8^+$, $CD19^+$ e $CD14^+$ coexpressando as moléculas HLA-DQ, e ainda, o aumento da densidade de expressão da molécula HLA-DQ nas células $CD19^+$, em relação aos pacientes sem esses alelos. Pacientes com o alelo HLA-DQB1*0302 apresentaram aumento do número de células $CD14^+$ e $CD19^+$ coexpressando as moléculas HLA-DQ, e ainda, o aumento da densidade de expressão dessas molécula nas células $CD14^+$ em relação aos pacientes negativos para esse alelo. Além da instabilidade de ligação dos peptídeos com as moléculas de

susceptibilidade ao DM1, este estudo reafirma a importância da densidade de expressão das moléculas de classe II na susceptibilidade ao DM1.

I-INTRODUÇÃO

I-1-DIABETES MELLITUS DO TIPO 1

No século passado, vários estudos foram conduzidos para explicar a origem do diabetes mellitus. Em 1889, von Mering & Minkowski apud LERNMARK (1985) relataram que a completa remoção do pâncreas de cães causava o diabetes, mimetizando a doença em humanos, concluindo que o diabetes estava associado com a perda da função do pâncreas. Maiores avanços no entendimento da patologia do diabetes afluíram após várias décadas quando GEPTS (1965) relatou que as alterações morfológicas nas ilhotas de Langerhans em pacientes com diabetes, recentemente diagnosticados, estavam relacionadas com a diminuição do número das células β e presença de células inflamatórias. Mais tarde, RAHIER et al. (1983) revelaram perdas seletivas das células β no diabetes do tipo 1, produzindo uma diminuição da massa pancreática.

Atualmente, o diabetes mellitus do tipo 1 (DM1) tem sido entendido como uma doença auto-imune órgão-específica, resultante da destruição seletiva das células β pancreáticas, produtoras de insulina, por infiltração progressiva de células inflamatórias, possivelmente provocada pelos linfócitos T citotóxicos auto-reativos (FAUSTMAN et al., 1991; BOITARD et al., 1997). As manifestações clínicas do distúrbio metabólico surgem quando cerca de 80% das células β tenham sido destruídas (TOGUN et al., 1997).

O DM1 é uma das doenças crônicas mais comuns entre crianças e adultos jovens, podendo se desenvolver em qualquer idade mas, sendo mais frequente antes dos 20 anos de idade (SCHRANZ & LERNMARK, 1998). Acomete cerca de 0,3% das populações caucasianas, apresentando um pico de início da doença entre os 11 e 12 anos de idade (TODD, 1990). Em estudos realizados em três cidades do estado de São Paulo, entre 1987 a 1991, a incidência anual atinge a cifra de 7,6/100.000 habitantes, média similar àquela observada em países desenvolvidos. (FERREIRA et al., 1993)

I-1.1- Etiopatogenia

Embora a etiopatogenia do DM1 esteja sendo extensamente estudada, os mecanismos precisos envolvidos na iniciação, progressão e destruição auto-imune das células β ainda não estão completamente elucidadas (YOON et al.,1998).

O DM1 é considerada uma doença multifatorial, englobando as participações dos fatores genéticos, imunológicos e ambientais. Estudos epidemiológicos realizados entre gêmeos monozigóticos, revelam concordância de aparecimento da doença em cerca de 50% dos casos, sugerindo que, além dos fatores genéticos existe a participação de outros componentes etiológicos como os fatores ambientais e os imunológicos (DAHLQUIST, 1998; YOON, 1990).

I-1.1.1- Fatores ambientais

Agentes ambientais como infecções virais, especialmente pelos enterovírus, em particular pelo Coxsackie B, estão associados com o processo de lesão das células β . Estudos realizados para detecção do RNA viral no sangue periférico entre pacientes diabéticos, recentemente diagnosticados, revelam que de 42 a 64% desses pacientes possuem o genoma viral para Coxsackie B4 ou B3 (CLEMENTS et al.,1995; ANDREOLETTI et al., 1998).

Embora o mecanismo de lesão tecidual não esteja esclarecido, o papel do mimetismo molecular tem sido proposto. A hipótese está baseada em evidências epidemiológicas, clínicas e experimentais da associação entre a presença de agentes infecciosos com o surgimento das doenças auto-imunes, e ainda, com a reação cruzada entre células e moléculas do sistema imune com antígenos próprios e os determinantes antigênicos microbianos. Um provável mecanismo de destruição tecidual é a geração de linfócitos T citotóxicos (CTL) auto-reativos ou auto-anticorpos que reconhecem de maneira cruzada, os determinantes próprios específicos sobre as células-alvo. Outra hipótese é que a lesão tecidual auto-imune pode ocorrer mesmo após o imunógeno ter sido removido, assim, a infecção viral/microbiana que iniciou o fenômeno auto-imune pode não estar presente quando a doença auto-imune surge (OLDSTONE, 1998).

Tem sido relatado que o vírus Cocksackie B4, fortemente associado com o desenvolvimento do DM1 em humanos, compartilha seqüências de aminoácidos com o auto-antígeno GAD (ácido glutâmico descarboxilase), induzindo a auto-imunidade por meio de mimetismo molecular (KAUFMAN et al., 1992).

Outro mecanismo que pode induzir uma resposta auto-imune é a própria infecção viral local causando, lesão tecidual com destruição direta das células das ilhotas, com liberação de auto-antígenos seqüestrados, estimulando linfócitos T auto-reativos. Esse mecanismo, proposto por HORWITZ, revela uma forte associação da infecção pelo vírus Cocksackie B4 com o desenvolvimento do DM1 em humanos (HORWITZ et al., 1998; VON-HERRATH et al., 1998; SEE & TILLES, 1998).

Em 1998, ROIVAINEN et al. sugerem que, além do sorotipo B4, outros tipos do vírus Cocksackie também estejam relacionados ao DM1. Assim, anticorpos neutralizantes para Cocksackie A9, Cocksackie B1, B2, B3 e B5 têm sido detectados em pacientes recentemente diagnosticados.

Além das infecções pelos enterovírus, também fazem parte dos fatores ambientais, os componentes da dieta, particularmente as proteínas do leite de vaca. Embora esta teoria tenha sido proposta há mais de 10 anos, permanece ainda como uma hipótese no desencadeamento do diabetes (AKERBLOM & KNIP, 1998).

I-1.1.2- Fatores imunológicos

Vários mecanismos imunológicos, tanto celulares quanto humorais, têm sido relatados como participantes da patogenia do DM1. Dos mecanismos celulares, podemos destacar as participações de várias células constituintes do sistema imune, como as células T ($CD4^+$ e $CD8^+$), as células B e as células apresentadoras de antígenos (macrófagos e células dendríticas). Dentre os mecanismos humorais, temos a participação dos auto-anticorpos específicos para antígenos das ilhotas pancreáticas e as citocinas pró-inflamatórias. Além desses, as moléculas de histocompatibilidade e as moléculas co-estimulatórias participam também da patogenia da doença. A seguir, são relatados os principais fatos referentes às participações desses fatores imunológicos.

I-1.1.2.1-Mecanismos celulares

O processo auto-imune que resulta no DM1 pode ser visto como uma falha no desenvolvimento ou manutenção da tolerância aos auto-antígenos, expressos nas células β das ilhotas de Langerhans do pâncreas. Durante o desenvolvimento e maturação dos linfócitos T no timo, as células que são reativas contra os auto-antígenos sofrem deleção ou anergia clonal, ocorrendo a remoção dessas células do conjunto de células T periféricas maduras. Para os auto-antígenos timo-independentes, a tolerância é mais complexa e pode depender das condições de expressão do auto-antígeno no local da reação imune, das concentrações de citocinas no micro-ambiente, da disponibilidade das células apresentadoras de antígenos (APC), e ainda, da geração de sinais co-estimulatórios (NOSSAL et al., 1992).

Em modelos animais, os camundongos NOD (nonobese diabetic) são usados para estudar a patogenia do DM1, pois a doença nesses animais mimetizam aquela observada em humanos (TOYODA & FORMBY, 1998). Assim, análises imunohistoquímicas de tecido pancreático revelam que, os primeiros tipos celulares a infiltrarem as ilhotas de Langerhans, promovendo a insulinite, são as células dendríticas e os macrófagos (YOON et al., 1998; DAHLÉN et al., 1998). A apresentação dos auto-antígenos específicos das células β pancreáticas pelos macrófagos e/ou células dendríticas para as células T $CD4^+$, em associação com as moléculas de MHC de classe II, é o primeiro passo para o desenvolvimento da auto-imunidade do DM1. Os macrófagos ativados secretam IL-12 que estimulam as células T $CD4^+$ tipo Th1 a secretarem IL-2 e IFN- γ . O IFN- γ , por sua vez, ativa outros macrófagos residuais a liberem IL-1 β , TNF- α e radicais livres tóxicos para as células β pancreáticas. Durante esse processo, várias citocinas induzem a migração dos linfócitos T $CD8^+$ periféricos para as ilhotas inflamadas. Os linfócitos pré-citotóxicos T $CD8^+$, apresentando receptores específicos para os auto-antígenos das células β pancreáticas, se diferenciam em linfócitos T citotóxicos efetores após reconhecimento do auto-antígeno ligado à molécula MHC de classe I. As células T citotóxicas (CTL) efetuam a citólise das células-alvo através da liberação de perforina e granzima, e pela apoptose mediada via Fas. Dessa maneira, os macrófagos, as células T $CD4^+$ e as células T $CD8^+$ atuam sinergicamente para

destruir as células β pancreáticas, iniciando o DM1 (YOON, JUN, SANTAMARIA, 1998).

O mecanismo de destruição celular pelas CTL, por apoptose via Fas, proposto por DE MARIA & TESTI (1998), sugerem que as células β pancreáticas que normalmente não expressam a molécula Fas (CD95), são induzidas a expressá-la de maneira seletiva e funcional pelas citocinas e mediadores inflamatórios liberados durante o processo de insulinite nas ilhotas. Dessa maneira, a expressão seletiva de Fas sobre as células β e a ausência de Fas sobre as células α e γ do pâncreas, durante o processo de insulinite, pode conferir uma vulnerabilidade específica das células β , para a destruição, via apoptose pelas células T citotóxicas FasL positivas.

Além das APC e das células T, os linfócitos B também participam da patogenia do diabetes, atuando ora como células apresentadoras de antígenos, ora se diferenciando em plasmócitos secretores de auto-anticorpos.

Estudos realizados em camundongos NOD transgênicos, deficientes em linfócitos B, revelam que essas células parecem contribuir para o desenvolvimento da doença, atuando como células apresentadoras de antígenos (APC), apresentando preferencialmente certos auto-antígenos das células β pancreáticas, como GAD (ácido glutâmico descarboxilase) para as células T auto-reativas (SERREZE et al., 1998).

I-1.1.2.2- Mecanismos humorais

A presença de auto-anticorpos denota o desenvolvimento de uma reação auto-imune, sendo que esses anticorpos são utilizados como marcadores da auto-imunidade anti-ilhotas. Uma ampla variedade de auto-anticorpos contra os antígenos das células β das ilhotas de Langerhans têm sido relatada e confirmada por vários investigadores.

Auto-anticorpos anti-insulina (insulin autoantibodies-IAA) são detectados em cerca de 50% dos pacientes diabéticos recentemente diagnosticados, sendo mais comum entre crianças do que entre jovens e adultos. O papel da insulina como um auto-antígeno ainda não é conhecido, nem o local ou como a insulina é processada e apresentada (SCHRANZ & LERNMARK, 1998)

O ácido glutâmico descarboxilase (glutamic acid decarboxylase-GAD), principal auto-antígeno na patogenia do DM1, é uma enzima que cataliza a formação do ácido gama amino butírico (GABA-transmissor neuroinibidor do sistema nervoso central), a partir do L-glutamato. Duas formas são reconhecidamente expressas nos tecidos humanos: GAD65 e GAD67, sendo que GAD 65 é um heterodímero formado pelas subunidades α e β , enquanto que GAD67 é um monômero. Anticorpos anti-GAD65 são detectados em cerca de 50% a 80% dos pacientes recentemente diagnosticados.

Outros auto-anticorpos detectados nos pacientes diabéticos recentemente diagnosticados são os anticorpos anti-células das ilhotas, que reconhecem receptores de membrana do tipo PTP (protein tyrosine phosphatases) das células β , ICA512 (islet cell antigen 512) ou IA-2 (islet antigen 2). A detecção desses auto-anticorpos se desenvolve após o aparecimento do anticorpo anti-GAD65 e praticamente confirmam o diagnóstico da doença, ocorrendo em cerca de 50% a 70% dos pacientes recentemente diagnosticados. O auto-antígeno IA-2 β (islet antigen 2 β) ou IAR (islet antigen receptor), são outros receptores de membrana das células β pancreáticas, do tipo PTP, que também são reconhecido pelos auto-anticorpos anti-ilhotas, apresentando cerca de 74% de homologia ao domínio intracelular da isoforma IA-2, sendo detectado em cerca de 50% nos pacientes (SAVOLA et al., 1998; YOKODA et al., 1998; SCHRANZ & LERNMARK, 1998).

A liberação local de citocinas inflamatórias decorrente de uma infecção, pode ter um papel central na determinação da perda da tolerância funcional aos auto-antígenos e na ativação de linfócitos auto-reativos, iniciando a auto-imunidade (GIANANI & SARVETNICK, 1996). A relação entre inflamação e auto-imunidade tem sido estudada por meio da identificação de citocinas pró-inflamatórias liberadas no local da lesão, e também, pela capacidade dessas citocinas recrutar e ativar as células dendríticas e os macrófagos (APC) a apresentarem auto-antígenos às células T auto-reativas (GREEN et al., 1998).

Estudos anatomo patológicos do pâncreas de crianças, falecidas por ocasião do diagnóstico da doença, revelam que o evento imunológico inicial no desenvolvimento da doença parece ser a produção de IFN- γ pelas células β produtoras de insulina. A secreção dessa citocina está associada com a

hiperexpressão das moléculas MHC de classe I e a expressão aberrante das moléculas MHC de classe II pelas células produtoras de insulina. Com esses eventos, pode ocorrer a apresentação dos auto-antígenos pelas células β pancreáticas às células T auto-reativas, induzindo a auto-imunidade. A produção inicial de IFN- γ pode ser decorrente de uma infecção viral nessas células pancreáticas (FOULIS, 1996).

Reforçando a idéia de que a resposta auto-imune contra as células β pancreáticas é resultante de alterações da imuno-regulação, RABINOVITCH (1998), propõe que os linfócitos T CD4⁺ com seu padrão de citocinas do tipo Th1 (IL-2, IFN- γ) iniciam a cascata dos processos imunes e inflamatórios da insulinite, culminando na destruição das células β pancreáticas. Na presença de infecção, as citocinas do tipo Th1 ativam as células citotóxicas a interagirem especificamente com as células β , destruindo-as. Os macrófagos ativados liberam outras citocinas pró-inflamatórias (IL-1 e TNF- α), radicais livres de oxigênio e nitrogênio, altamente tóxicos para as células β pancreáticas (RABINOVITCH & SUAREZ-PINZON, 1998). Além disso, essas citocinas também podem sensibilizar as células β para a citotoxicidade mediada pelos linfócitos T, por intermédio do aumento da expressão das moléculas de histocompatibilidade de classe I sobre as células β (ação do IFN- γ), e ainda, induzindo a expressão de Fas (CD95) sobre as células β (ação do IL-1, TNF- α e IFN- γ) (RABINOVITCH, 1998).

I-1.1.2.3- Moléculas de superfície celular

As moléculas de histocompatibilidade (HLA) de classe I e de classe II têm papel central na indução e regulação da resposta imune contra infecções microbianas, apresentando os peptídeos antigênicos processados aos linfócitos T CD8⁺ e CD4⁺, respectivamente. A expressão constitutiva das moléculas de histocompatibilidade de classe I é ampla, em contrapartida, as moléculas de histocompatibilidade de classe II têm a sua expressão constitutiva restrita primariamente às células apresentadoras de antígeno, ou seja, os linfócitos B, as células dendríticas e os macrófagos. No entanto, uma ampla variedade de tipos celulares podem ser induzidos a expressar as moléculas HLA de classe II após a exposição a certas citocinas (ROHN et al., 1996),

especialmente os interferons (IFN), aumentando a expressão das moléculas HLA de classe I e II. O surgimento de citocinas pode ocorrer durante uma infecção viral, em que as células hospedeiras infectadas são induzidas a produzir o IFN (KESKINEN et al., 1997). Assim, as células β pancreáticas que não expressavam constitutivamente as moléculas de histocompatibilidade de classe II podem ser induzidas a expressá-las, podendo servir como APC (quando aberrantemente expressa tais moléculas), ou ainda, como alvo para destruição pelas CTL, quando apresentam as moléculas de classe I.

Sinais coestimulatórios, necessários para a completa ativação dos linfócitos T, são fornecidos principalmente pela interação de moléculas CD80 (B7-1) ou CD86 (B7-2), freqüentemente expressas em APC, com as moléculas CD28 presentes nos linfócitos. Esse processo tem sido também investigado como possível mecanismo patogênico na destruição das células β , desencadeando o diabetes. Estudos realizados em biópsias de pâncreas, em pacientes com insulinite, recentemente diagnosticados, revelam que ambas moléculas coestimulatórias estão expressas em células T CD3⁺ infiltrantes (IMAGAWA et al., 1996).

I-1.1.3- Fatores genéticos

A alta incidência familiar do DM1, particularmente entre parentes de primeiro grau dos pacientes, bem como a maior concordância para o aparecimento da doença entre gêmeos monozigóticos em relação aos dizigóticos, indicam que os fatores genéticos têm grande importância na patogenia do diabetes (MAUGENDRE et al., 1996; SHE JX & MARRON MP, 1998; REDONDO et al., 1999).

O DM1 tem sido considerada uma doença com herança poligênica complexa. Cerca de 20 genes podem estar associados com susceptibilidade à doença, mas apenas 13 apresentam evidências estatisticamente significantes de associação. A maior contribuição vem da região onde estão localizados os genes do Complexo Principal de Histocompatibilidade (CPH), situado no cromossomo 6p21, contribuindo em cerca de 40% na susceptibilidade à doença (genes DM11). Contribuições de menor monta são conferidas por genes de fora do MHC (OWERBACH et al., 1997).

Os genes DM12 contribuem em cerca de 10% para a susceptibilidade ao diabetes. Estão localizados, no cromossomo 11p15.5, logo abaixo do gene que codifica a tirosina hidrogenase e acima do gene que codifica a insulina. Identificados como regiões de números variáveis de repetições de nucleotídeos (variable number of tandem repeat-VNTR) ricos em C e G, englobando 3 classes de VNTR. A VNTR de classe I tem o menor número de repetições e predispõe ao diabetes, em contraste, a de classe III tem o maior número de repetições e confere resistência à doença. Tem sido sugerido que a proteção seja devida ao aumento dos níveis do RNAm de insulina no timo, em quantidades suficientes para induzir uma seleção negativa das células T auto-reativas, induzindo então, a tolerância à insulina (VAFIADS et al., 1997; PUGLIESE et al., 1997).

O marcador DM112, também mostra uma associação com a doença. Presente no cromossomo 2q33, na região codificadora para os genes CTLA-4 (proteína 4 associada ao linfócito T citotóxico) e CD28, tem papel importante na regulação negativa da ativação dos linfócitos T (SHE, & MARRON, 1998).

Os outros marcadores gênicos associados ao diabetes, do DM13 ao DM113, estão localizados em diversos cromossomos, muitos deles são polimórficos, possuindo graus variáveis de associação com a doença (SCHRANZ & LERNMARK, 1998). Estudos familiares entre irmãos afetados pela doença confirmam que alguns desses marcadores estão em desequilíbrio de ligação, como o DM112 (2q33), o DM17 (2q31-q33), o DM16(18q), o DM110(10p13-q11) e o DM113(2q33) (SHE, & MARRON, 1998).

O papel dos genes da região do MHC (DM11) na susceptibilidade ao diabetes foi primeiro indicado pelas associações com os antígenos HLA-B8 e HLA-B15. Posteriormente, foi observado que os genes DRB1, da região MHC de classe II, que codificam os antígenos HLA-DR3 e HLA-DR4 estavam mais consistentemente associadas com a doença. O antígeno HLA-DR3 está em desequilíbrio de ligação com HLA-B8 e o antígeno HLA-DR4 com o HLA-B15. Atualmente os genes HLA-DR são considerados secundários na susceptibilidade à doença, estando em desequilíbrio de ligação com os genes principais, os HLA-DQB1 e -DQA1. O HLA-DR*04 está em desequilíbrio de ligação com o HLA-DQB1*0302 que, atualmente, é

considerado o principal gene de susceptibilidade à doença (SCHRANZ & LERNMARK, 1998; SHE & MARRON, 1998).

Os genes que conferem resistência ao diabetes são DRB1*1501 (DR2), *11 (DR5), *13 e DQB1*0602 e *0301. O alelo DQB1*0301, que confere resistência tem o resíduo ácido aspártico (Asp) na posição 57, diferenciando-se do alelo HLA-DQB1*0302, que confere susceptibilidade, apenas pela substituição do resíduo da posição 57 pelos aminoácidos alanina (Ala), serina (Ser) ou valina (Val). A simples substituição de 1 resíduo de aminoácido na molécula HLA de classe II pode alterar a afinidade de ligação ao peptídeo diabetogênico. Cerca de 85-90% de pacientes diabéticos, com menos de 17 anos, possuem na cadeia β da molécula HLA-DQB1-*0201, -*0302, ou -*0101 um resíduo diferente do ácido aspártico na posição 57. A susceptibilidade ao diabetes também está associada à perda do Asp nesta posição nas cadeias β das moléculas HLA-DR (MCDEVITT, 1998).

Além dos genes de histocompatibilidade clássicos, também foram identificados outros genes secundários de susceptibilidade à doença. Os genes LMP2 e LMP7 (large multifuncional protease 2 e 7) que codificam 2 subunidades do proteassoma, proteínas responsáveis pela degradação das proteínas citosólicas e geração de peptídeos a serem apresentados pelas moléculas HLA de classe I aos linfócitos T CD8⁺. Nas subunidades LMP2 e LMP7 estão os sítios das proteases que fornecem peptídeos com resíduos carboxi terminais adequados para o ancoramento do peptídeo à molécula HLA de classe I. Tais genes, codificando essas subunidades do proteassoma, são polimórficos. Deste modo, diferentes alelos podem possuir diferentes especificidades para clivagem de proteínas e conseqüente geração de diferentes peptídeos. Os alelos LMP2-R/R e LMP7-A/B estão associados com a susceptibilidade ao diabetes, estando em desequilíbrio de ligação com o haplotipo HLA-B15/DRB1*04/DQB1*0302 (DENG et al., 1995).

Os genes TAP1 e TAP2 (transporter-associated antigen processing), também fazem parte dos marcadores DM11. São polimórficos e codificam as subunidades de que translocam os peptídeos citosólicos, gerados pelo complexo proteassoma para o interior do retículo endoplasmático, para serem acoplados às moléculas de HLA de classe I, para posterior apresentação às células T CD8⁺. O polimorfismo desses genes, com a conseqüente diversificação dos alelos e variação na seqüência de

aminoácidos, pode também conduzir a diferentes afinidades de ligação aos peptídeos gerados, podendo levar a seleção no transporte dos peptídeos a serem apresentados (JACKSON & CAPRA, 1993). O gene TAP1-C está associado com susceptibilidade à doença, estando em desequilíbrio de ligação com os genes LMP2-R/R, LMP7-A/B, HLA-DR*04, HLA-DQB1*0302 e HLA-B15. O gene TAP2-B está em desequilíbrio de ligação com HLA-DR*03 e HLA-B8, estando também associado com a susceptibilidade ao diabetes.

I-2- O COMPLEXO PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDADE.

I-2.1- Estrutura gênica do Complexo Principal de Histocompatibilidade.

O Complexo Principal de Histocompatibilidade (CPH) humano é o conjunto de genes mais polimórficos já conhecido, codificando proteínas expressas nas superfícies de vários tipos celulares, é também conhecido como sistema HLA (antígenos leucocitários humanos). Foi descoberto como resultado das tentativas de realização de enxertos cutâneos em pilotos gravemente queimados ou vítimas de bombas durante a segunda guerra mundial, sendo constatado que os pacientes rejeitavam vigorosamente os enxertos. Com a utilização de experimentos gênicos realizados com camundongos endocruzados foi possível a identificação deste complexo de genes, capazes de causar a rejeição dos enxertos cutâneos entre camundongos que diferiam apenas nos loci gênicos de histocompatibilidade e não em outros (JANEWAY & TRAVERS, 1997).

O CHP humano está situado no braço curto do cromossomo 6 e se estende ao longo de 2 a 4 centimorgans (cM) de DNA, ou seja, cerca de 4×10^6 pares de bases. Contém no mínimo, cerca de 100 genes, sendo organizados nas regiões de classe I, II e III.

A Figura 1 ilustra uma representação esquemática, resumida, da estrutura dos genes que compõe o CPH humano.

Os primeiros 3 genes definidos foram denominados de HLA-A, HLA-B e HLA-C. Codificam as cadeias α das moléculas HLA de classe I. Os três pares de genes seguintes a serem identificados foram mapeados numa região adjacente, denominada HLA-D, onde o primeiro produto gênico detectado foi denominado HLA-D “relacionado” ou HLA-DR, e os outros dois genes foram subsequentemente denominados HLA-DQ e HLA-DP (Q e P foram escolhidos pela proximidade alfabética ao R) que codificam as cadeias α e β das moléculas HLA de classe II. No entanto, o conjunto HLA-DR contém genes diversos para as cadeias β : B1, B3, B4, B5, cujos produtos podem se parear com a cadeia α da molécula DR, podendo formar vários conjuntos de moléculas HLA-DR. A região de classe II também possui dois genes TAP: TAP1 e TAP2 que codificam proteínas responsáveis pelo transporte, até o retículo endoplasmático, dos peptídeos gerados no citosol, os genes LMP: LMP2 e LMP7 que codificam os componentes do proteassoma, responsáveis pela geração de peptídeos, através do processamento de antígenos citosólicos. Além disso, contém também os genes HLA-DM (DMA e DMB) que codificam moléculas que catalizam a ligação de peptídeos às moléculas HLA de classe II. A região denominada classe III, que fica no espaço entre a de classe I e classe II, contém genes que codificam os componentes C2, C4 (genes C4A e C4B) da via clássica e o Fator B da via alternativa do sistema complemento, assim como os genes das citocinas TNF α e β , dois genes da proteína do choque térmico (Hsp70 2 e Hsp70 1H) e dois genes da enzima 21 hidroxilase (CYP 21A e CYP 21B) (JANEWAY & TRAVERS,1997; PANAYI & DAVID, 1984).

Considerando que um indivíduo receba um gene HLA-A, -B e -C de cada progenitor, e que estes genes são codominantes, pelo menos 6 destas moléculas podem ser encontradas nas superfícies celulares. O número de moléculas HLA-DR, -DQ e -DP presentes nas superfícies celulares pode variar de acordo com os alelos apresentados pelo indivíduo, podendo ser encontradas até 12 moléculas diferentes, oriundas das combinações dos genes HLA-DRA/DRB1, DRA/DRB3, DRA/DRB4, DRA/DRB5, DQA1/DQB1 e DPA1/DPB1.

O CPH tem 2 propriedades marcantes, ele é poligênico e altamente polimórfico. Embora a estrutura básica das moléculas HLA de classe I ou II seja semelhante, os genes que codificam estas moléculas apresentam, em determinadas regiões, seqüências de nucleotídeos que podem variar de um indivíduo para outro, esse polimorfismo das moléculas de histocompatibilidade está restrito aos domínios terminais da molécula, justamente no sulco de ligação ao peptídeo. Assim, para o locus HLA-B existem cerca de 260 variações no mesmo locus. Essas variações individuais dos genes são denominadas de alelos. A última nomenclatura dos genes do CPH inclui cerca de 124 alelos para HLA-A, 258 HLA-B, 86 HLA-C, 1 HLA-DRA (não polimórfico), 221 HLA-DRB1, 19 HLA-DRB3, 10 HLA-DRB4, 14 HLA-DRB5, 20 HLA-DQA1, 39 HLA-DQB1, 15 HLA-DPA1, 85 HLA-DPB1 (BODMER et al., 1999)

Uma característica típica dos genes do CPH é o desequilíbrio de ligação, isto é, para preservar determinados haplotipos, a frequência observada de um dado alelo é maior do que a esperada por combinações de alelos ao acaso. Assim os genes HLA-A*0101, B*0801, DRB1*0301, DQA1*0501 e DQB1*0201 que codificam as moléculas A1, B8, DR3 e DQ2, associadas à suscetibilidade ao Diabetes Mellitus do tipo 1, são freqüentemente encontradas juntas formando o mesmo haplotipo (NEPOM & ERLICH, 1991).

O polimorfismo das moléculas de histocompatibilidade interessa aos imunologistas porque pode afetar: a seleção de peptídeos a serem apresentados via moléculas de HLA de classe I e II, o reconhecimento dos antígenos pelas células T, o desenvolvimento das células T, a rejeição aos enxertos de tecidos e a susceptibilidade a muitas doenças como as auto-imunes.

A nomenclatura dos genes do CPH foi proposta pelo Comitê de nomenclatura do sistema HLA da Organização Mundial de Saúde com a intenção de padronizar e facilitar o entendimento do complexo gênico. Sendo assim, os genes do CPH são designados pelas letras correspondentes aos loci ou grupos de loci, como HLA-A, HLA-B, HLA-DR, HLA-DQ. Nos casos em que mais de uma molécula seja codificada por genes do CPH, a letra equivalente à cadeia é colocada após a designação do loci, exemplo, HLA-DRA, HLA-DRB1, HLA-DQB1, etc. Os dois primeiros números são equivalentes às especificidades definidas previamente pela sorologia, como HLA-A*01, HLA-B*07, HLA-DRB1*04, HLA-DQB1*02. Os dois dígitos seguintes identificam os alelos, como HLA-A*0101, HLA-B*0701, HLA-DRB1*0401, HLA-DQB1*0201. Um quinto dígito é adicionado para designar a substituição silenciosa de uma base nitrogenada no código genético, sem alterar os resíduos de aminoácidos da molécula, exemplo, HLA-DQA1*05011, HLA-DQA1*05013. A letra N quando colocada após a designação do último número do alelo significa que o gene não promove síntese de proteína, exemplo, HLA-A*0215N (BODMER, 1997).

I-2.2- As moléculas do Complexo Principal de Histocompatibilidade.

As moléculas HLA de classe I e as de classe II são glicoproteínas de superfície celular, estreitamente relacionadas quanto à sua função e estrutura geral. Apresentam três porções, uma citosólica voltada para o interior da célula, responsável pela transdução de sinais intracelulares, uma transmembrana que mantém a molécula acoplada à camada bilipídica, e a maior delas, a extracelular, responsável pela apresentação de peptídeos. As moléculas HLA de classe I são expressas em praticamente todas as células nucleadas e consistem de duas cadeias polipeptídicas: uma α ou pesada, codificada por genes do CPH, associada não covalentemente a uma cadeia menor, β 2 microglobulina, proteína não polimórfica codificada pelo gene situado no cromossomo 15. A molécula possui 4 domínios: α 1, α 2, α 3 e β 2 microglobulina. Entre os domínios α 1 e α 2 forma-se o sulco de ligação ao peptídeo, sendo local em que ocorre o maior polimorfismo. A associação do peptídeo ao sulco da molécula HLA de classe I ocorre no retículo endoplasmático,

promovendo a associação das cadeias α e β e a completa estabilidade conformacional das moléculas, para que dessa forma possam ser expressas na superfície celular (HAO et al., 1996). As moléculas de classe II são expressas constitutivamente apenas por um subgrupo de células hematopoiéticas denominadas células apresentadoras de antígenos (APC) como por exemplo células B, macrófagos, células de Langerhans, células dendríticas e células do epitélio tímico. Consistem de um complexo de duas cadeias α e β unidas não covalentemente, que juntas formam quatro domínios $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\beta 1$ e $\beta 2$. Entre os domínios $\alpha 1$ e $\beta 1$ há a formação do sulco de ligação ao peptídeo, sendo que $\beta 1$ é o local predominantemente polimórfico para as moléculas HLA-DR, -DQ e -DP e o domínio $\alpha 1$ é polimórfico apenas para as moléculas HLA-DQ e -DP.

A Figura 2 mostra esquematicamente as moléculas de classe I e II.

I-2.3- Funções das moléculas do Complexo Principal de Histocompatibilidade.

Apenas os antígenos processados no interior das células serão apresentados nas superfícies celulares, no contexto das moléculas do CPH, às células T. Tais antígenos podem derivar de microrganismos como vírus ou bactérias intracelulares,

ou patógenos e seus produtos que foram internalizados por endocitose a partir do fluido extracelular. Os peptídeos resultantes da degradação de antígenos protéicos oriundos do citosol se ligam às moléculas de HLA de classe I por meio de seus resíduos de ancoragem, formando o complexo HLA/peptídeo. Esse complexo é transportado até a superfície celular e apresentado às células T citotóxicas CD8⁺. Os genes LMP 2 e 7 e os TAP 1 e 2, embora localizados na região de classe II, sintetizam proteínas que ajudam o peptídeo a se ligar à molécula de classe I ainda no meio intracelular, permitindo que a molécula se expresse nas superfícies celulares e apresente os peptídeos aos receptores linfocitários, presentes nas células T CD8⁺. Por sua vez, as moléculas HLA de classe II conduzem os peptídeos provenientes do sistema vesicular para a superfície celular, onde serão reconhecidos pelas células T CD4⁺. As moléculas HLA-DM permitem a ligação do peptídeo à molécula de classe II, ainda no meio intracelular.

Como descrito anteriormente, o polimorfismo das moléculas HLA está predominantemente localizado nos seus sítios de ligação ao peptídeo, sendo que os peptídeos apresentados por uma mesma molécula, apresentam resíduos de ancoragem semelhantes. Por outro lado, moléculas distintas podem apresentar peptídeos com diferentes resíduos de ancoragem e diferentes seqüências. Assim, o polimorfismo das moléculas pode determinar quais peptídeos que podem ser a elas ligados, isto é, definindo o repertório de peptídeos que serão apresentados às células T.

Durante o seu desenvolvimento tímico, as células T são positiva e/ou negativamente selecionadas, dependendo do TCR que elas expressam. As células T com TCR para HLA/peptídeo próprio são selecionadas positivamente, e as células T com forte afinidade do TCR para HLA/peptídeo próprio são negativamente selecionadas ou delidas. Os detalhes deste processo não estão totalmente conhecidos, mas o resultado será de um grupo de células T maduras capazes de reconhecer vários peptídeos derivados de proteínas estranhas nos sítios de ligação peptídica de moléculas HLA próprias.

Entretanto, a seleção negativa é provavelmente falha. Células T com TCR para peptídeos próprios podem escapar do processo de seleção negativa porque a concentração de alguns peptídeos próprios no timo é baixa. Este pode ser o caso de algumas células T potencialmente reativas contra as células β do pâncreas.

Normalmente, as células T podem ser inativadas (anergizadas) quando confrontadas com as células β , devido a sua incapacidade em promover certos sinais co-estimuladores para a ativação da célula T, mas, a situação pode ser totalmente diferente se alguns peptídeos derivados das células β forem apresentados em um ambiente propício para promover os sinais co-estimuladores.

I-3- ASSOCIAÇÃO DOS GENES DO COMPLEXO PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDADE COM DIABETES MELLITUS DO TIPO 1.

Os primeiros estudos acerca da susceptibilidade imunogenética ao DM1 datam da década de 70, sendo encontradas associações com os antígenos de classe I HLA-B8 e B15. Posteriormente, foi verificado que as associações mais importantes eram com os antígenos de classe II HLA-DR3 e HLA-DR4, em desequilíbrio de ligação com os antígenos HLA-B8 e B15, respectivamente. Subseqüentemente, os genes DQA1*0301 e *0501 e os genes DQB1*0201 e *0302 se revelaram os mais fortemente associados à doença. Atualmente, têm sido sugerido que ambos genes DR e DQ influenciam na susceptibilidade ou proteção ao DM1, promovendo efeitos sinérgicos ou antagonistas de acordo com o haplotipo (SHE, 1996). A Tabela I ilustra as contribuições dos genes DR e DQ na susceptibilidade ao DM1.

Em caucasiano, os indivíduos heterozigotos HLA-DR3/DR4 apresentam risco relativo mais elevado para o desenvolvimento da doença. Em contraste, o antígeno HLA-DR2 e mais fracamente o HLA-DR5 são raramente encontrados entre os pacientes com DM1, estando associados com resistência ao desenvolvimento da doença (NEPOM, 1990). Em japoneses os antígenos HLA-DR4 e HLA-DR9 são os mais freqüentes (RONNINGEN et al., 1992; THORSBY & RONNINGEN, 1993). No final da década de 80, foi verificado que os haplotipos HLA-DR/DQ que conferiam susceptibilidade à doença tinham características peculiares, sendo que o haplotipo HLA-DR4/DQ 3.2, estava associado ao desenvolvimento da doença e o HLA-DR4/DQ3.1 não estava (NEPOM & ERLICH, 1991). A diferença entre os genes HLA-DQ 3.2 (susceptibilidade) e o DQ 3.1 (resistência) está localizada em uma seqüência de nucleotídeos, correspondente ao primeiro domínio polimórfico da molécula DQ β , onde existem apenas quatro códons responsáveis pela síntese de

amino ácidos presentes no sulco de ligação da molécula HLA. Um desses códon, localizado na posição 57 nos alelos de resistência, apresenta o resíduo ácido aspártico. Nos alelos de susceptibilidade esse amino-ácido não é encontrado na posição 57, sendo sugerido que a presença de um resíduo diferente dele nessa posição estaria correlacionada com susceptibilidade à doença. No entanto, em japoneses a molécula HLA-DQ que confere susceptibilidade ao diabetes apresenta ácido aspártico na posição 57 (NEPOM, 1995). Estudos utilizando embriões de camundongos NOD mostram que a introdução de genes I-A α/β ou A β , que codificam o ácido aspártico na posição 57 da cadeia β da molécula de classe II, diminui ou impede o desenvolvimento da doença nesses camundongos transgênicos (QUARTEY-PAPAFIO et al., 1995). Atualmente, parece claro que a susceptibilidade à doença é muito complexa e envolve a combinação de diferentes alelos de classe II. A figura 3 ilustra essas combinações e seus efeitos na susceptibilidade ou resistência ao DM1.

Em caucasianos, a susceptibilidade ao DM1 está associada com os haplotipos HLA-DRB1*03-DQA1*0501-DQB1*0201 e HLA-DRB1*04-DQA1*0301-DQB1*0302, enquanto que o haplotipo HLA-DRB1*1501-DQA1*0102-DQB1*0602 está fortemente associado com proteção contra o desenvolvimento da doença (BOITARD et al., 1997). Em estudos realizados em pacientes brasileiros com DM1, da região Nordeste do Estado de São Paulo, as especificidades HLA-DR3 DR4 e HLA DQB1*0302 também conferem susceptibilidade ao desenvolvimento da doença (EIZIRIK et al., 1987; LOUZADA-Jr et al., 1996).

Tabela I- Exemplos de haplotipos HLA-DR/DQ que conferem susceptibilidade ou proteção ao DM1.

Efeito	DRB1	DQa/b	DQA1	DQB1	DQB1-57
Altamente	0405	0301/0201	0301	0201	Ala
Susceptível	0402	0301/0302		0302	Ala
Susceptível	0401	0301/0604		0604	Val
		0301		0501	Val
				0502	Ser
Fracamente	0404	0301/0303	0501		
susceptível	1,8	0501/0201			
	9	0501/0302			
Fracamente	7			0303	Asp
protetor	12			0503	
	15			0601	
	16			0603	
Protetor	11			0301	Asp
	13			0401	
	14			0402	
Altamente	0403	Todos/0602		0602	Asp
protetor	0406				
	0408				

DRB1	DQA1	DQB1	RR
0403	0301	0302	0,7
0406	0301	0302	0,2
0405	0301	0302	34
0405	0301	0301	2,1
0405	0301	0401	2,5
0401	0301	0302	3,0
0301	0501	0201	7,7
0901	0301	0303	1,2
1201	0501	0301	0,2
13	01	0601	0,1
15	01	0602	0,4

Figura 3- Haplotipos de classe II e os efeitos sinérgicos e antagonistas dos genes DR e DQ na determinação da susceptibilidade ou proteção ao DMID. Alelos altamente susceptíveis (rosa), susceptíveis (cinza), fracamente susceptíveis (amarelo), fracamente protetor (azul claro), protetor (azul escuro) e altamente protetor (verde). RR-risco relativo.

I-4- PAPEL DAS MOLÉCULAS DO COMPLEXO PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDADE NA PATOGENIA DO DIABETES MELLITUS DO TIPO 1.

Os mecanismos pelos quais as moléculas de histocompatibilidade contribuem para o desenvolvimento da doença não estão completamente elucidados. Estudos em camundongos NOD transgênicos, que não expressam as moléculas do CPH de classe I, têm mostrado que as células T restritas ao CPH de classe I, presumivelmente as células T CD8⁺, são necessárias para o desenvolvimento da insulinite (WICKER et al., 1995). No entanto, a associação mais forte entre DM1 com o genótipo do CPH são com as moléculas e alelos HLA de classe II. Estudos experimentais têm mostrado que o diabetes pode ser transferido de um animal para outro por intermédio de células T CD4 positivas auto-reativas, indicando a forte associação com as moléculas de classe II, responsáveis pela apresentação de peptídeos potencialmente diabetogênicos às células CD4⁺ (HASKINS & MCDUFFIE, 1990). Assim, tem sido postulado que as moléculas do CPH de classe II de indivíduos susceptíveis apresentam os auto-antígenos às células CD4 positivas, com padrão inflamatório do tipo Th1, produzindo a destruição das células β pancreáticas (TISCH &

MCDEVITT, 1996). Por outro lado, indivíduos portadores de genes de resistência ao desenvolvimento da doença, na presença de peptídeos potencialmente diabetogênicos, podem desenvolver um padrão de resposta do tipo Th2 a esses auto-antígenos, produzindo IL-4, IL-10 e talvez TGF- β , impedindo a destruição das ilhotas (MCDEVITT, 1998).

Os mecanismos pelos quais o polimorfismo das moléculas do CPH de classe II, em indivíduos susceptíveis ou em resistentes, promovem seus efeitos produzindo ou impedindo o aparecimento da doença também não estão elucidados. Existem algumas evidências que sustentam o conceito de que moléculas de susceptibilidade e de resistência se ligam e apresentam peptídeos diferentes das ilhotas pancreáticas. Moléculas HLA-DRB1*0405 purificadas (apresentando serina na posição 57) se ligam a peptídeos que expressam predominantemente ácido aspártico ou ácido glutâmico na posição p9, ao passo que moléculas HLA-DRB1*0401 purificadas (apresentando resíduo de ácido aspártico na posição 57) se ligam a peptídeos contendo alanina ou glutamina na posição p9 (RAMMENSEE et al., 1995). As moléculas HLA-DQB1*0302 e DQB1*0301 são idênticas em suas seqüências exceto na posição 57 da cadeia β , a primeira possui resíduo de alanina e a segunda resíduo de ácido aspártico. Essas moléculas apresentam uma marcante diferença para se ligarem a peptídeos com cargas negativas ou positivas nas suas porções carboxi terminais (KWOK et al., 1996). Além disso, outros mecanismos também têm sido postulados como por exemplo a existência de competição entre peptídeos diabetogênicos críticos e moléculas de susceptibilidade ou de resistência. Assim, pode existir uma hierarquia na associação do peptídeo com a molécula HLA. Moléculas que conferem resistência se ligam com maior afinidade ao peptídeo diabetogênico do que aquelas que conferem susceptibilidade (NEPOM, 1990).

Se o perfil fenotípico das células envolvidas na fase aguda ou crônica da doença ou, a densidade de expressão de moléculas do CPH nessas células têm relevância na patogenia do DM1 são questões ainda não completamente esclarecidas. Tem sido descrito que a densidade de expressão de moléculas do CPH nas células apresentadoras de antígenos pode influir no desenvolvimento de uma resposta imune (PFEIFFER et al., 1995). No entanto, pouco se sabe sobre as conseqüências da

alteração da quantidade dessas moléculas nas células que participam dos processos iniciais da resposta auto-imune no diabetes ou em outras doenças auto-imunes.

II- OBJETIVOS

O objetivo deste estudo foi avaliar o número de células expressando as moléculas de histocompatibilidade de classe I e II (HLA-DR, -DQ) nas células do sistema imune que participam do processo patogênico do DIABETES MELLITUS DO TIPO 1 (DM1), como os linfócitos T $CD3^+$, $CD4^+$, $CD8^+$, linfócitos B e monócitos em pacientes recentemente diagnosticados, comparando com indivíduos saudáveis, pareados de acordo com idade, sexo e raça, buscando o entendimento do papel destas moléculas, nessas células, durante os mecanismos iniciais da patogenia auto-imune dessa doença. Além disso, foi investigado o papel dos alelos HLA de susceptibilidade.

Uma vez que é muito difícil avaliar *in situ* as alterações imunológicas que estão ocorrendo nas células β do pâncreas humano na fase aguda da doença, neste estudo investigamos o número e a densidade de expressão das moléculas de histocompatibilidade em diversas populações linfomonocitárias no sangue periférico de pacientes portadores de DM1, recentemente diagnosticados.

Assim, os **objetivos** deste estudo incluíram as seguintes avaliações:

- a) Determinar o número de células T $CD3^+$, $CD4^+$, $CD8^+$ linfócitos B e monócitos expressando as moléculas de histocompatibilidade de classe I e II (HLA-DR e -DQ) nas suas superfícies;
- b) Determinar a densidade de expressão das moléculas de classe I e II em cada uma das populações linfomonocitárias estudadas;
- c) Tipificar os alelos HLA-DRB1, -DQA1 e -DQB1;
- d) Correlacionar a expressão dessas moléculas com os alelos HLA de susceptibilidade nos pacientes.

III-CASUÍSTICA E MÉTODOS

III-1-POPULAÇÃO DE ESTUDO

III-1.1-Pacientes:

Foram avaliados 20 pacientes portadores de DM1, recém-diagnosticados, com tempo de diagnóstico da doença entre 1-13 meses (média: 4,9 meses), sendo 12 do sexo masculino e 8 do sexo feminino, incluídos na faixa etária entre 1 a 37 anos de idade (média: 9 anos). Embora seja difícil a caracterização clínica da fase aguda da doença, período em que as alterações imunológicas sejam mais marcantes, os pacientes recém-diagnosticados estão, presumivelmente, nessa fase ou próximo dela. Os pacientes eram estudados somente após a compensação bioquímica da doença, isto é, na ausência de cetoacidose ou hiperglicemia. Em adição, os pacientes estavam compensados em relação à glicosúria fracionada e à hemoglobina glicosilada. Os pacientes eram selecionados nos Ambulatórios de Endocrinologia Infantil e do Adulto do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo HC-FMRP/USP. A Tabela II sumaria os principais dados clínicos e laboratoriais desses pacientes.

III-1.2-Controles:

Foram estudados 20 indivíduos normais, pareados aos pacientes em termos de sexo raça e idade, procedentes do mesma região geográfica dos pacientes e oriundos dos Ambulatórios de Cirurgia Urológica do HC-FMRP/USP, onde eram triados para realização de procedimentos eletivos como fimose, hipospádia etc., ou então, das Unidades Básicas de Saúde do Ipiranga e do Sumarezinho da cidade de Ribeirão Preto, locais onde eram seguidos para realização de puericultura. A Tabela II sumaria as características demográficas desses indivíduos.

O protocolo do estudo foi aprovado pelas Comissões de Ética Médica do HC-FMRP/USP e da Unidade Básica e Distrital de Saúde do Sumarezinho.

Tabela II – Caracterização dos pacientes portadores de DIABETES MELLITUS DO TIPO 1, segundo sexo, idade, tempo de diagnóstico da doença e níveis glicêmicos, por ocasião da realização do estudo. As características demográficas dos indivíduos controle estão também representadas.

Pacientes	Sexo	Idade (anos)	Tempo (meses)	Glicemia (mg/dL)	Controles	Sexo	Idade (anos)
ABARM	Fem	10	06	64.0	PMP	Fem	10
GV	Fem	01	04	100.6	MSO	Fem	01
LL	Fem	11	05	78.9	MRP	Fem	03
TACC	Mas	11	07	104.0	AF	Mas	11
DSM	Fem	11	02	70.0	PMP	Fem	12
CCS	Mas	11	02	38.0	ARSF	Mas	11
NCR	Fem	10	04	126.0	NCP	Fem	10
CAS	Mas	02	05	63.0	GVAA	Mas	03
GTLB	Mas	02	07	71.0	ASM	Mas	02
GHGO	Mas	05	13	89.0	DP	Mas	04
PML	Mas	24	04	95.0	ED	Mas	24
WBPS	Mas	03	03	121.0	JJSB	Mas	03
DK	Fem	37	09	88.0	MLGS	Fem	35
TRA	Fem	01	10	82.3	ICBF	Fem	01
LFF	Fem	02	04	49.7	RPM	Fem	01
JP	Mas	04	01	37.0	TASA	Mas	04
DCC	Mas	10	01	99.8	RES	Mas	10
MNM	Mas	20	02	112.0	DDO	Mas	18
LDO	Mas	10	05	100.0	EMPL	Mas	11
LBLZ	Mas	02	04	86.2	SJGS	Mas	03
Variação Mín-Máx		01-37	01-13				01-35
(média)		(09)	(4,9)				(8,9)

III-2- COLHEITA DE SANGUE

Foram colhidos 20 mL de sangue venoso periférico de cada indivíduo. Essas amostras eram subdivididas em 2 alíquotas. A primeira, colhida em tubos Vacutainer (Beckton & Dickinson, USA) contendo EDTA K3 (0.054mL/tubo), era utilizada para a realização de hemograma e extração de DNA para tipagem dos genes do MHC de classe II, DRB1, DQA1 e DQB1. A segunda, também colhida em tubos Vacutainer (Beckton & Dickinson, USA), contendo 72 unidades de U.S.P de heparina sódica/tubo, era utilizada para obtenção das células mononucleares para realização dos estudos de citometria de fluxo.

III-3- CITOMETRIA DE FLUXO

III-3.1- Marcação de células para análise em citometria de fluxo.

Para a avaliação da porcentagem das células $CD3^+$, $CD4^+$, $CD8^+$, $CD19^+$ e $CD14^+$ e da densidade de expressão das moléculas HLA de classe I ou II (HLA-DR ou -DQ) nas superfícies dessas células, 100 μ L de sangue total heparinizado, contendo 10% de soro de coelho inativado, eram incubados simultaneamente com dois anticorpos monoclonais conjugados a diferentes fluorocromos. Assim, as células foram incubadas com 5 μ L do anticorpo IgG1,k anti-HLA-A, B e C (classe I) humano, conjugado ao isotiocianato de fluoresceína (*fluorescein isothiocyanate*-FITC; Pharmingen, San Diego CA,USA) ou anti-HLA-DR ou anti-HLA-DQ (classe II), conjugados também ao FITC (Becton Dickinson, CA-USA) e, simultaneamente, com 5 μ L de um dos seguintes anticorpos monoclonais: IgG1,k anti-CD3; anti-CD4; anti-CD8, anti-CD19; anti-CD14 humanos, conjugados à ficoeritrina (*phycoerythrin*-PE; Beckton Dickinson, CA,USA), conforme ilustrado nas Tabelas III e IV.

Após incubação do sangue total por 20 minutos, no escuro, a 4°C, as hemácias eram lisadas, utilizando-se 2mL da solução de lise fornecida pelo fabricante Beckton Dickinson (CA, USA), diluída 1:10 em água bidestilada. Após 5 minutos, era acrescentada uma solução salina tamponada por fosfato (PBS), contendo 0,1% de azida sódica e 2% de soro bovino fetal (GIBCO-BRL). A seguir, a

preparação era centrifugada a 258xg por 5 minutos. O sobrenadante era desprezado e o botão celular remanescente, contendo as células Infomonocitárias, era fixado em PBS acrescido de formol a 1%. Após um período não superior a 12 horas, era realizada a leitura da fluorescência no aparelho de citometria de fluxo do tipo FACSorting (Beckton Dickinson, CA, EUA). Os controles negativos eram realizados de forma similar, destacando-se o uso de um anticorpo irrelevante da mesma classe de imunoglobulina que os anticorpos monoclonais utilizados, conjugados aos respectivos fluorocromos (γ 1: IgG1-FITC e γ 2: IgG2a-PE).

Tabela III. Combinações de anticorpos monoclonais empregados para identificação das moléculas HLA de classe I em monócitos e em diferentes populações linfocíticas, assim como a combinação de anticorpos irrelevantes utilizados como controles.

Conjugação dos anticorpos aos fluorocromos	
FITC (isotiocianato de fluoresceína)	PE (ficoeritrina)
HLA classe I	CD3
HLA classe I	CD4
HLA classe I	CD8
HLA classe I	CD19
HLA classe I	CD14
$\gamma 1$	$\gamma 2$

Tabela IV- Combinações dos anticorpos monoclonais empregados para identificação das moléculas HLA de classe II em diferentes populações linfomonocíticas e dos anticorpos monoclonais irrelevantes utilizados como controles ($\gamma 1$ e $\gamma 2$).

Conjugação dos anticorpos aos fluorocromos	
FITC (isotiocianato de fluoresceína)	PE (ficoeritrina)
HLA-DR	CD3
HLA-DR	CD4
HLA-DR	CD8
HLA-DR	CD19
HLA-DR	CD14
HLA-DQ	CD3
HLA-DQ	CD4
HLA-DQ	CD8
HLA-DQ	CD19
HLA-DQ	CD14
$\gamma 1$	$\gamma 2$

III-3.2- Avaliação das populações celulares por citometria de fluxo.

Para cada um dos tubos contendo as células marcadas, foram adquiridos 10^4 eventos. Além das diferenças morfológicas caracterizada pelo tamanho e granularidade celular, cada célula era detectada a partir dos antígenos (moléculas) de superfície revelados pelos anticorpos específicos marcados com fluorocromos, em FACSoring (Figura 4). A análise das células foi realizada com auxílio do programa Cell quest (Beckton Dickinson, EUA).

A escolha dos quadrantes e marcadores negativos era realizada, utilizando-se as mesmas células a serem analisadas, pré-incubadas com anticorpos monoclonais irrelevantes, isto é, anticorpos do mesmo isotipo que os específicos em questão e também conjugados aos mesmos fluorocromos (Tabelas III e IV). Os parâmetros de calibração do aparelho para análise das populações celulares e aquisição dos eventos eram ajustados com esferas de látex (“beads”) conjugadas aos fluorocromos estudados, com auxílio do programa Auto Comp (Beckton Dickinson, USA).

III-3.3- Análise do número de células mononucleares, expressando as moléculas de histocompatibilidade de classe I ou II e a determinação da densidade de expressão dessas moléculas.

A partir da dupla marcação, por exemplo $CD3^+$ /HLA classe I⁺, calculamos a porcentagem de células apresentando, simultaneamente, esses marcadores. Essa porcentagem era determinada por meio de um “Dot Plot”, tendo-se o cuidado de subtrair os valores obtidos pela marcação inespecífica, obtida com o uso de anticorpos irrelevantes. O número absoluto das células duplamente positivas era calculado, multiplicando-se o número relativo (%) dessas células pelo número total de linfócitos do sangue periférico, conseguido pelo hemograma. A Figura 4 ilustra um resultado representativo dessa dupla marcação.

Para avaliarmos a densidade de expressão das moléculas de classe I ou II nos diferentes tipos celulares estudados, a mediana da intensidade de fluorescência das moléculas HLA de classe I ou II, determinada pelo histograma, era subtraída da

mediana da intensidade de fluorescência inespecífica, isto é, a intensidade obtida pela marcação com anticorpos irrelevantes.

Figura 4- Ilustração, por meio de “Dot Plot”, da porcentagem de células duplo positivas expressando simultaneamente as moléculas CD3 e HLA classe I.

III-4- TIPAGEM DOS ALELOS HLA-DRB1, -DQA1 E -DQB1.

III-4.1- Extração do DNA

O DNA foi extraído por "salting out" a partir das células do sangue periférico, utilizando-se o procedimento descrito por MILLER et al., (1988). Resumidamente, cerca de 10 mL do sangue total era transferido para um tubo de polipropileno de 50 mL, sendo adicionado 4 volumes de tampão de lise de glóbulos vermelhos (sacarose 3 M, TRIS-HCl 10mM, MgCl 5mM e TRITON X100 a 1%). A solução era homogeneizada por inversão e centrifugada a 2400xg, por 5 minutos, à 4° C. O sobrenadante era cuidadosamente desprezado e ao precipitado era adicionado 5 mL de tampão de lise de glóbulos brancos (NaCl 0,075 M, Na-EDTA 0,024 M, Na ClO₄H₂O 25 mM e SDS a 2,5%). A preparação era agitada vigorosamente por 10 segundos à temperatura ambiente. Para a extração de proteínas, foi adicionado 20

mM de NaCl, agitando-se os tubos vigorosamente por 15 segundos. Após a centrifugação a 1500xg por 5 minutos à temperatura ambiente, o sobrenadante era recolhido em um tubo de polipropileno de 50 mL e adicionados 7 mL de isopropanol absoluto, misturando-se cuidadosamente. A precipitação do DNA ocorria por inversão manual lenta. O DNA precipitado era retirado com auxílio de uma pipeta Pasteur selada, sendo retirado o excesso de isopropanol. O DNA era lavado duas vezes em 3 mL de etanol a 70% e redissolvido em 100 a 300 µL de água bidestilada desionizada e esterelizada (H₂O_{dd}). O DNA era quantificado por espectrofotometria em 260 e 280 nm. O grau de pureza do DNA extraído era calculado pela razão entre a absorvância obtida em 260 e 280 nm (A₂₆₀:A₂₈₀), sendo considerada adequada entre os valores 1,6 a 2,0. Quando os valores dessa razão eram inferiores a 1,5, o DNA era reprecipitado com álcool isopropílico. Finalmente, a concentração do DNA era ajustada para 0,5 a 1,0 µg/L com H₂O_{dd}.

III-4.2- Amplificação do DNA

As tipagens dos alelos de classe II HLA-DRB, -DQB e -DQA eram realizadas por intermédio da hibridação de DNA amplificado pela reação de polimerização em cadeia (Polymerase Chain Reaction-PCR) com iniciadores (“primers”) sequência específicos (SSP-Sequence Specific Primers), de acordo com o procedimento descrito por OLERUP & ZETERQUIST (1992), utilizando-se kits comerciais preparados pelo Grupo Colaborativo de Transplantes (Ruprecht-Karls-Universitat, Heidelberg, Germany)

Para as tipagens dos grupos de alelos de classe II HLA-DRB e -DQB, cerca de 1-2 µL de DNA (0,5-1,0µg/µL), a ser amplificado, era adicionado a 17 µL de soluções previamente preparadas pelo fornecedor, contendo os pares de “primers” específicos, as bases nitrogenadas, o tampão da enzima Taq-polimerase e o MgCl₂ 50mM. A enzima Taq-polimerase (1U/ reação; Pharmacia, Suécia) era imediatamente adicionada antes de se colocar a preparação no termociclador. Para as tipagens dos alelos HLA-DQA, era adicionado para cada reação 10µL das misturas de “primers”, também previamente preparados pelo fornecedor, contendo os pares de “primers” alelo-específicos, as bases nitrogenadas e o MgCl₂ 50mM. A seguir, eram

adicionados imediatamente 2 μ L de solução contendo tampão da enzima Taq-polimerase (1,6 μ L), Taq-polimerase (0,4U), H₂Odd (2,5 μ L) e DNA (0,1 μ g). Como controle negativo, em todas essas reações, eram utilizados todos os reagentes acima, exceto o DNA. A reação era realizada utilizando o termociclador PE-9600 (Perkin-Elmer-CA, USA). Inicialmente a amostra era aquecida a 94° C por 30 segundos (DRB e DQB) ou por 160 segundos (DQA), para promover a desnaturação do DNA, ou seja, separação das fitas complementares. A seguir, a temperatura era resfriada a 55° C por um minuto (DRB e DQB) ou a 65° C por um minuto (DQA). Nessa etapa, os “primers”, um par de oligonucleotídeos complementares às extremidades do trecho de DNA a ser amplificado, anelavam-se às respectivas extremidades das fitas despareadas de DNA. Finalmente, a temperatura era aquecida a 72° C, por um minuto, quando a Taq-polimerase acrescentava os nucleotídeos em sequência aos “primers”, formando uma fita complementar, nos moldes das duas originais e completando um ciclo. Foram realizados 30 ciclos de amplificação.

Aos produtos de amplificação eram adicionados 2 μ L de tampão (tris HCl 50mM, pH=7,6; Na-EDTA 80mM, SDS 0,5%, sacarose 50% e azul de bromofenol 0,1%), para posterior discriminação dos fragmentos de amplificação em géis de agarose

III-4.3- Identificação dos produtos de amplificação em géis de agarose

Os produtos de amplificação eram separados por eletroforese, em gel contendo agarose a 2% em tampão 5xTAE (tris HCl 10mM, pH=7,5, Na-EDTA, 1,0mM, pH=8,0). A agarose era dissolvida por ebulição e resfriada até 60°C, com adição de 1% de brometo de etídio. O gel permanecia em repouso por uma hora à temperatura ambiente. Após a solidificação e remoção dos pentes o gel era colocado na cuba de eletroforese (Pharmacia-GNA200-Suécia), com o nível da solução tampão (5x TAE) de 2 a 3 mm acima da superfície do gel. Os produtos da amplificação eram aplicados sempre na mesma ordem padronizada, o controle negativo era colocado por último. A eletroforese era realizada por 15 a 25 minutos, a 170 V (aproximadamente 0,4 V/ cm²). Após esse período, o gel era colocado em

transiluminador UV (312nm-Hybaid-USA) e fotografado para documentação e interpretação.

A tipagem HLA-DRB pelo método SSP-PCR foi realizada por intermédio de 22 reações de amplificação por indivíduo, sendo 18 reações para DRB1(DRB1*01-*10), 3 reações para os grupos de alelos DRB5, DRB3 e DRB4 e uma reação controle negativo. Na Tabela V estão descritas as especificidades e tamanhos dos “primers” utilizados para essas tipagens.

Para as tipagens dos alelos HLA-DQA, foram realizadas 13 reações de amplificações por indivíduo, sendo 12 reações para DQA1 e uma como controle negativo. A Tabela VI discrimina na essas especificidades e os tamanhos dos “primers” para os alelos DQA1.

Na tipagem HLA-DQB, foram realizadas 10 reações de amplificação por indivíduo, sendo 9 reações para determinar DQB1(DQB1*05, *06, *02, *03 e *04) e uma reação controle negativo. As especificidades e tamanho dos “primers” para os alelos DQB1 são ilustradas na Tabela VII.

Tabela V- Identificação dos iniciadores para tipagem dos alelos HLA-DRB1, DRB3, DRB4, DRB5 pelo método SSP-PCR, dos tamanhos dos respectivos produtos de amplificação e dos alelos ou grupos de alelos amplificados.

“PRIMERS”	ESPECIFICIDADES IDENTIFICADAS	TAMANHOS (PARES DE BASE-pb)
1.1	DRB1*0101-*0102	195
1.2	DRB1*0103	196
15	DRB1*1501-*1503	197
16	DRB1*1601-*1602	213
3	DRB1*0301-*0303	151
17	DRB1*0301	217
18	DRB1*0302-*1302-*1305-*1402-*1403-*1409	189
4	DRB1*0401-*0412-*1410	260
7	DRB1*0701-*0702	232
8	DRB1*0801-*0805	161 ou 163
9	DRB1*0901	236
10	DRB1*1001	204
11	DRB1*1101-*1104	176
12	DRB1*1201-*1202	248
13.1	DRB1*1301-*1302-*1306	171
13.2	DRB1*1303-*1304	171
14.1	DRB1*1401-*1404-*1405-*1407-*1408	224 ou 215
14.2	DRB1*1402-*1403-*1406-*1409	140
51	DRB5*0101-*0202	200 ou 207
52	DRB3*0101-*0301	171 ou 173
53	DRB4*0101	213

Tabela VI- Identificação dos iniciadores para tipagem dos alelos HLA-DQA pelo método SSP-PCR, dos tamanhos dos respectivos produtos de amplificação e dos alelos ou grupos de alelos amplificados.

“PRIMERS”	ESPECIFICIDADES IDENTIFICADAS	TAMANHOS (PARES DE BASE-pb)
A1.1	DQA1*0101, *0104, *0105	153
A1.3	DQA1*0101, *0103	152
A1.4	DQA1*0101, *0102, *0104, *0105	172
A1.5	DQA1*0103	172
A1.6	DQA1*0104, *0105	193
AAE4	Todos exceto DQA1*0104, *0105	192
A2.1	DQA1*0201	106
A3B	DQA1*0301, *0302, 0303,	111
A4.1	DQA1*0401	171
A5.3	DQA1*05011, *0503, (*05012,*0502,*0504?)	234
A5.4	DQA1*05013, (*05012,*0502,*0504?)	235
A6.1	DQA1*0601	172

Tabela VII- Identificação dos iniciadores para tipagem dos alelos HLA-DQB pelo método SSP-PCR, dos tamanhos dos respectivos produtos de amplificação e dos alelos ou grupos de alelos amplificados.

“PRIMERS”	ESPECIFICIDADES IDENTIFICADAS	TAMANHOS (PARES DE BASE-pb)
5	DQB1*0501-*0504	215
6.1	DQB1*0601	215
6.2	DQB1*0602-*0603	148
6.3	DQB1*0604-*0606	209
2	DQB1*0201	157
7	DQB1*0301-*0304	206
8	DQB1*0302	123
9	DQB1*0303	127
4	DQB1*0401-*0402	204

III-4.4- Interpretação dos resultados

Para cada reação DRB1 e DQB1, havia um par de “primers”, contendo um controle interno positivo não alélico, amplificando o terceiro íntron do gene DRB1, cuja concentração era cinco vezes menor do que os “primers” específicos. Esse “primer” produzia um produto de amplificação de 796pb, em todos os tubos em que a amplificação dos alelos HLA-DRB ou HLA-DQB não ocorria. Para as reações dos alelos DQA1, o controle interno positivo para todas as reações era um par de “primers” amplificando um fragmento não alélico, com tamanho de 440pb, do gene da proteína C reativa. Quando um produto de amplificação estava presente (e controle interno ausente), considerava-se a presença do alelo específico. O tamanho do fragmento dos produtos específicos era desprezado, pois a interpretação era meramente baseada na presença ou ausência da amplificação do alelo ou grupo específico. A Figura 5 ilustra um exemplo de interpretação dos alelos HLA-DRB.

Figura 5- Amplificação dos alelos HLA-DRB, exemplificando as tipagens de alguns alelos ou grupos de alelos.

DR1.1	DR1.1	DR1.1
DR1.2	DR1.2	DR1.2
DR15	DR15	DR15
DR16	DR16	DR16
DR3	DR3	DR3
DR17	DR17	DR17
DR18	DR18	DR18
DR4	DR4	DR4
DR7	DR7	DR7
DR8	DR8	DR8
DR9	DR9	DR9
DR10	DR10	DR10
DR11	DR11	DR11
DR12	DR12	DR12
DR13.1	DR13.1	DR13.1
DR13.2	DR13.2	DR13.2
DR14.1	DR14.1	DR14.1
DR14.2	DR14.2	DR14.2
DR51	DR51	DR51
DR52	DR52	DR52
DR53	DR53	DR53
Controle negativo	Controle negativo	Controle negativo

DRB1*0301

DRB1*04

DRB3*0101/0301

DRB4*0101

DRB1*0101/*0102

DRB1*16

DRB5*0101/0202

DRB1*0701/*0702

DRB1*11

DRB3*0101/*0301

DRB4*0101

III-5- ANÁLISE ESTATÍSTICA

Considerando-se a natureza e as distribuições não-Gaussianas das variáveis estudadas, foram utilizados procedimentos não paramétricos, optando-se pelo teste de Mann-Whitney. Assim, para cada grupo de variáveis estudadas era realizada uma análise descritiva, na qual eram calculadas as medianas (SIEGEL,1975).

As comparações das frequências dos grupos de alelos entre pacientes e controles foi realizada utilizando-se o teste exato de Fisher.

Para todos os testes utilizados, a hipótese de nulidade foi rejeitada, quando a possibilidade de ocorrência casual das diferenças observadas não excedia 5%.

IV- RESULTADOS

IV-1- EXPRESSÃO DE MOLÉCULAS DE HISTOCOMPATIBILIDADE DE CLASSE II, HLA-DR E HLA-DQ, E DE CLASSE I, HLA-A,-B,-C, EM DIFERENTES POPULAÇÕES LINFOMONOCÍTICAS.

IV-1.1-LINFÓCITOS T

IV-1.1.1-Linfócitos T CD3⁺

As comparações entre as porcentagens de células e os números absolutos dos linfócitos T CD3⁺ que expressam as moléculas de histocompatibilidade de classe II, HLA-DQ ou HLA-DR (Figura 6), ou as moléculas de histocompatibilidade de classe I, HLA-A,-B,-C (Figura 7), não mostraram diferenças significantes entre os pacientes com diabetes e os controles.

Em relação à densidade de expressão das moléculas HLA-DQ e -DR, não foram observadas diferenças significantes entre os pacientes e controles (Figura 8). Por outro lado, a densidade de expressão das moléculas HLA-A,-B,-C estava significativamente aumentada no grupo de pacientes ($p=0.01$) quando comparada àquela do grupo controle (Figura 9).

IV-1.1.2-Linfócitos T CD4⁺

Em relação aos controles, os linfócitos T CD4⁺ coexpressando as moléculas HLA-DQ de pacientes com DM1, apresentaram valores significativamente menores, tanto quanto expressos em porcentagem ($p=0.01$) ou em número absoluto de células ($p=0.03$) (Figura 10). Entretanto, nenhuma diferença foi observada quando os números absolutos e as porcentagens de células T CD4⁺ de pacientes expressando simultaneamente as moléculas HLA-DR ou -A,-B,-C eram comparados aos controles (Figura 11).

A densidade de expressão das moléculas de histocompatibilidade expressas na superfície dos linfócitos T CD4⁺ de pacientes e controles diferiram apenas em relação às de classe I, HLA-A,-B,-C, sendo que os pacientes apresentaram densidade

de expressão significativamente maior do que a observada no grupo controle ($p=0.03$) (Figura 12). Contudo, a densidade de expressão das moléculas HLA-DQ e -DR nas células $CD4^+$ não mostraram diferenças significantes entre os pacientes e os controles (Figura 13).

IV-1.1.3-Linfócitos T $CD8^+$

A porcentagem celular e o número absoluto de linfócitos T $CD8^+$, expressando as moléculas de histocompatibilidade de classe II, HLA-DQ ou -DR (Figura 14), ou as moléculas de classe I, HLA-A,-B,-C (Figura 15), não mostraram diferenças significantes entre os grupos de pacientes e controles.

A densidade de expressão das moléculas HLA-DQ ou -DR em linfócitos T $CD8^+$ não diferiu significativamente entre os grupos de pacientes e controles (Figura 16). Houve uma diferença significativa na densidade de expressão das moléculas HLA-A,-B,-C entre pacientes e controles ($p=0.04$), mostrando que os pacientes apresentam densidade de expressão significativamente maior do que os controles (Figura 17).

Figura 6- Porcentagem celular e número absoluto de linfócitos T CD3⁺ expressando as moléculas HLA-DR ou -DQ, nos grupos de pacientes (n=20) e controles (n=20). Os traços horizontais indicam as medianas.

Figura 7- Porcentagem celular e número absoluto de células T totais ($CD3^{+}$) expressando as moléculas HLA-ABC, nos grupos de pacientes ($n=20$) e controles ($n=20$). Os traços horizontais indicam as medianas.

Figura 8 Densidade de expressão das moléculas HLA-DQ e -DR em linfócitos T totais ($CD3^+$) de pacientes ($n=20$) e controles ($n=20$). Os traços horizontais indicam as medianas.

Figura 9- Densidade de expressão das moléculas HLA-ABC nos linfócitos T totais ($CD3^+$) dos pacientes ($n=20$) e controles ($n=20$). Os traços horizontais indicam as medianas.

Figura 10- Porcentagem celular e número absoluto de linfócitos T $CD4^+$ coexpressando as moléculas HLA-DQ nos grupos de pacientes (n=20) e controles (n=20). Os traços horizontais indicam as medianas.

Figura 11- Porcentagem celular e número absoluto de células T CD4⁺ expressando as moléculas HLA-DR ou HLA-ABC nos grupos de pacientes (n=20) e controles (n=20). Os traços horizontais indicam as medianas.

Figura 12- Densidade de expressão das moléculas HLA-ABC em linfócitos T CD4⁺ de pacientes (n=20) e controles (n=20). Os traços horizontais indicam as medianas.

Figura13- Densidade de expressão das moléculas HLA-DQ ou -DR em linfócitos T $CD4^{+}$ de pacientes (n=20) e controles (n=20). Os traços horizontais indicam as medianas.

Figura 14- Porcentagem celular e número absoluto de linfócitos T CD8⁺ expressando as moléculas HLA-DQ ou -DR de pacientes (n=20) e controles (n=20). Os traços horizontais indicam as medianas.

Figura 15- Porcentagem celular e número absoluto de linfócitos T CD8⁺ expressando as moléculas HLA-ABC em pacientes (n=20) e controles (n=20). Os traços horizontais indicam as medianas.

Figura 16- Densidade de expressão das moléculas HLA-DQ ou -DR em linfócitos T CD8⁺ de pacientes (n=20) e controles (n=20). Os traços horizontais indicam as medianas.

Figura 17- Densidade de expressão das moléculas HLA-ABC em linfócitos T CD8⁺ de pacientes (n=20) e controles (n=20). Os traços horizontais indicam as medianas.

IV-1.2-LINFÓCITOS B

Os números relativos (%) e absolutos de linfócitos coexpressando as moléculas CD19⁺ e HLA-DR estavam significativamente maiores em pacientes quando comparados com os controles, $p=0,04$ e $p=0,05$ respectivamente (Figura 18). No entanto, com relação às moléculas HLA-DQ e -A,-B,-C, não observamos diferenças significantes entre esses dois grupos (Figura 19).

A densidade de expressão das moléculas HLA- DQ ou -DR (Figura 20) ou das moléculas HLA-A,-B,-C (Figura 21) em linfócitos B não diferiram significativamente entre os grupos de pacientes e controles.

Figura 18- Porcentagem e número absoluto de linfócitos B CD19⁺ expressando as moléculas HLA-DR em pacientes (n=20) e controles (n=20). Os traços horizontais indicam as medianas.

Figura 19- Porcentagem e número absoluto de linfócitos B CD19⁺ expressando as moléculas HLA-DQ ou -ABC em pacientes (n=20) e controles (n=20). Os traços horizontais indicam as medianas.

Figura 20- Densidade de expressão das moléculas HLA-DQ ou -DR nos linfócitos B CD19⁺ de pacientes (n=20) e controles (n=20). Os traços horizontais indicam as medianas.

Figura 21- Densidade de expressão das moléculas HLA-ABC em linfócitos B CD19⁺ de pacientes (n=20) e controles (n=20). Os traços horizontais indicam as medianas.

IV-1.3-MONÓCITOS

As porcentagens de monócitos de pacientes com diabetes, expressando as moléculas HLA-DR, -DQ ou -A,-B,-C não mostraram diferenças significantes quando comparadas aos controles (Figura 22).

Da mesma forma, a densidade de expressão das moléculas HLA-DQ, -DR (Figura 23) ou das moléculas HLA-ABC (Figura 24) observados em monócitos de pacientes não diferiram significativamente daquela observadas em controles, mas apesar de não estatisticamente significativa, houve uma diminuição da densidade de expressão das moléculas HLA-DQ em monócitos de pacientes em relação aos controles ($p=0,06$).

Figura 22- Porcentagem de monócitos expressando as moléculas HLA-DQ em pacientes (n=20) e controles (n=20). Os traços horizontais indicam as medianas.

Figura 23- Porcentagem de monócitos de pacientes (n=20) e controles (n=20) expressando as moléculas HLA-DR ou -ABC. Os traços horizontais indicam as medianas.

Figura 24- Densidade de expressão das moléculas HLA-DQ ou -DR nos monócitos de pacientes (n=20) e controles (n=20). Os traços horizontais indicam as medianas.

Figura 25- Densidade de expressão das moléculas HLA-ABC nos monócitos de pacientes (n=20) e controles (n=20). Os traços horizontais indicam as medianas.

IV-2- TIPAGENS DOS ALELOS DO COMPLEXO PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDADE DE CLASSE II, HLA-DRB1, -DQA1 e -DQB1.

As tipagens dos alelos HLA de classe II HLA-DRB1, HLA-DQA1 e HLA-DQB1, em pacientes portadores de Diabetes Mellitus do tipo 1 são mostradas nas Tabela VIII, e em controles estão apresentadas na Tabela IX.

Tabela VIII- Tipagem de alelos HLA-DRB1, -DQA1 e -DQB1 em pacientes portadores de DM1.

Paciente	HLA-DRB1	HLA-DRB3/4/5	HLA-DQA1	HLA-DQB1
ABARM	*07, *13	52,53	*0102	*0201
GV	*16, *0901	51, 53	*0103, *0201	*05
LL	*0301, *07	52, 53	*05	*0201
TACC	*04, *08	53	*0401	*0302, *04
DSM	*0301, *07	52, 53	*0102	*0201, *0302
CCS	*0301	52	*0102	*0201
NCR	*0301, *0901	52, 53	*0102, *05	*0201
CAS	*01, *11	52	*0101, *05013	*05
GTLB	*01, *04	53	*0102, *0401	*05, *0302
GHGO	*0301, *1001	52	*01, *05	*05, *0201
PML	*0301, *0302	51, 52	*0102	*0201
WBPS	NR		NR	NR
DK	*0301		*05	*0201
TRA	*01, *08		*0101, *0401	*05, *04
LFF	*04, *11	53	*03, *05013	*0302
JP	*0301, *07	52, 53	*0102	*0201
DCC	*0301, *07	52, 53	*0102	*0201, *0302
MNM	*07, *08	53	*0401	*03, *0302
LDO	*0301, *04	52, 53	*0102	*0201
LBLZ	*0301, *13	52	*0102, *05	*06, *0201

NR-não realizado

Tabela IX- Tipagem de alelos HLA-DRB1, DQA1 e DQB1 em indivíduos controle.

Controles	HLA-DRB1	DRB3/4/5	DQA1	DQB1
PMP	*0301, *11	52	*0201, *05	*05, *0201
MSO	*0301, *04	53	*05	*0302
MRP	*11, *14	51	*0101, *05013	*05, *03
AF	*07, *11	52, 53	*0201, *05013	*0201
PMP	*15, *14	51	*0102, *0401	*05, *0201
ARSF	*07, *13	52, 53	*0103, *0201	*06, *03
NCP	*01, *0301	52	*0101, *05	*05, *0201
GVAA	*15, *14	51	*0102, *05	*06
ASM	*11, *14	52	*0101, *05013	*05, *03
DP		53	*05013	*05, *03
ED	*0901	53	*0103, *03	*06, *0303
JJSB	*15, *11	51, 52	*0102, *05013	*03
MLGS	*11	52	*05013, *03	*03
ICBF	*15, *1302	51, 53	*0102, *05	*03, *0302
RPM	*15, *13	51, 52	*0102	*06
TASA	*0301, *13	52	*0103, *05	*03, *0302
RES	*04, *08, *12	53	*05013	*03, *0303
DDO	*01, *16, *07, *12	51, 53	*0101, *03	*05
EMPL	*15, *0301, *07	52, 53	*0102	*03, *0302
SJGS	*07, *0901	53	*0201, *03	*0302

IV-3- AVALIAÇÃO DAS MOLÉCULAS DE HISTOCOMPATIBILIDADE CONFORME OS ALELOS DE SUSCEPTIBILIDADE AO DIABETES

IV-3.1-Associações com os alelos HLA-DRB1*03

As comparações referentes às porcentagens e os números absolutos de células CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD19⁺ e CD14⁺, expressando as moléculas HLA-DR, em pacientes apresentando os alelos HLA-DRB1*03 (n=11) com aqueles sem esses alelos (n=9) não mostraram diferenças significantes. Igualmente, as comparações das densidades de expressão das moléculas HLA-DR nas populações celulares acima descritas, entre pacientes HLA-DRB1*03 positivos e negativos, não mostraram diferenças significantes.

IV-3.2-Associações com os alelos DRB1*04

O número absoluto de linfócitos T CD4⁺, expressando as moléculas HLA-DR, em pacientes positivos para os alelos HLA-DRB1*04 (n=4) foi significativamente maior (p=0.04) do que aquele observado em pacientes sem esses alelos (n=16). Por sua vez, o número absoluto das células CD3⁺, CD8⁺ e CD19⁺ coexpressando as moléculas HLA-DR, não mostrou diferenças entre os pacientes positivos ou negativos para esses alelos. Contudo, a porcentagem e a densidade de expressão da moléculas HLA-DR em células CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD19⁺ e CD14⁺ não mostraram diferenças significantes entre pacientes positivos ou negativos para os alelos HLA-DRB1*04.

IV-3.3-Associação com o alelo HLA-DQB1*0201

Pacientes que possuíam o alelo DQB1*0201 (n=12), quando comparados aos pacientes que não possuíam o alelo (n=08), apresentaram menor porcentagem de células CD3⁺ (p=0.05), CD4⁺ (p=0.01), CD8⁺ (p=0.03), CD19⁺ (p=0.005) e CD14⁺ (p=0.007) expressando as moléculas HLA-DQ. De modo similar, os pacientes DQB1*0201 positivos apresentaram menor número absoluto de células CD3⁺

($p=0.02$), $CD4^+$ ($p=0.002$), $CD8^+$ ($p=0.02$) e $CD19^+$ ($p=0.002$) expressando as moléculas HLA-DQ. Além disso, os pacientes DQB1*0201 positivos apresentaram menor densidade de expressão das moléculas HLA-DQ em células $CD19^+$ ($p=0.009$). Não foram detectadas diferenças significantes, quando a densidade de expressão das moléculas HLA-DQ em células $CD3^+$, $CD4^+$, $CD8^+$ e $CD14^+$ dos pacientes portadores do alelo DQB1*0201 foram comparadas com os pacientes que não apresentavam esse alelo.

IV-3.4- Associação com o alelo HLA-DQB1*0302

A porcentagem das células $CD14^+$ coexpressando a molécula HLA-DQ ($p=0.03$) e a densidade de expressão das moléculas HLA-DQ nessas células ($p=0.03$) eram significantemente maiores entre pacientes com alelo HLA-DQB1*0302 ($n=06$), em relação aos pacientes sem o alelo ($n=14$). Não houve diferença significativa entre pacientes portadores ou não do alelo DQB1*0302 em relação às porcentagens de células $CD3^+$, $CD4^+$, $CD8^+$ e $CD19^+$, expressando as moléculas HLA-DQ. De modo similar, a densidade de expressão das moléculas HLA-DQ nessas células não diferiu significantemente entre pacientes DQB1*0302 positivos e negativos. O número absoluto de células $CD19^+$ expressando as moléculas HLA-DQ foi significantemente maior ($p=0.04$) entre os pacientes com alelo HLA-DQB1*0302 do que em pacientes sem o alelo. O número absoluto de células $CD3^+$, $CD4^+$ e $CD8^+$ que expressavam a molécula HLA-DQ não diferiu entre os pacientes DQB1*0302 negativos ou positivos.

IV-3.5- Associações com os alelos HLA-DQA1*03 e -DQA1*05

As comparações da porcentagem, número absoluto e densidade de expressão das moléculas de histocompatibilidade HLA-DQ em células $CD3^+$, $CD4^+$, $CD8^+$, $CD19^+$ e $CD14^+$, entre pacientes positivos para os alelos DQA1*03 ou DQA1*05 com os pacientes negativos para esses alelos, não mostraram diferenças significantes.

V-DISSCUSSÃO

O diabetes mellitus tipo 1 é uma doença auto-imune órgão-específica, decorrente da destruição das células β pancreáticas produtoras de insulina, provocada pelas células do sistema imune, sendo possivelmente, os linfócitos T citotóxicos os principais efetores desse processo (TOGUN et al., 1997).

Embora intensamente estudados, os mecanismos auto-imunes responsáveis pela iniciação, progressão e destruição das células β ainda não estão completamente elucidados. A etiopatogenia tem sido considerada multifatorial, participando desse processo os fatores genéticos, imunológicos e ambientais (DAHLQUIST, 1998). Desses, os fatores genéticos têm merecido particular atenção, especialmente os marcadores de susceptibilidade IDDM1, localizados na região do Complexo Principal de Histocompatibilidade e que codificam as moléculas de susceptibilidade HLA-DRB1*03 e *04, DQB1*0201 e DQB1*0302 (SCHRANZ & LERNMARK, 1998). Dentre os fatores imunológicos, vários eventos contribuem para a destruição das células β pancreáticas, como os mecanismos celulares com a participação de linfócitos T $CD4^+$, os linfócitos T $CD8^+$, os linfócitos B, os macrófagos e as células dendríticas; os mecanismos humorais, com a participação de auto-anticorpos e das citocinas pró-inflamatórias, e ainda, a participação de moléculas de superfície celular como as coestimulatórias e as moléculas de histocompatibilidade de classe I e II (YOON et al., 1998).

Embora existam vários mecanismos propostos, o papel das moléculas de histocompatibilidade na susceptibilidade ao DM tipo 1 ainda não está totalmente esclarecido. Por outro lado, existem várias evidências de que o número de células apresentadoras de antígenos e a densidade de expressão das moléculas de histocompatibilidade nessas células podem influenciar o resultado da resposta imune. No entanto, pouco tem sido relatado acerca da densidade de expressão das moléculas de histocompatibilidade nas diversas populações no sangue periférico de pacientes com DM tipo 1. Assim, neste estudo, foram avaliadas as porcentagens de células linfomonocitárias coexpressando as moléculas de histocompatibilidade de classe I ou II e a densidade de expressão dessas moléculas em diversas populações linfomonocitárias. Finalmente, a intensidade de expressão dessas moléculas nas diversas populações celulares foi correlacionada com o perfil imunogenético dos pacientes com DM tipo 1.

Para atingir os objetivos propostos, foram estudados indivíduos com DM tipo 1 recentemente diagnosticados. Quando um paciente apresenta as manifestações clínicas do diabetes, uma grande quantidade das células β pancreáticas já foram destruídas, estando praticamente no final da fase aguda da doença. No entanto, os indivíduos estudados nessa fase, certamente, refletem mais fielmente os eventos etiopatogênicos iniciais da doença do que aqueles estudados na fase crônica. Além disso, os indivíduos com DM tipo 1, na fase aguda, período em que as células β estão sendo destruídas, não apresentam manifestações clínicas e dificilmente estariam disponíveis para esse tipo de estudo. Por outro lado, a idéia de se quantificar as moléculas de histocompatibilidade no sangue periférico ao invés de avaliá-las diretamente “in situ”, se deve, logicamente, às dificuldades de obtenção de células pancreáticas durante a fase ativa da doença. Apesar disso, as células do sangue periférico podem, de certa forma, refletir as alterações que estão ocorrendo no pâncreas.

Embora não tenhamos observado diferenças significantes dos números de células T $CD3^+$, $CD4^+$ e $CD8^+$ expressando as moléculas HLA de classe I, observamos um aumento na densidade de expressão dessas moléculas nesses linfócitos de pacientes diabéticos recentemente diagnosticados, quando comparados aos indivíduos normais. Embora sejam descritos diversos fatores capazes de aumentar a intensidade de expressão das moléculas de classe I, as infecções virais e o IFN- γ são os principais. Em 1997, KESKINEN et al. estimularam “in vitro” células mononucleares com IFN- γ , observando aumento da expressão das moléculas de histocompatibilidade de classe I e de $\beta 2$ -microglobulina em linfócitos, mostrando que essa citocina tem papel importante na regulação da expressão das moléculas HLA. Análises por ELISA, detectaram no soro, a presença de citocinas pró-inflamatórias como IFN- γ , TNF- α e IL-12 em 63% dos pacientes diabéticos recentemente diagnosticados (menos de 1 ano) (WY et al., 1999). Além disso, diversos agentes virais têm sido relatados como participantes da fase aguda da doença, através da presença de anticorpos anti Coxsackie B, sorotipos 1 ao 5 e Coxsackie A9 (ROIVAINEN et al., 1998) e da presença de citomegalovírus e vírus da rubéola no pâncreas de crianças diabéticas autopsiadas (REWERS & ATKINSON, 1995). Em estudos semelhantes, outros autores obtiveram resultados

distintos aos nossos, porém, as estratégias utilizadas também possuem características diversas. HAO et al. (1996) analisaram a expressão das moléculas HLA de classe I em linfócitos totais de pacientes com DM tipo 1 em duas fases da doença, ou seja, em pacientes recentemente diagnosticados (com menos de 2,5 anos de início do quadro) e em pacientes com mais de 10 anos de evolução da doença. De acordo com os relatos desses autores, não foram observadas diferenças significantes quando as densidades de expressão das moléculas de classe I nas superfícies celulares de linfócitos totais de pacientes foram comparadas com aquelas observadas em indivíduos normais. Os pacientes desse estudo foram analisados como um todo, os autores não realizaram as comparações individualizadas de acordo com o início do quadro clínico do diabetes. Por outro lado, FU et al. (1998) sugerem que a expressão das moléculas HLA de classe I em linfócitos de pacientes com DM tipo 1 esteja diminuída, posto que ocorre uma diminuição de RNAm para os genes TAP1, TAP2, LMP2 e LMP7, fatores que contribuem para a diminuição da expressão das moléculas de histocompatibilidade de classe I. FAUSTMAN et al. (1991) observaram uma diminuição da expressão dessas moléculas em linfócitos de pacientes pré-diabéticos, com diabetes recentemente diagnosticados e em pacientes com diabetes por longo período, quando comparados aos indivíduos controle. Ainda com relação à densidade de expressão das moléculas de classe I em linfócitos totais, ANAL et al. (1997) relatam que os níveis de expressão dessas moléculas em pacientes com DM tipo 1 não diferem significantemente daqueles observados nos irmãos saudáveis dos pacientes que foram utilizados como controles. Não encontramos relatos na literatura acerca da densidade de moléculas HLA de classe I em linfócitos CD4⁺ ou CD8⁺. Concluindo, os resultados apresentados no atual estudo, mostram elevações significantes da expressão das moléculas HLA de classe I em linfócitos totais e nas duas principais subpopulações linfocitárias.

A densidade de expressão das moléculas de classe I em linfócitos B e em monócitos e o número dessas células expressando essas moléculas em pacientes diabéticos não foram significantemente diferentes daqueles observados em indivíduos controle. Embora não existam relatos prévios acerca da avaliação de moléculas de classe I em linfócitos B, HAO et al. (1996) relatam achados semelhantes aos nossos em relação aos monócitos de pacientes com diabetes.

Se o aumento da densidade de expressão das moléculas de classe I nos linfócitos T $CD3^+$, $CD4^+$ e $CD8^+$ está refletindo o padrão de citocinas circulantes no diabetes, ou então, está relacionado com o aumento da expressão dessas moléculas em outros tecidos, são questões a serem respondidas. Vários autores têm descrito o aumento da expressão das moléculas HLA de classe I nas células β pancreáticas em pacientes diabéticos cujos óbitos foram registrados por ocasião do diagnóstico (FOULIS, 1996). Além disso, estudos histoquímicos de camundongos NOD por ocasião da apresentação do diabetes mostram aumento da expressão das moléculas do CPH de classe I nas ilhotas pancreáticas (RABINOVITCH, 1998). Nessas situações, têm sido sugerido que o aumento das moléculas de classe I seja devido à presença de citocinas pró-inflamatórias nas ilhotas, como o $IFN-\gamma$ (FOULIS, 1996). Assim é possível que o aumento da expressão das moléculas de classe I nas populações de linfócitos T circulantes, como observado neste estudo, possa ser um reflexo das condições do microambiente das ilhotas.

Referente às moléculas de histocompatibilidade de classe II, HLA-DR, nossos resultados mostraram um aumento do número absoluto e da porcentagem de células $CD19^+$ expressando essa molécula em pacientes recentemente diagnosticados quando comparados aos controles. Achados similares aos nossos foram relatados acerca do aumento do número de linfócitos B, coexpressando a molécula $CD5^+$ e as moléculas HLA-DR, em crianças recém diagnosticadas (menos de 1 mês), quando comparado com pacientes com mais de um mês de diagnóstico e com controles saudáveis (De FILIPPO et al., 1997).

Os linfócitos B têm sido relatados como uma das principais células apresentadoras de antígenos que atuam na patogenia do DM tipo 1. Estudos realizados em camundongos NOD revelaram que essas células apresentam preferencialmente peptídeos do auto-antígeno GAD para os linfócitos T $CD4^+$ auto-reativos (SERREZE et al., 1998). Além disso, os linfócitos B também são os produtores dos auto-anticorpos, dirigidos aos vários antígenos das ilhotas de Langerhans e detectados em fases pré diabéticas, sendo assim, utilizados como marcadores do diabetes, bem como no diagnóstico da doença. Desta maneira, os resultados do atual estudo sugerem que os linfócitos B estejam envolvidos no mecanismo de destruição das células β pancreáticas, pois o aumento do número de

linfócitos B expressando as moléculas HLA-DR pode contribuir na patogenia do diabetes, apresentando auto-antígenos, ou ainda, contribuindo para a maior produção de auto-anticorpos.

As nossas avaliações realizadas em relação ao número e porcentagem de células, e ainda, da densidade de expressão das moléculas de histocompatibilidade HLA-DR nas subpopulações de células T $CD3^+$, $CD4^+$ e $CD8^+$ não mostraram diferenças entre os pacientes diabéticos e os controles. LEGENDRE et al. (1988) relatam que, por volta dos 10 dias após o diagnóstico do diabetes, ocorre um aumento do número e da porcentagem de células T ativadas ($CD3^+$, $CD4^+$ e $CD8^+$), expressando as moléculas HLA-DR. No entanto, quando essas análises eram realizadas nesses pacientes 6 meses após o diagnóstico, não haviam diferenças significantes em relação aos indivíduos normais. Assim, esses autores sugerem que a ativação dos linfócitos T se mostra como um fenômeno flutuante e transitório, não sendo um marcador específico da destruição das células pancreáticas, mas indicando um estado geral de ativação do sistema imune em resposta a um estresse ou a uma infecção aguda. Considerando que a média de tempo após o diagnóstico do diabetes, em nosso estudo, foi de 4,9 meses, período em que as alterações mencionadas já estavam normalizadas, os nossos achados concordam com os de LEGENDRE et al. (1988).

Por outro lado, outros autores acreditam que a ativação dos linfócitos T é persistente, permanecendo neste estado por longo período de tempo. PONTESILLI et al. (1986) analisaram as subpopulações de linfócitos T, $CD3^+$, $CD4^+$ e $CD8^+$ expressando a molécula HLA-DR de pacientes diabéticos, subdivididos em diferentes tempos após o diagnóstico: 0 até 1 mês; 1 mês até 4 anos e acima de 4 anos. Comparados aos controles, os linfócitos T $CD3^+$, expressando as moléculas HLA-DR, em pacientes diabéticos diagnosticados de 1 mês até 4 anos, apresentaram aumento da porcentagem dessas células. Em adição, GESSL & WALDHAUSL (1998) analisando a expressão das moléculas HLA-DR sobre linfócitos T de pacientes diabéticos recém-diagnosticados (1 semana) e de pacientes diagnosticados por longo período de tempo (acima 5 anos), mostram que a porcentagem de células $CD4^+$ expressando a molécula HLA-DR não difere entre pacientes recém-diagnosticados e indivíduos controle, mas está aumentada nos pacientes com diabetes

diagnosticados há longo período de tempo. Esses autores concluem que o aumento é principalmente devido à expressão das moléculas HLA-DR nas células de memória ($CD4^+CD45RA^-$). Em contraste, a porcentagem das células $CD8^+$, expressando as moléculas HLA-DR estava aumentada nos pacientes diabéticos (nos dois períodos) em relação aos controles, estando confinada principalmente às células virgens ($CD8^+CD45RA^+$). Os autores sugerem que o aumento de expressão e a persistência desses marcadores de ativação linfocitária nas células $CD4^+$ e $CD8^+$ circulantes, podem refletir o início e a progressão do processo auto-imune. Corroborando esses achados, BUSCHARD et al (1990) avaliaram pacientes em 3 diferentes períodos: na ocasião do diagnóstico, após 1 mês e após 7 meses do diagnóstico, detectando aumento da porcentagem de células $CD4^+$ e $CD8^+$ expressando a molécula HLA-DR, em pacientes diabéticos estudados por ocasião do diagnóstico da doença. Além disso, o aumento da porcentagem de células $CD8^+/HLA-DR^+$, mas não as $CD4^+/HLA-DR^+$, foi mostrado até 7 meses após o diagnóstico. Finalmente, PETERSEN et al. (1996) também relataram aumento do número e porcentagem de células $CD4^+/HLA-DR^+$ em diabéticos recentemente diagnosticados em comparação aos indivíduos controle

Os resultados aqui descritos em relação às subpopulações linfocitárias expressando as moléculas HLA-DR são, em parte, contraditórios. Existem várias justificativas para explicar essas diferenças. O DM tipo 1 é uma doença muito heterogênea, ou seja, existe a participação de vários fatores que contribuem para o processo de indução e progressão da resposta auto-imune. Assim, diferentes tempos de duração da doença; diferentes grupos de pacientes e controles analisados com diversas faixas etárias; diferentes técnicas de manipulação celular e artefatos técnicos, isto é, separação celular com Ficoll ou lise de hemácias; variações na marcação celular, direta ou indireta, entre outros podem estar influenciando os resultados dessas análises.

Existem poucos estudos acerca das avaliações dos números relativos ou absolutos de monócitos expressando as moléculas HLA-DR, bem como da densidade de expressão dessa molécula nessa célula. Neste estudo, não encontramos diferenças significantes dessas avaliações em monócitos de pacientes recentemente diagnosticados e de controles. Em contrapartida, em 1991, é relatado que em monócitos de crianças diabéticas recentemente diagnosticadas, a densidade de

expressão da molécula HLA-DR mostrou-se aumentada quando comparada com crianças normais (PITUCH-NOWOROLSKA et al., 1991).

Poucos estudos têm sido descritos acerca do número de células, bem como da densidade de expressão das moléculas HLA-DQ nas diversas subpopulações linfomonocitárias de pacientes recentemente diagnosticados com DM do tipo 1.

Nossas análises relacionadas com as moléculas HLA-DQ, nas diversas populações linfomonocitárias, mostram que as densidades de expressão dessa molécula não diferiram significativamente entre pacientes e controles. Apenas uma discreta diminuição, com $p=0,06$, na densidade de expressão dessa molécula em monócitos de pacientes foi observada. Concordando com nossos achados, nenhuma diferença foi observada na expressão das moléculas HLA-DQ e HLA-DP em monócitos de crianças diabéticas recentemente diagnosticadas, quando comparadas aos controles (PITUCH-NOWOROLSKA et al., 1991). Outros estudos, também avaliando a expressão da molécula HLA-DQ, revelaram que os monócitos de pacientes com tempo de diagnóstico da doença de até 8 anos, ou os de seus irmãos saudáveis, ou ainda, os de indivíduos saudáveis não aparentados, quando estimulados “in vitro” com $\text{INF-}\gamma$, mostraram que a diminuição da expressão das moléculas HLA-DQ em células de pacientes é mais intensa do que em seus irmãos e em controles. Outro fato interessante é que durante o decorrer do estudo citado, dois irmãos que apresentaram baixa expressão dessa molécula apresentaram a doença após 6 meses. Esses resultados sugerem que a baixa expressão da moléculas HLA-DQ pode estar associado com o processo auto-imune (PARKKONEN et al., 1993).

Ainda em relação as moléculas de histocompatibilidade de classe II HLA-DQ, observamos, em nossos resultados, uma diminuição do número absoluto e da porcentagem das células CD4^+ expressando essa molécula em pacientes recentemente diagnosticados, quando comparados aos indivíduos normais. Embora o número dessas células esteja diminuído, a densidade de expressão das moléculas HLA-DQ nessa população celular não se mostrou diferente. Além disso, não observamos diferenças do número e porcentagem de células CD4^+ expressando as moléculas HLA-DR. Os linfócitos T CD4^+ têm um papel importante na indução e direcionamento da resposta imune, através da liberação de citocinas com diferentes padrões. Embora a presença de moléculas HLA de classe II em linfócitos T esteja

relacionado com ativação celular, a função dessas moléculas na superfície dessas células não está esclarecido. Assim, outros estudos são necessários para entender o papel biológico da diminuição dessas células $CD4^+/HLA-DQ^+$ no DM tipo 1.

As associações entre haplotipos HLA-DQ e DM tipo 1 têm sido relatadas há mais de 10 anos. Existem vários mecanismos propostos para entender a associação dessas moléculas de histocompatibilidade na susceptibilidade ao DM tipo 1. Com base no modelo da avidéz diferencial durante a seleção tímica (ASHTON & TONEGAWA, 1994), tem sido proposto que a fraca ligação do peptídeo à molécula HLA-DQB1*0302 leva à instabilidade desse complexo, conduzindo à baixa densidade de expressão desse complexo no timo, ocasionando uma falha durante a seleção positiva e negativa das células T potencialmente auto-reativas, liberando para o sangue periférico uma população de linfócitos T auto-reativos com alta afinidade para os auto-peptídeos (RIDGWAY & FATHMAN, 1998).

RIDGWAY et al.(1998) analisaram a expressão da molécula I-A (correspondente à molécula HLA-DQ humana) em camundongos transgênicos. Os camundongos NOD, que possuíam homozigose para a molécula $I-A^{g7}$ (equivalente à molécula HLA-DQB1*0302 humana), apresentaram resposta proliferativa de linfócitos T quando primados com auto-antígenos. Por outro lado, os animais NOD portadores das moléculas $I-A^k$ (moléculas não relacionadas com susceptibilidade ao diabetes) não respondiam a esses auto-antígenos. Os camundongos NOD $I-A^k$ transgênicos para a molécula $I-A^{g7}$ (heterozigose para HLA-DQ*0302) possuíam resposta proliferativa de células T $CD4^+$ restrita ao reconhecimento dos auto-antígenos apresentados via moléculas $I-A^{g7}$. Assim, a expressão das moléculas $I-A^{g7}$ sobre as células apresentadoras de antígenos tímicas e periféricas eram importantes para a determinação da resposta auto-imune, sugerindo um mecanismo alterado na seleção tímica, permitindo o escape de células T potencialmente auto-reativas para a periferia (RIDGWAY et al., 1998).

Para investigar se a densidade de expressão das moléculas de susceptibilidade ao DM tipo 1 em pacientes portadores dos alelos HLA-DRB1*03, *04, -DQB1*0302, *0201, -DQA1*03 e *05 era diferente daquela de indivíduos sem essas moléculas, correlacionamos o genótipo HLA dos pacientes, isto é, pacientes portadores ou não dos alelos de susceptibilidade à esse tipo clínico de diabetes, com

as análises citométricas. Desta maneira, analisamos o número de células e a densidade de expressão das moléculas HLA alelo específicas, associadas com a susceptibilidade à doença, nas diversas populações linfomonocitárias de pacientes recentemente diagnosticados, buscando evidências para entender o envolvimento dessas moléculas HLA na patogenia do DM tipo 1.

As avaliações referentes às moléculas HLA-DQ de pacientes portando o alelo DQB1*0302 (n=6), em comparação com os pacientes negativos para esse alelo (n=14), não mostraram diferenças significativas. Possivelmente, o número pequeno de pacientes positivos para esse alelo de susceptibilidade foi um fator que pôde ter influenciado os resultados, pois esperávamos uma diminuição na expressão das moléculas HLA-DQ nas células desses pacientes. Por outro lado, as avaliações dos alelos DQB1*02 mostraram que nos pacientes portadores desses alelos (n=12), o número absoluto e a porcentagem de células CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD19⁺ e CD14⁺ expressando as moléculas HLA-DQ estavam significativamente diminuídas em relação aos pacientes negativos para os alelos DQB1*02. Da mesma forma, a densidade de expressão das moléculas HLA-DQ em células CD19⁺ mostrou-se diminuída em pacientes portadores desses alelos quando comparadas com os pacientes sem esses alelos.

A susceptibilidade ao DM tipo 1 está associada com aqueles alelos de classe II que não possuem o ácido aspártico na posição 57 da cadeia beta, ou seja, DQB1*0302 e DQB1*0201 em caucasianos, DRB1*0405 em asiáticos e I-A^{g7} em camundongos NOD. O efeito da ausência do ácido aspártico nessa posição das moléculas de classe II está relacionado com diferentes capacidades dessa molécula em se ligar aos peptídeos imunopatogênicos. Estudos recentes em camundongos e em humanos revelaram que estas moléculas se ligam preferencialmente a peptídeos negativamente carregados no resíduo de ancoragem na posição P9. Uma explicação molecular para esse fenômeno é que o ácido aspártico da posição 57 da cadeia beta forma uma ponte de sal com uma arginina na posição 79 da cadeia alfa da molécula HLA-DQ, enquanto que as moléculas que não possuem o ácido aspártico, deixam a arginina livre para interagir com o aminoácido da posição P9, negativamente carregado, do peptídeo (GODKIN et al., 1997; QUARSTEN et al., 1998). Estruturalmente semelhante às moléculas HLA-DQB1*0302, a molécula HLA-

DQB1*0201 também é instável e essa instabilidade poderia exercer um efeito na diminuição da expressão dessa molécula nas superfícies celulares, como foi mostrada em nossos resultados.

O escape de linfócitos T potencialmente auto-reativos do processo de seleção tímica pode estar ocorrendo preferencialmente no contexto dos alelos HLA-DQ específicos que conferem susceptibilidade ao DM tipo 1, por causa da ineficiente interação estrutural do complexo HLA/peptídeo, formado pelas moléculas HLA-DQ e o peptídeo. Subsequente ativação dessas células T no contexto do reconhecimento dos antígenos das ilhotas poderia deflagrar uma resposta imune pobremente regulada, resultando na progressiva destruição das ilhotas (NEPOM & KWOK, 1998).

Nenhuma diferença significativa em relação à expressão das moléculas HLA-DQ foi observada, entre pacientes positivos e negativos para os alelos DQA1*03 e DQA1*05. Da mesma forma, não houve diferenças significantes dos parâmetros celulares estudados, expressando as moléculas HLA-DR, entre pacientes positivos e negativos para os alelo DRB1*03. Por outro lado, o número de células CD4⁺ expressando as moléculas HLA-DR em pacientes positivos para os alelos DRB1*04 estavam aumentados em relação aos pacientes negativos para esses alelos.

Concluindo, os achados aqui relatados mostraram um aumento da densidade de expressão das moléculas de histocompatibilidade de classe I em linfócitos T CD3⁺, CD4⁺ e CD8⁺ de pacientes com DM tipo 1 quando comparados aos controles. Em relação às moléculas HLA de classe II, o número e a porcentagem dos linfócitos B expressando as moléculas HLA-DR estavam aumentados em pacientes. Os resultados acerca das moléculas HLA-DQ, mostraram que os linfócitos T CD4⁺ de pacientes expressando essas moléculas, estavam diminuídos em relação aos controles. Referente à correlação do perfil genotípico dos pacientes, os resultados revelaram que pacientes portadores dos alelos HLA-DQB1*02 apresentaram diminuição no número e porcentagem das células CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD19⁺ e CD14⁺ expressando as moléculas HLA-DQ, e ainda, a diminuição da densidade de expressão da molécula HLA-DQ nas células CD19⁺, em relação aos pacientes sem esses alelos.

Este estudo reafirma a importância da densidade de expressão das moléculas de histocompatibilidade de classe II na patogenia ao diabetes, conduzindo a

susceptibilidade ao DM tipo 1. Além disso a identificação dos alelos de susceptibilidade pode ser uma estratégia adequada para identificar indivíduos com tendência a apresentar o diabetes, principalmente em famílias que já possuam um indivíduo acometido pela doença, para que medidas de prevenção ou retardamento do desencadeamento do DM tipo 1 possam ser tomadas.

VI-CONCLUSÕES

Este representa o primeiro estudo sobre a avaliação sistematizada das moléculas de histocompatibilidade de classe I e II (HLA-DR e -DQ) nas diversas populações linfomonocitárias do sangue periférico de pacientes recentemente diagnosticados com diabetes mellitus do tipo 1. Desta maneira, o número e a porcentagem de células $CD3^+$, $CD4^+$, $CD8^+$, $CD19^+$ e $CD14^+$, principais participantes da patogenia deste tipo clínico de diabetes, e a densidade de expressão das moléculas HLA de classe I e II foram analisadas de forma conjunta. Além disso, este é também o primeiro estudo comparando a expressão das moléculas de histocompatibilidade com o perfil genotípico de susceptibilidade a essa doença, realizado em pacientes portadores dos alelos que conferem susceptibilidade, visando o entendimento do mecanismo pelo qual determinadas moléculas conferem susceptibilidade ao DM tipo 1.

Em relação às avaliações das moléculas de histocompatibilidade de classe I observamos aumento na densidade de expressão dessa molécula em linfócitos T $CD3^+$, $CD4^+$ e $CD8^+$ de pacientes. É possível que esse aumento possa ser um reflexo das condições do microambiente das ilhotas pancreáticas, isto é, a presença de citocinas pró-inflamatórias, participantes da patogenia do diabetes, como, IFN- γ , aumentando a expressão dessas moléculas.

Linfócitos B expressando as moléculas HLA-DR apresentaram-se em maior número e porcentagem em pacientes quando comparados aos controles. Relatada como uma das principais células apresentadoras de antígenos no DM tipo 1, o aumento dessas células pode sugerir que os linfócitos B estejam envolvidos no processo patogênico do DM tipo 1, apresentando auto-antígenos, e ainda, produzindo os auto-anticorpos.

As avaliações das moléculas HLA-DQ revelaram diminuição no número e porcentagem de linfócitos T $CD4^+$ de pacientes expressando essa molécula. Têm sido descrito que a expressão de moléculas de histocompatibilidade de classe II em linfócitos T denota ativação celular. Por outro lado, a função dessas moléculas na superfície dessas células não está esclarecido,. Assim, outros estudos são necessários para entender o papel biológico da diminuição dessas células $CD4^+$ /HLA-DQ $^+$ em pacientes com DM tipo 1.

Com a intenção de entender o mecanismo pelo qual determinadas moléculas conferem susceptibilidade foram realizadas comparações das análises citométricas com o perfil genotípico de pacientes portadores dos alelos de susceptibilidade ao DM tipo 1. Houve uma diminuição do número e porcentagem de células CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD19⁺ e CD14⁺ expressando as moléculas HLA-DQ de pacientes portadores dos alelos HLA-DQB1*02, e ainda, uma diminuição da densidade de expressão das moléculas HLA-DQ nos linfócitos B desses pacientes em comparação aos pacientes que não possuem esses alelos. Esses resultados reforçam as descrições de que as moléculas de histocompatibilidade codificadas pelos alelos HLA-DQB1*02 são menos expressas, possivelmente, devido a sua instabilidade estrutural, relacionada com a pobre ligação aos peptídeos. O resultado dessa baixa expressão pode conduzir a falhas na determinação da tolerância central, ou seja, no processo de seleção dos linfócitos T, permitindo a liberação de células auto-reativas, específicas para os auto-antígenos pancreáticos. Além disso, a tolerância periférica pode estar sendo quebrada devido ao processo de insulite, com a presença de citocinas pró-inflamatórias, que induzem a ativação celular e a consequente expressão das moléculas de classe I e II.

VII-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Akerblom HK, Knip M. Putative environmental factors in type 1 diabetes. *Diabetes Metab Ver.* Mar; 14(1):31-67, 1998.
- Anal O, Akkoc N, Sem A, Yesil S, Yuksel F, Buyukgebiz A. MHC class I antigen expression in patients with IDDM and their siblings. *J Pediatr Endocrinol Metab*, Jul;10(4):391-4, 1997.
- Andreoletti L, Hober D, Hober-Vanderberghe C, Fajard I, Belaich S, Lambert V, Vantuyghem MC, Lefebvre J, Wattre P. Coxsackie B virus infection and beta cell autoantibodies in newly diagnosed IDDM adult patients. *Clin Diagn Virol*, Apr; 9(2-3):125-33, 1998.
- Ashton-Rickardt PG, Tonegawa S. A differential-avidity model for T-cell selection. *Immunol Today*, 15:362-66, 1994.
- Bernardinis P, Londei M, Kahan M, Balsano F, Kontiainen S, Gale EA, Bottazzo GF, Feldmann M. The majority of the activated T cells in the blood of insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM) patients are CD4+. *Clin Exp Immunol*, Aug;73(2):255-9, 1988.
- Bodmer JG, Marsh SGE, Albert ED, Bodmer WF, Bontrop RE, Dupont B, Erlich HA, Hansen JA, Mach B, Mayr WR, Parham P, Petersdorf EW, Sasazuki T, Schreuder GMT, Strominger JL, Svejgaard A, Terasaki PI. Nomenclature for factors of the system, 1998. *Tissue Antigens*, 53:407-446, 1999.
- Bodmer WF. HLA: what's in a name? A commentary on HLA nomenclature development over the years. *Tissue Antigens*, 46:293-96, 1997.
- Boitard C, Caillat-Zucman S, Timsit J. Insulin-dependent diabetes and human leucocyte antigens. *Diabetes Metab*, 23 Suppl2:22-28, 1997.
- Boitard C, Timsit J, Larger E, Dubois D. Immune mechanisms leading to type 1 insulin-dependent diabetes mellitus. *Horm Res*, 48 suppl 4:58-63, 1997.
- Buschard K, Damsbo P, Ropke C. Activated CD4+ and CD8+ T lymphocytes in newly diagnosed type 1 diabetes: a prospective study. *Diabet Med*, Feb;7(2):132-6, 1990.
- Clements GB, Galbraith DN, Taylor KW. Coxsackie B virus infection and onset of childhood diabetes. *Lancet* Jul 22;346(8969):221-223, 1995.

- Dahlén E, Dawe K, Ohlsson L & Hedlund G. Dendritic cells and macrophages are the first and major producers of TNF- α in pancreatic islets in the nonobese diabetic mouse. *The Journal of Immunology*, 160:3585-93, 1998.
- Dahlquist G. The aetiology of type 1 diabetes: an epidemiological perspective. *Acta Paediatr Suppl*, Oct;425:5-10, 1998.
- De Fillipo G, Pozzi N, Consentini E, Cavalcanti M, Carel JC, Tamasi S, Franzese A, Pignata C. Increased CD5+CD19+ B lymphocyte at the onset of type 1 diabetes in children. *Acta Diabetol*, Dec;34(4):271-4, 1997.
- De Maria R & Testi R. Fas-FasL interactions: a common pathogenetic mechanism in organ-specific autoimmunity. *Immunology Today*, vol 19, n3:121-5, 1998.
- Deng G Y, Muir A, Maclaren N K, & She J X. Association of LMP7 genes within the major histocompatibility complex with insulin-dependent diabetes mellitus: population and family studies. *Am J Hum Genet*, 56:528-34, 1995.
- Eizirik DL, Monteiro CMC, Voltarelli JC, Foss MC. Frequency of HLA antigens in a Brazilian type I diabetic population. *Brazilian J Med Biol Res*, 20:533-37, 1987.
- Faustman D. Mechanisms of autoimmunity in type I diabetes. *J Clin Immunol*, Jan;13(1):1-7, 1993.
- Faustman D, Li X, Lin H Y, Fu Y, Eisenbarth G, Avruch J, Guo J. Linkage of faulty major histocompatibility complex class I to autoimmune diabetes. *Science*, Dec;254:1756-61, 1991.
- Fernandes, APM. Expressão de moléculas de histocompatibilidade de classe I e II em células linfomononucleares de pacientes recentemente diagnosticados com diabetes mellitus insulino dependente. Ribeirão Preto, 1999. 95p. Dissertação (Mestrado)-Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.
- Ferreira SR, Franco LJ, Vivolo MA, Negrato CA, Simoes AC, Ventureli CR. Population-based incidence of IDDM in the state of São Paulo, Brazil. *Diabetes Care*. May;16(5):701-4, 1993.
- Foulis AK. The pathology of the endocrine pancreas in type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus. *APMIS*, Mar;104(3):161-7, 1996.
- Fu Y, Nathan DM, Li F, Li X, Faustman DL. Defective major histocompatibility complex class I expression on lymphoid cells in autoimmunity. *J Clin Invest*, May;91(5):2301-07, 1993.

- Fu Y, Yan G, Shi L, Faustman D. Antigen processing and autoimmunity. Evaluation of mRNA abundance and function of HLA-linked genes. *Ann N Y Acad Sci*, Apr 15; 842:138-55, 1998.
- Gepts W. Pathologic anatomy of the pancreas in juvenile diabetes mellitus. *Diabetes*, 14:619-33, 1965.
- Gessl A, Waldhausl W. Increase CD69 and human leukocyte antigen-DR expression on T lymphocyte in insulin-dependent diabetes mellitus of long standing. *J Clin Endocrinol Metab*, Jun;83(6):2204-9, 1998.
- Gianani R, Sarvetnick N. Viruses, cytokines, antigens and autoimmunity. *Proc Natl Acad Sci USA*, Mar19;93(6):2257-9, 1996.
- Godkin A, Friede T, Davenport M, Stevanovic S, Willis A, Jewell D, Hill A, Rammensee HG. Use of eluted sequence data to identify the binding characteristics of peptides to the insulin-dependent diabetes susceptibility allele HLA-DQ8 (DQ 3.2). *Int Immunol*, Jun;9(6):905-11, 1997.
- Green EA, Eynon EE, Flavell RA. Local expression of TNFalpha in neonatal NOD mice promotes diabetes by enhancing presentation of islet antigens. *Immunity*, Nov;9(5):733-43, 1998.
- Hanskins K, McDuffie M. Acceleration of diabetes in young NOD mice with a CD4+ islet-specific T cell clone. *Science*, 21;249(4975):1433-6, 1990.
- Hanson MS, Cetkovic-Cvrlje M, Ramiya VK, Atkinson MA, Maclaren NK, Singh B, Elliot JF, Serreze DV, Leiter EH. Quantitative thresholds of MHC class II IE expressed on hemopoietically derived antigen-presenting cells in transgenic NOD/Lt mice determine level of diabetes resistance and indicate mechanism of protection. *J immunol*, Aug 1;157(3):1279-87, 1996.
- Hao,Wei, Gladstone,Paul, Engardt,Susan, Greenbaun,Carla, Palmer,Jerry P. Major histocompatibility complex class I molecule expression is normal on peripheral blood lymphocytes from patients with insulin-dependent diabetes mellitus. *The Journal of Clinical Investigation*, Oct;98(7):1613-18, 1996.
- Horwitz MS, Bradley LM, Harbertson J, Krah T, Lee J, Sarvetnick N. Diabetes induced by Coxsackie virus: initiation by bystander damage and not molecular mimicry. *Nat Med*, Jul;4(7):781-5, 1998.

- Imagawa A, Hanafusa T, Itoh N, Miygawa J, Nakajima H, Kuwajima M, Tamura S, Kawata S, Matsuzawa Y, Harlan DM. Islet-infiltrating T lymphocytes in insulin-dependent diabetic patients express CD80 (B7-1) and CD86 (B7-2). *J Autoimmun*, Jun9(3):391-6, 1996.
- Jackson D G & Capra J D. TAP1 alleles in insulin-dependent diabetes mellitus: a newly defined centromeric boundary of disease susceptibility. *Proc Natl Acad Sci USA*, vol 90: 11079-83, 1993.
- Janeway CA, Travers P. *Immunobiology*, 1997.
- Kaaba AS, Al-Harbi AS. Abnormal lymphocyte subsets in Kuwaiti patients with type-1 insulin-dependent diabetes mellitus and their first-degree relatives. *Immunol Lett*, Sep;47(3):209-13, 1995.
- Kaufman DL, Frlander MG, Claesalzler M, Atkinson MA, Maclaren NK, Tobin AJ. Autoimmunity to two forms of glutamate-decarboxylase in insulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Invest*, 89:283-92, 1992.
- Keskinen P, Ronni T, Matikainen S, Lehtonen A, Julkunen I. Regulation of HLA class I and II expression by interferons and influenza A virus in human peripheral blood mononuclear cells. *Immunology*, Jul;91(3):421-9, 1997.
- Kwok WW, Domier ML, Johnson ML, Nepom GT, Koelle DM. HLA-DQB1 codon 57 is critical for peptide binding and recognition. *J Exp Med*, 1;183(3):1253-8, 1996.
- Kwok WW, Domier ML, Raymond FC, Byers P, Nepom GT. Allele-specific motifs characterize HLA-DQ interactions with a diabetes-associated peptide derived from glutamic acid decarboxylase. *J Immunol*, 15;156(6):2171-7, 1996.
- Lernmark A. Molecular biology of type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus. *Diabetologia*. 28:195-203, 1985.
- McDevitt HO. The role of MHC class II molecules in susceptibility and resistance to autoimmunity. *Current Opinion in Immunology*, 10:677-81, 1998.
- Maugendre D, Alizadeh M, Gauthier A, Guilhem I, Pouillaud C, Genetet B, Allanic H, Semana G. Genetic heterogeneity between type 1a and type 1b insulin-dependent diabetes mellitus: HLA class II and TAP gene analysis. *Tissue Antigens*, 48:540-48, 1996.

- Nahas, HSD, Dantas RO, Donadi EA. HLA class I and II profiles of patients presenting with chaga's disease. *Digest Disease and Sciences*, 43(2):246-252, 1998.
- Nepom BS, Nepom GT, Coleman M, Kwok WW. Critical contribution of beta chain residue 57 in peptide binding ability of both HLA-DR and –DQ molecules. *Proc Natl Acad Sci USA*, 9;93(14):7202-6, 1996.
- Nepom GT. HLA and type I diabetes. *Immunol today*, 11(9):314-5, 1990.
- Nepom GT. A unified hypothesis for the complex genetics of HLA associations with IDDM. *Diabetes*, 39(10):1153-7, 1990.
- Nepom, GT. Class II antigens and disease susceptibility. *Annu Rev Med*, 46:17-25, 1995.
- Nepom GT, Erlich H. MHC class II molecules and autoimmunity. *Annu Ver Immunol*, 9:493-525, 1991.
- Nepom GT, Kwok WW. Molecular basis for HLA-DQ associations with IDDM. *Diabetes*, Aug;47(8):1177-84, 1998.
- Nepom GT, Robinson DM. HLA-DQ and diabetes mellitus: a genetic and structural paradigm for models of disease susceptibility. *The Molecular Biology of Autoimmune Disease*, 38:251-61, 1990.
- Nerup J, Mandrup-Poulsen T, Molvig J, Helqvist S, Wogensén L, Egeberg J. Mechanisms of pancreatic beta-cell destruction in type 1 diabetes. *Diabetes Care*, Nov-Dec;11 suppl 1:16-23, 1988.
- Nossal GJ, Herold KC, Goodnow CC. Autoimmune tolerance and type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus. *Diabetologia*, Dec;35 Suppl2:S49-S59, 1992.
- Oldstone MB. Molecular mimicry and immune-mediated disease. *FASEB*, Oct;12(13):1255-65, 1998.
- Olerup O, Zetterquist H. HLA –DR typing by PCR amplification with sequence specific primers (SSP) in two hours: An alternative to serological DR typing in clinical practice including donor-recipient matching in cadaveric transplantation. *Tissue Antigens*, 39:225-35, 1992.
- Owerbach D, Naya FJ, Tsai MJ, Allander SV, Powell DR, Gabbay HG. Analysis of candidate for susceptibility to type 1 diabetes. *Diabetes*, June;46:1069-74, 1997.

- Parkkonen P, Hyoty H, Huupponen T, Leinikki P, Tuomilehto-Wolf E, Knip M. Defective HLA class II expression in monocytes of type 1 diabetic patients. The childhood diabetes in Finland study group. *APMIS*, May;101(5):395-402, 1993.
- Petersen LD, Duinkerken G, Bruining GJ, van-Lier RA, Vries RR, Roep BO. Increased numbers of in vivo activated T cells in patients with recent onset insulin-dependent diabetes mellitus. *J Autoimmun*, Dec;9(6):731-7, 1996.
- Pituch-Noworolka A, Dziatkowiak H, Zembala M. MHC class I determinants on peripheral blood monocytes from newly diagnosed IDDM patients. *Endokrynol Pol*, 42(4):507-12, 1991.
- Pontesilli O, Chase HP, Carotenuto P, Herberger MJ, Hayward AR. T-lymphocyte subpopulations in insulin-dependent (type I) diabetes mellitus. *Clin Exp Immunol*, Jan;63(1):68-72, 1986.
- Pugliese A, Zeller M, Fernandez Jr A, Zalcberg L J, Barlett R J, Ricordi C, Pietropaolo M, Eisenbarth G S, Bennet S T & Patel D D. The insulin gene is transcribed in the human thymus and transcription levels correlate with allelic variation at the INS VNTR-IDDM2 susceptibility locus for type 1 diabetes. *Nature Genetics*, vol 15:293-7, 1997.
- Quarsten H, Paulsen G, Johansen BH, Thorpe CJ, Holm A, Buus S, Sollid LM. The P9 pocket of HLA-DQ2 (non-Aspbeta57) has no particular preference for negatively charged anchor residues found in other type 1 diabetes-predisposing non-Aspbeta57 MHC class II molecules. *Int Immunol*, Aug;10(8):1229-36, 1998.
- Quartey-Papafio R, Lund T, Chandler P, Picard J, Ozegbe P, Day S, Hutchings PR, O'Reilly L, Kioussis D, Simpson E, et al. Aspartate at position 57 of nonobese diabetic I-Ag7 beta-chain diminishes the spontaneous incidence of insulin-dependent diabetes mellitus. *J Immunol*, 15;154(10):5567-75, 1995.
- Rabinovitch A. An update on cytokines in the pathogenesis of insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetes Metab Rev*, Jun;14(2):129-51, 1998.
- Rabinovitch A, Suarez-Pinzon WL. Cytokines and their roles in pancreatic islet beta-cell destruction and insulin-dependent diabetes mellitus. *Biochem Pharmacol*, Apr;55(8):1139-49, 1998.
- Rahier J, Goebbels, Henquin JC. Cellular composition of the human diabetic pancreas. *Diabetologia*, 24:366-71, 1983.

- Redondo MJ, Rewers M, Yu L, Gard S, Pilcher CC, Elliott RB, Eisenbarth GS. Genetic determination of islet cell autoimmunity in monozygotic twin, dizygotic twin, and non-twin siblings of patients with type 1 diabetes: prospective twin study. *BMJ*, Mar 13;318(7185):698-702, 1999.
- Rewers M, Atkinson M. The possible role of enteroviruses in diabetes mellitus. *Human Enterovirus Infections*, 1995.
- Ridgway WM, Fathman CG. The association of MHC with autoimmune disease: understanding the pathogenesis of autoimmune diabetes. *Clin Immunol Immunopathol*, vol.86, No.1:3-10, 1998.
- Ridgway WM, Ito H, Fasso M, Yu C, Fathman CG. Analysis of the role of variation of major histocompatibility complex class II expression on nonobese diabetic (NOD) peripheral T cell response. *J Exp Med*, 188(12):2267-75, 1998.
- Rohn WM, Lee YJ, Benveniste EN. Regulation of class II MHC expression. *Crit Ver Immunol*, 16(3):311-30, 1996.
- Roivainen M, Knip M, Hyoty H, Kulmala P, Hiltunen M, Vahasalo P, Hovi T, Akerblom HK. Several different enterovirus serotypes can be associated with prediabetic autoimmune episodes and onset of overt IDDM. *J Med Virol*, Sep;56(1):74-8, 1998.
- Ronningen KS, Spurkland A, Tait BD, Drummond B, Lopez-Larrea C, Baranda FS, Menendez-Diaz MJ, Caillat-Zucman S, Beaurain G, Garchon HJ, Ilonen J, Reijonen H, Knip M, Boehm BO, Rosak C, Loliger C, Kuhnl P, Ottenhoff T, Contu L, Carcassi C, Savi M, Zanelli P, Neri TM, Hamaguchi K, Kimura A, Dong RP, Chikuba N, Nagataki S, Gorodezky C, Debaz H, Bobles C, Coimbra HB, Martinho A, Ruas MA, Sachs JÁ, Garcia-Pacheco M, Biro A, Nikaein A, Dombrowsky L, Gonwa T, Zmijewski C, Monos D, Kamun M, Layrisse Z, Magli MC, Balducci P, Thorsby E. HLA class II associations in insulin-dependent diabetes mellitus among blacks, caucasoids and japaneses. *Disease component*, W6.4:713-22, 1995.
- Savola K, Bonifacio E, Sabbah E, Kulmala P, Vahasalo P, Karjalainen J, Tuomiehto-Wolf E, Merilainen J, Akerblom HK, Knip M. IA-2 antibodies-a sensitive marker of IDDM with clinical onset in childhood and adolescence. *Diabetologia*, Apr;41(4):424-9, 1998.

- Schranz DB, Lernmark A. Immunology in diabetes: an update. *Diabetes Metab Rev*, Mar;14(1):3-29, 1998.
- See DM, Tilles JG. The pathogenesis of viral-induced diabetes. *Clin Diagn Virol*. Apr; 9(2-3):85-8, 1998.
- Serreze DV, Fleming AS, Chapman HD, Richard SD, Leiter EH, Tisch RM. B lymphocytes are critical antigen-presenting cells for the initiation of T cell-mediated autoimmune diabetes in nonobese diabetic mice. *J immunol*, Oct15;161(8):3912-8, 1998.
- She JX. Susceptibility to type I diabetes: HLA-DQ and DR revised. *Immunology Today*, Jul. vol 17(7):323-9, 1996.
- She JX, Marron MP. Genetic susceptibility factors in type 1 diabetes: linkage, disequilibrium and functional analyses. *Current Opinion in Immunology*, 10:682-8, 1998.
- Siegel, S. Estatística não-paramétrica para ciências do comportamento. *Rio de Janeiro, Ed Macgraw Hill*, 1975.
- Thorsby E, Roningen KS. Particular HLA-DQ molecules play a dominant role in determining susceptibility or resistance to type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus. *Diabetologia*, May;36(5):371-7, 1993.
- Tisch R, McDevitt H. Insulin-dependent diabetes mellitus. *Cell*, 3;85(3):291-7, 1996.
- Togun R A, Resetkova E, Kawai K, Enomoto T, Volpe R. Activation of CD8+ T lymphocytes in insulin-dependent diabetes mellitus. *Clin immunol immunopathol*. Mar,(3):243-49, 1997.
- Tood, J A Genetic control of autoimmunity in type 1 diabetes. *Immunology Today*, vol 11:122-9, 1990.
- Toyoda H, Formby B. Contribution of T cells to the development of autoimmune diabetes in the NOD mouse model. *Bioessays*, Sep;20(9):750-7, 1998.
- Vafiadis P, Bennet S T, Tood J A, Nadeu J, Grabs R, Goodyer C G, Wickramasinghe S, Colle E Polychronakos C. Insulin expression in human thymus is modulated by INS VNTR alleles at the IDDM2 locus. *Nature genetics*, vol 15:289-92, 1997.
- von-Herrath MG, Holz A, Homann D, Oldstone MB. Role of viruses in type 1 diabetes. *Semin Immunol*, Feb;19(1):87-100, 1998.
- Wicker L, Wekerle H. Autoimmunity. *Curr Opin Immunol*, Dec;7(6):783-5, 1995.

- Wy NG, Thai AC, Lui KF, Yeo PP, Cheah JS. Systemic levels of cytokines and GAD-specific autoantibodies isotypes in Chinese IDDM patients. *Diabetes res Clin Pract*, Feb;43(2):127-35, 1999.
- Yokoda I, Matsuda J, Naito E, Ito M, Shima K, Kuroda Y. Comparasion of GAD and ICA512/IA-2 antibodies at and after the onset of IDDM. *Diabetes Care*, Jan;21(1):49-52, 1998.
- Yoon JW. The role of viruses and environmental factors in the induction of diabetes. *Curr Top Microbiol Immunol*, 164:95-123, 1990
- Yoon JW, Jun HS, Santamaria P. Cellular and molecular mechanisms for the initiation and progression of beta cell destruction resulting from the collaboration between macrophages and T cells. *Autoimmunity*, 27(2):109-22,1998.

SUMMARY

Although the role of MHC molecules in the susceptibility to DM1 has not been elucidated, the density of MHC molecules on cell surface may influence the outcome of the immune response. In this study, the number of CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD19⁺ and CD14⁺ cells coexpressing MHC class I and II, and the correlation between the density of MHC molecules and the immunogenetic profile of DM1 patients were studied. A total of 20 recently diagnosed patients (12 males) and 20 control individuals matched to the patients in terms of age, sex and race were studied. MHC molecules on cell surfaces were evaluated using flow cytometry. MHC alleles were typed using sequence specific probes. Statistical analysis was performed by the non-parametric Mann Whitney-U test. Increased expression of MHC class I molecules was observed in patients T CD3⁺, CD4⁺ and CD8⁺ cells in relation to controls. The number and percentage of double-positive CD4⁺/HLA-DQ⁺ cells were significantly decreased in patients. Compared to DM1 patients who were not typed as HLA-DQB1*02, DM1 patients typed as HLA-DQB1*02 exhibited decreased numbers of CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD19⁺ and CD14⁺ cells expressing HLA-DQ molecules, whereas the density of HLA-molecules was increased in CD19⁺ cells. Compared to non-HLA-DQB1*0302 patients, those typed as HLA-DQB1*0302 presented increased number of CD14⁺ and CD19⁺ cells expressing HLA-DQ molecules. Besides the instability of peptide ligation with susceptibility molecules, this study stresses the relevance of the density of MHC class II molecules on the susceptibility to DM1.