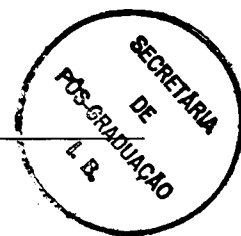


UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

BC/39671
IB/81456

INSTITUTO DE BIOLOGIA

T/UNICAMP



Silvia Barbosa Dutra Marques

Distribuição dos Alelos HLA-DRB1 em Pacientes com Diabetes Melito Tipo 1 de Campinas (SP) e Região

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato(a)
Silvia Barbosa Dutra Marques
e aprovada pela Comissão Julgadora.
15/9/99

Tese de Mestrado apresentada ao Instituto de Biologia, para obtenção do título de Mestre em Genética e Biologia Molecular, na área de Microbiologia.

Orientador: Profa. Dra. Sofia Rocha Lieber



Campinas-SP

1999

UNIDADE	I 2
N.º CHAMADA:	T/UNICAMP
	M348d
V.	E.
NUMERO	39671
PAGE	229/29
C	D
PRECO	R\$ 11,00
DATA	07-12-99
N.º CPD	

CM-00137475-1

FICHA CATALOGRAFICA ELBORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP

Marques, Silvia Barbosa Dutra
M348d Distribuição dos alelos HLA-DRB1 em pacientes com diabetes
Melito tipo 1 de Campinas (SP) e região/Silvia Barbosa Dutra
Marques. -- Campinas, SP.[s.n.], 1999.
74f.:ilus.

Orientadora: Sofia Rocha Lieber
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas.
Instituto de Biologia.

1. Diabetes Tipo 1. I. Lieber, Sofia Rocha. II. Universidade
Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Data da Defesa 15/09/1999

Banca Examinadora

Titulares:

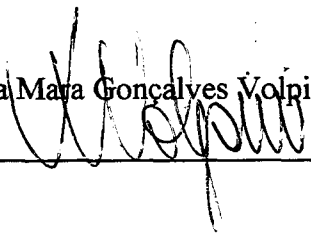
Profa. Dra. Sofia Rocha Lieber (orientador)



Profr. Dr. Mario José Abdala Saad



Profa. Dra. Walkyria Mara Gonçalves Volpini



Suplente:

Profa. Dra. Leonilda Maria Barbosa dos Santos

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Histocompatibilidade do Centro de Hematologia e Hemoterapia da Universidade Estadual de Campinas, sendo parcialmente subsidiado pelo Fundo de Apoio ao Ensino e Pesquisa (FAEP) UNICAMP.

Aos meus pais, Creves e Valdevino, sempre presentes em meu coração, por me ensinarem a pensar positivamente e a lutar por meus ideais.

Uma lembrança de força.

Ao meu marido Marques, verdadeiro companheiro, pelo apoio, compreensão e cumplicidade.

Aos meus filhos Nicole, Leticia e Gustavo, que apesar de tão pequeninos nos surpreendem no dia a dia.

Agradecimentos

À profª Dra Sofia Rocha Lieber, pela orientação deste trabalho que muito contribuiu para a minha formação, pelo exemplo e amizade.

À Profª Dra Ligia Beatriz Persoli, pelas suas excelentes sugestões, sempre incentivando-me com paciência e carinho.

À Profª Dra Walkyria Mara Gonçalves Volpini, pela contribuição em várias etapas da realização deste, pelo profissionalismo, carinho, dedicação e seriedade.

À Profª Dra Elisabeth João Pavin, responsável pelo ambulatório de Diabetes tipo 1, Disciplina de Endocrinologia – UNICAMP, que nos permitiu a obtenção das amostras dos pacientes e colaborou diretamente com o desenvolvimento deste projeto.

À Profª Dra Sara Terezinha Olalla Saad, coordenadora do HEMOCENTRO, que nos permitiu utilizar a infraestrutura dos laboratórios do HEMOCENTRO.

À Profª Dra Sophie Caillat Zucman, do INSERM U-25, Paris, França, que nos orientou durante toda padronização desta técnica, com muita dedicação.

Ao Prof Dr Jordão Pellegrino Jr, pela minha iniciação científica.

À Profª Dra Laise Vieira, da Universidade Federal de Fortaleza, que gentilmente nos forneceu seus dados sobre a população controle de Fortaleza que foram utilizados na discussão deste estudo.

Aos professores, Dra Leonilda Maria Barbosa dos Santos, Dra Walkyria Mara Gonçalves Volpini e Dr Mário José Adala Saad, pelas valiosas sugestões.

Aos doadores de sangue e funcionários do HEMOCENTRO que muito facilitaram a obtenção do grupo controle deste trabalho.

Aos pacientes que participam do ambulatório de Diabetes tipo 1, da disciplina de Endocrinologia – UNICAMP, que gentilmente nos autorizaram a coleta de amostra de sangue, que deu vida a este trabalho.

Aos colegas Maria Helena Midola de Carvalho e Carlos Roberto E. Grignoli, da Biologia Molecular, pela paciência e apoio no decorrer da padronização desta técnica.

À Rosana Gon Rocha e Sandra Sousa de Andrade, do Serviço de Apoio Didático, pelo apoio técnico na formatação final deste trabalho.

Às colegas de pós-graduação, Simone Cortes Batista e Jeane Eliete Laguila Visentainer, pelo incentivo, cooperação e amizade.

Ao departamento de Microbiologia, em especial à Dra Lucila Ricci, pela acolhida e apoio no desenvolvimento deste trabalho.

À Maria de Lourdes Fagundes, secretária do curso de Pós-Graduação em Microbiologia, pela carinhosa atenção em todos os momentos.

Aos colegas do Laboratório de HLA Ana Luiza, Edilaine, Márcia, Marília, Regina e Silvio, pela colaboração, amizade e pelo carinho.

Às minhas irmãs Sandra e Sumaia, pelo apoio, estímulo e pela compreensão, principalmente nos momentos difíceis.

À Profª Aralys Borges de Freitas, pela revisão gramatical.

Sumário

Resumo	i
Summary	iii
I. Introdução	01
1.1. Diabetes Mellito Insulino-dependente	02
1.2. DMID e Sistema HLA	04
1.3. Genética do DM-1 no Brasil	10
II. Objetivos	12
III. Materiais e Métodos	14
3.1. Populações de Estudo	15
3.2. Metodologia do Estudo	15
3.2.1. Banco de DNA	15
3.2.2. Extração de DNA	16
3.2.3. Genotipagem HLA	17
3.3. Análise Estatística	22
IV. Resultados	24
4.1. Padronização da Técnica de Genotipagem dos Antígenos HLA de Classe II: DRB1	25
4.2. Genotipagem dos Alelos HLA-DRB1 nos Pacientes com Diabetes tipo 1	29
4.3. Genotipagem dos Alelos HLA-DRB1 no Grupo-Controle	36
V. Discussão	38
5.1. Padronização da Genotipagem HLA-DRB1	39
5.2. Distribuição dos Alelos HLA-DRB1 em Pacientes com Diabetes Tipo 1	39
5.3. Frequência dos Alelos HLA-DRB1 no Grupo-Controle	44
VI. Conclusões	46
VIII. Referências Bibliográficas	48
IX. Apêndice	a

Figuras e Tabelas

Figura 1: Organização gênica da região HLA	6
Figura 2: Esquema da molécula HLA de classe II.....	7
Figura 3: Esquema do sítio antigênico da molécula HLA de classe II.....	8
Figura 4: Análise dos produtos da PCR DRB1, sobre gel de agarose 2%	26
Figura 5a: Identificação de alelos HLA-DRB1, com sondas específicas.....	27
Figura 5b: Identificação de alelos HLA-DRB1 com sondas específicas	28
Tabela 1: Genotipagem dos alelos HLA-DRB1, em pacientes com DM-1	31
Tabela 2: Distribuição das frequências fenotípicas HLA-DRB1 em pacientes com DM-1 e no grupo-controle.....	32
Tabela 3: Distribuição das frequências alélicas de HLA-DRB1 em pacientes com DM-1 e no grupo-controle.....	33
Tabela 4: Frequências dos alelos HLA-DRB1*03 e *04, em populações caucasóides com DM-1, observadas neste e em outros estudos, comparadas aos respectivos grupos-controles.....	34
Tabela 5: Frequências dos alelos HLA-DRB1*03 e *04, em populações mestiças com DM-1, observadas neste e em outros estudos, comparadas aos respectivos grupos-controles	35
Tabela 6: Frequências fenotípicas HLA-DRB1, observadas no grupo-controle deste estudo e em diferentes populações descritas na literatura	37

Siglas e Abreviaturas

SSO	“Sequence Specific Oligonucleotide”
DM1	Diabetes Melito Tipo 1
HLA	“Human Leukocyte Antigen”
LADA	“Latent Autoimmune Diabetes of Adults”
ICA	“Islet-Cell Antibodies”
IAA	“Insulin Autoantibodies”
GAD	“Glutamic Acid Decarboxylase”
CPH	Complexo Principal de Histocompatibilidade
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
TAP	“Transport Antigens Proteins”
LMP	“Low Molecular Weight Proteins”
IDDM1	“Insulin Dependent-Diabetes Mellitus 1”
PCR	“Polymerase Chain Reaction”
TNF	“Tumor Necrosis Factor”
HSP	“Heat Shoc Protein”
BF	“B Factor”
pb	pares de base
RR	Risco Relativo
P	Probabilidade
qsp	quantidade suficiente para
rpm	rotação por minuto
min.	minuto
ml	mililitro
mM	milimolar
μl	microlitro
μg	micrograma
pM	picomol
U	unidade
C	Celsius
$\bar{X}$	média
DP	desvio padrão

Resumo

Distribution of HLA-DRB1 alleles in patients with Diabetes Mellitus Type 1 of Campinas (SP) and region

HLA class II genes are strongly associated with susceptibility and resistance to type 1 diabetes mellitus (DM-1). The present study reports the HLA-DRB1 genotyping of 41 DM-1 patients and 99 healthy subjects, Campinas (SP) and region. Both groups consisted of an ethnic mixture of Caucasian, African Negro and Amerindian origin. HLA-DRB1*03 and *04 alleles were found at significantly higher frequencies among DM-1 patients compared to the controls (DRB1*03: 48.8% vs 18.2%, $P < 0.005$, RR = 4.27; DRB1*04: 43.9% vs 15.1%, $P < 0.008$, RR = 4.37) and were associated with a susceptibility to the disease. DRB1*03/*04 heterozygosity conferred a strong DM-1 risk (RR = 5.44). In contrast, the HLA-DRB1*11 allele frequency was lower among DM-1 patients (7.3% vs 32.3% in controls), but the difference was not significant. These data agree with those described for other populations and allow genetic characterization of DM-1 in Brazil.

The distribution of HLA-DRB1 alleles in the control population of the Campinas region (n=99) revealed the higher frequencies of DRB1*11, *01 and *03. The present report contributes to the HLA-disease association studies in this region of the Southeast of Brasil.

Summary

Distribuição dos Alelos HLA-DRB1 em Pacientes com Diabetes Melito Tipo 1 de Campinas (SP) e Região

Os genes HLA de classe II estão fortemente associados com a suscetibilidade e a resistência ao desenvolvimento do Diabetes Melito Tipo 1 (DM-1). O presente estudo relata a genotipagem de 41 pacientes com DM-1 e 99 controles sãos, do Sudeste do Brasil (região de Campinas, SP). Ambos os grupos consistiram de uma mistura étnica oriunda de caucasóides, negros africanos e ameríndios. A frequência dos alelos HLA-DRB1*03 e *04 foi significativamente maior entre os pacientes com DM-1, comparado ao grupo controle (DRB1*03: 48,8% vs 18,2%, $P < 0,005$, RR = 4,27; DRB1*04: 43,9% vs 15,1%, $P < 0,008$, RR = 4,37), sendo estes alelos associados com a suscetibilidade à doença. O heterozigoto DRB1*03/*04 conferiu um forte risco para o desenvolvimento do DM-1 (RR=5,44). Por outro lado, a frequência do alelo HLA-DRB1*11 foi menor entre os pacientes com DM-1 (7,3% vs 32,3, em controles), mas a diferença não foi significativa. Estes dados concordam com os descritos para outras populações e permitem a caracterização do DM-1, no Brasil.

A distribuição dos alelos HLA-DRB1, na população controle da região de Campinas (SP), revelou as maiores frequências dos alelos DRB1*11, *01 e *03. O presente estudo contribui para os estudos de associação entre HLA e doenças, nesta região do Sudeste do Brasil.

I. Introdução

I.1. DIABETES TIPO 1

O Diabetes Melito Tipo 1 (DM-1) é uma doença auto-imune sindrômica, causada pela perda da tolerância imunológica de linfócitos T a constituintes das células β pancreáticas, que, ao serem destruídas, geram deficiência endógena de insulina (ROSSINI et al., 1993). Classicamente, foi identificado como sendo de início agudo, acometendo crianças e adolescentes e, atualmente, recebe a denominação de Diabetes Tipo 1 (THE EXPERT COMMITTEE, 1997).

Com a introdução de marcadores genéticos, os critérios diagnósticos atuais para a identificação do DM-1 propiciaram a inclusão de outras formas da doença. ZIMMET e colaboradores (1994) propuseram uma outra categoria da doença, Diabetes Auto-imune Latente em Adultos ou LADA (do inglês, "Latent autoimmune diabetes in adults"), denominada também de DM-1 de início tardio. Estes pacientes desenvolveriam o DM-1 de forma não clássica, usualmente após a idade de 20 anos, constituindo uma significativa, embora ainda não definida, proporção de diabéticos adultos. São também relevantes outras observações compiladas por ZIMMET (1995) sugerindo que, um pequeno subgrupo de mulheres com Diabetes Melito Gestacional (DMG) apresentaria uma forma lenta de DM-1 (aproximadamente 2% dos casos).

O conjunto destes dados corrobora o aspecto sindrômico do DM-1, considerado, então, como um grupo de doenças com determinismo poligênico e multifatorial, incluindo fatores ambientais, como dieta e infecções (SCHRANZ & LERNMARK, 1998). Sendo assim, admitem-se vários fatores imunopatogênicos, cuja elucidação é complexa e agravada pela indefinição do auto-antígeno primário da doença.

Na patogênese do DM-1, o papel da imunidade celular T foi demonstrado através das seguintes observações: a) presença de insulite, com predominância de linfócitos T (GEPTS & LECOMPTE, 1981); b) citotoxicidade linfocitária T antipancreática *in vitro* (BOITARD et al, 1981); c) presença de linfócitos T reativos *in vitro* a possíveis auto-antígenos da célula β

(HARRISON et al., 1992); d) obtenção de remissões clínicas do DM-1 com a utilização de imunossupressores T (BOUGNÈRES et al., 1988).

Estudos imunometabólicos sobre o DM-1 conduziram à proposição da história natural da doença. Decorrente da hiperglicemia, o aparecimento dos sintomas clínicos clássicos ocorre tardiamente, com respeito ao início da doença auto-imune, no pâncreas. É necessária uma destruição de aproximadamente 80% da massa de células β insulino-secretoras para que se desenvolva o DM-1 clínico (GEPTS & LECOMPTE, 1981).

Há evidência de anomalias do metabolismo glucídico (diminuição da primeira fase de insulino-secreção), vários meses antes da instalação dos sintomas clínicos. Esta evidência foi demonstrada de forma repetida, em gêmeos monozigóticos e familiares de diabéticos Tipo 1, sugerindo a existência de uma fase prolongada, denominada pré-diabetes clínico (SRIKANTA et al., 1983). Esta fase foi também caracterizada pela presença de auto-anticorpos circulantes, existentes vários meses ou anos, antes da manifestação do DM-1 clínico. Os auto-anticorpos considerados marcadores imunológicos da doença, são: anticitoplasma de células de ilhota (“ICA: do inglês, islet-cell antibodies”) (BONIFACIO et al., 1989); anti-insulina (“IAA: do inglês, insulin autoantibodies”) (PALMER et al., 1983); IA-2, IA-2 β (THE EXPERT COMMITTEE, 1997) e anti-GAD (“GAD: do inglês, glutamic acid decarboxylase”) (BAEKESKOV et al., 1990).

No Brasil, ainda não existem dados precisos sobre a prevalência do DM-1. Um estudo epidemiológico sobre a prevalência do Diabetes Melito (MALERBI et al., 1992) avaliou uma população urbana de nove cidades, com faixa etária entre 30-69 anos, sem discriminação entre as categorias da doença. Foi documentada uma taxa de 7,6%, para Diabetes Tipo 2, comparável à encontrada nos países industrializados. A proporção de indivíduos diabéticos tratados por insulina foi de 0,6%, podendo-se considerá-la, entretanto, subestimada, devido tanto à elevada

taxa de mortalidade por Diabetes no Brasil, como também à exclusão da população pediátrica. Em escala nacional, estes dados representaram a importância do seguimento do estudo, em, para se obter uma indicação precisa da prevalência do Diabetes, nas categorias Tipo 1 e Tipo 2, de acordo com as particularidades do País, caracterizado por migrações internas e vários grupos raciais.

1.2. DIABETES TIPO 1 E SISTEMA HLA

LILLY, BOYSE & OLD (1964) demonstraram que, em camundongos, a suscetibilidade a certas leucemias era controlada por genes do CPH (Complexo Principal de Histocompatibilidade), inspirando a realização de estudos sobre a associação entre doenças e antígenos HLA. Em humanos, a associação entre HLA-B27 e Espondilite Anquilosante representou um marco histórico no estudo de associação entre genes HLA e suscetibilidade a doenças (SCHLOSSTEIN et al., 1973). Posteriormente, numerosos estudos foram realizados, abrangendo diversas patologias (TIWARI & TERASAKI, 1985).

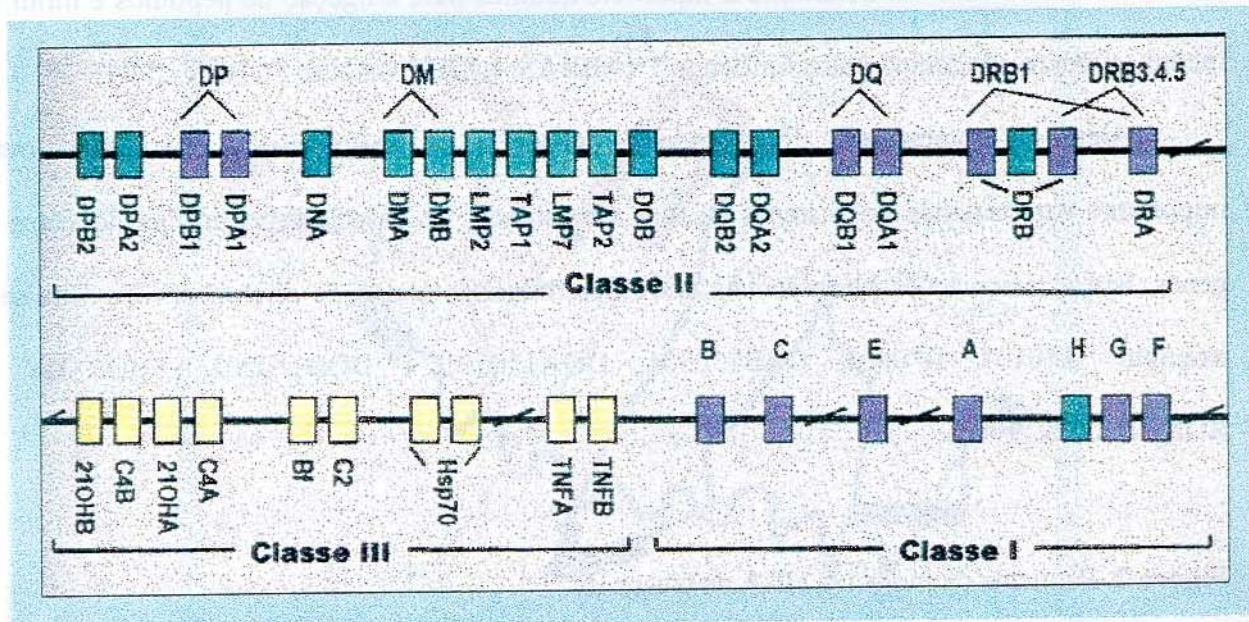
No início dos anos 1970, observações clínicas em populações caucasóides, sugeriram a existência de suscetibilidade familiar para o desenvolvimento do DM-1, assim como de outras doenças auto-imunes (SINGAL & BLAJCHMAN, 1973; NERUP et al., 1974). Foi feita uma associação com genes de uma região polimórfica, localizada dentro do CPH humano, denominada Sistema HLA. A disponibilidade de marcadores sorológicos para os produtos dos genes HLA de classe I (A, B e C) permitiu não apenas estabelecer sua ligação genética com as doenças (antígenos HLA B8 e B15 com DM-1), mas também iniciar estudos sobre o papel fundamental dos produtos do CPH na regulação da resposta imunológica.

O interesse pelo estudo do Sistema HLA decorre do fato de o mesmo ser o mais polimórfico descrito, no homem, e da observação de que numerosas doenças apresentam

associação com os antígenos HLA (COLOMBANI, 1992). Trata-se de um conjunto de aloantígenos, cuja importância foi conhecida, inicialmente, no campo dos transplantes de tecidos e órgãos, e, por isso, são também denominados como antígenos de histocompatibilidade. Atualmente, estas moléculas são consideradas elementos fundamentais para o reconhecimento antígeno e desenvolvimento de resposta imunológica (COLOMBANI, 1992).

A região HLA está situada no braço curto do cromossomo 6 humano (6p21.3), compreendendo um segmento de DNA de aproximadamente 3.500 kb. Os genes do Sistema HLA estão divididos em três regiões, sendo denominados como: genes HLA de classe I, classe II e classe III, cuja organização está esquematizada na Figura 1. Os genes HLA classe I (A, B, C) e classe II (DR, DQ, DP) codificam glicoproteínas de superfície celular, que correspondem aos antígenos HLA classe I (antígenos HLA-A, -B, -C) e classe II (antígenos HLA-DR, -DQ, -DP), respectivamente. Dentro da região HLA de classe II, foram identificados os genes que codificam as proteínas transportadoras de peptídeos (genes TAP1, TAP2) e os que codificam complexos protéicos de degradação de peptídeos (genes LMP2, LMP7). Os genes HLA classe III codificam diversas proteínas, entre elas: as do sistema complemento (C2, Bf, C4a, C4b); fator de necrose tumoral (“TNF: do inglês, tumour necrosis factor”; $\text{TNF}\alpha$ e $\text{TNF}\beta$); e proteínas do choque térmico (“HSP: do inglês, heat shock protein”) (revisão de NEPOM & NEPOM, 1995).

Figura 1. Organização gênica da região HLA



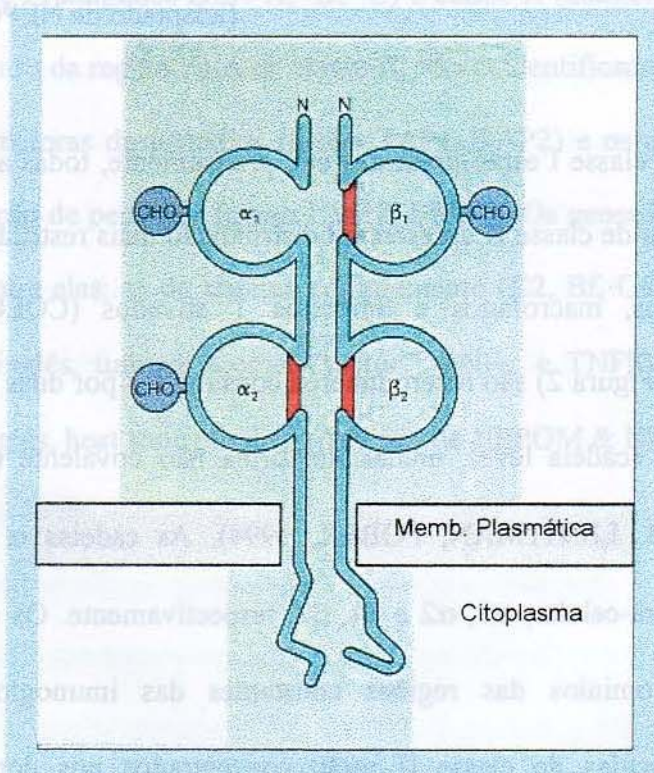
(adaptado de NEPOM & NEPOM, 1995)

Os antígenos de classe I estão presentes em, praticamente, todas as células nucleadas do organismo. Os antígenos de classe II apresentam distribuição mais restrita, estando presentes em linfócitos B, monócitos, macrófagos e linfócitos T ativados (COLOMBANI, 1992). As moléculas de classe II (Figura 2) são heterodímeros constituídos por duas cadeias glicoprotéicas, α (cadeia pesada) e β (cadeia leve), unidas de forma não covalente (ROITT, BROSTOFF, MALE, 1991; ABBAS, LICHTMAN, POBER, 1994). As cadeias α e β apresentam dois domínios na região extra-celular, $\alpha 1$, $\alpha 2$ e $\beta 1$, $\beta 2$, respectivamente. Os domínios $\alpha 2$ e $\beta 2$ têm homologia com os domínios das regiões constantes das imunoglobulinas. Os resíduos polimórficos das moléculas de classe II estão concentrados nos domínios $\alpha 1$ e $\beta 1$, que constituem o sítio de ligação ao antígeno, representado na Figura 3 (ABBAS, LICHTMAN, POBER, 1994; COLOMBANI, 1992). No caso da molécula HLA-DR, a cadeia DR α é

invariável, sendo o domínio β_1 da cadeia DR β muito variável. Assim, o polimorfismo genético das moléculas de classe II determina a superfície química para a ligação de peptídeos e influi no reconhecimento antigênico pelos linfócitos T (ABBAS, LICHTMAN & POBER, 1994).

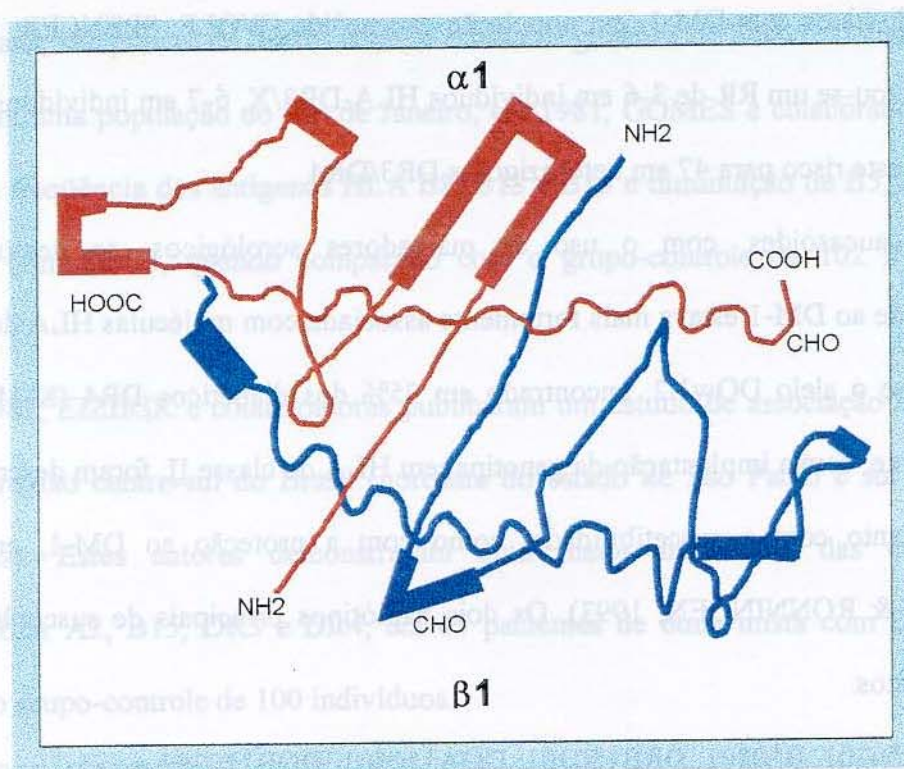
Além da comprovada diversidade de genes e do polimorfismo dos alelos, outra importante característica do Sistema HLA é a existência de desequilíbrio de ligação entre os genes, isto é, associações preferenciais entre determinados alelos de diferentes loci. Cita-se o exemplo: A*0101, B*0801, DRB1*0301, DQA1*0501 e DQB1*0201 (THORSBY & RONNINGEN, 1993).

Figura 2. Esquema da molécula HLA de classe II



(adaptado de ROITT, 1987)

Figura 3. Esquema do sítio antígeno da molécula HLA de classe II



(adaptado de COLOMBANI, 1992)

A implantação de técnicas de tipagem dos genes HLA de classes I e II (WORDSWORTH et al., 1990) permitiu a melhor identificação do polimorfismo desta região. Atualmente, a genotipagem é considerada o método mais preciso. Desde então, os antígenos do Sistema HLA têm sido designados preferencialmente de acordo com os genes que os codificam e sua crescente identificação ultrapassa as disponibilidades de definição sorológica. Foram descritos 87 alelos, para o locus A; 191 alelos, para HLA-B; 44 alelos, para HLA-C; 189 alelos, para HLA-DRB1; 20 alelos, para HLA-DQA1; 32 alelos, para HLA-DQB1; 10 alelos, para DPA1 e 77 alelos, para DPB1 (BODMER et al., 1997).

Inicialmente, através de marcadores sorológicos, a identificação das moléculas HLA de classe II (DR) proporcionou associações mais fortes com o desenvolvimento do DM-1, estabelecendo-se riscos relativos (RR) de suscetibilidade à doença. Os alelos HLA-DR3 e -DR4,

que estão em desequilíbrio de ligação com B8 e B15, respectivamente, foram detectados em 90 a 95% dos indivíduos com DM-1, em população caucasóide (WOLF, SPENCER, CUDWORTH, 1983). Detectou-se um RR de 3-6 em indivíduos HLA-DR3/X, 6-7 em indivíduos HLA-DR4/X, elevando-se este risco para 47 em heterozigotos DR3/DR4.

Em caucasóides, com o uso de marcadores sorológicos, se demonstrou que a suscetibilidade ao DM-1 estava mais fortemente associada com moléculas HLA de classe II DQ, priorizando-se o alelo DQw3.2, encontrado em 95% dos diabéticos DR4 (KIM et al., 1985). Posteriormente, com a implantação da genotipagem HLA de classe II, foram descritos haplótipos associados tanto com a suscetibilidade, como com a proteção ao DM-1, em caucasóides (THORSBY & RONNINGEN, 1993). Os dois haplótipos principais de suscetibilidade são os abaixo-descritos:

- A*0101, B*0801, DRB1*0301, DQA1*0501, DQB1*0201 e
- DRB1*0401, DQA1*0301, DQB1*0302

O principal haplótipo de proteção ao DM-1 descrito foi:

- DRB1*15, DQA1*0102, DQB1*0602.

A região do Sistema HLA representa o maior componente genético do DM-1 já detectado, sendo designada como locus IDDM-1 (DAVIES et al, 1994). Contudo, em caucasóides, ela define somente 30 a 50% da suscetibilidade, descrita em gêmeos monozigóticos (BARNETT et al., 1981). No caso de irmãos HLA idênticos ao do indivíduo afetado, esta taxa cai para 15 a 25% (DESCHAMPS et al., 1984).

A determinação dos genes HLA de classe II permitiu a realização de programas de detecção precoce da doença para a implantação de estratégias de imuno-intervenção (BACH, 1994). Desde então, estes genes são considerados os primeiros marcadores genéticos do DM-1.

1.3. GENÉTICA DO DIABETES TIPO 1 NO BRASIL

No Brasil, são poucos os relatos sobre o estudo da genética do DM-1. Utilizando métodos sorológicos em uma população do Rio de Janeiro, em 1981, GOMES e colaboradores relataram o aumento da frequência dos antígenos HLA B8, B13 e B15 e diminuição de B5, B7 e B12, em 23 pacientes com DM-1, quando comparado com o grupo-controle de 102 indivíduos não aparentados.

Em 1987, EIZIRIK e colaboradores publicaram um estudo de associação HLA e DM-1, realizado na região centro-sul do Brasil (noroeste do estado de São Paulo e sul do estado de Minas Gerais). Estes autores demonstraram uma maior frequência das especificidades sorológicas HLA A2, B15, DR3 e DR4, em 65 pacientes de etnia mista com DM-1, quando comparado ao grupo-controle de 100 indivíduos.

Em 1996, CARRIER e colaboradores descreveram que a variante promotora do gene HLA DQB (denominada QBP 3.21) influiria parcialmente na associação do DM-1 com DQB1 em haplótipos contendo DRB1*04, em 27 famílias residentes em São Paulo (SP).

Os estudos de um grupo de Fortaleza (CE) apresentados no XII “Workshop” Internacional de Histocompatibilidade e DM-1 não revelaram associação da DM1 e o haplótipo DRB1*04, ao compararem 75 pacientes com 37 indivíduos normais da mesma região (dados compilados por CAILLAT-ZUCMAN et al., 1997).

Recentemente, o grupo do Laboratório de Histocompatibilidade do Hemocentro-UNICAMP relatou o primeiro estudo associativo entre HLA-DRB1 e uma população de indivíduos com DM-1, de Campinas e regiões próximas, do estado de São Paulo (MARQUES et al., 1998). Este estudo contribui para o conhecimento da distribuição da frequência dos genes HLA, na população com DM-1, em nosso país, considerando-se o extenso território e a miscigenação racial aqui existentes. A análise tem importância tanto para a caracterização

epidemiológica da síndrome DM-1 no Brasil, como também para a elaboração de programas de detecção precoce da doença, em nosso meio.

II. Objetivos

- 1) Padronizar e implantar a técnica de genotipagem dos alelos HLA de classe II, no Laboratório de Histocompatibilidade do HEMOCENTRO-UNICAMP.
- 2) Caracterizar a frequência dos alelos HLA de classe II, locus DRB1, numa população de indivíduos com DM-1, não aparentados, atendida no Ambulatório de Endocrinologia, do Hospital das Clínicas da UNICAMP, e proveniente de Campinas (SP) e regiões próximas.
- 3) Iniciar um estudo de frequência fenotípica dos alelos HLA-DRB1, na população normal de Campinas (SP) e regiões próximas, e compará-la com outros estudos, nacionais e internacionais.

III. Material e Métodos

III.1. POPULAÇÕES DE ESTUDO

Neste estudo, foram analisados dois grupos de populações, citados abaixo:

1. *GRUPO DE PACIENTES COM DIABETES TIPO 1*, constituído de 41 indivíduos, não aparentados, diagnosticados por sintomatologia de síndrome hiperglicêmica, segundo critérios do NATIONAL DIABETES DATA GROUP (1979), com ou sem cetoacidose, tendo recebido insulino-terapia desde o diagnóstico. Estudaram-se 41 pacientes com idade média, em anos, no momento do diagnóstico de $17,7 \pm 7,9$ ($\bar{x} \pm DP$), sendo 26 mulheres ($25,6 \pm 9,9$) e 15 homens ($27,6 \pm 7,8$). Todos os pacientes foram acompanhados no Serviço de Endocrinologia, do Hospital das Clínicas da UNICAMP, após mostrarem consentimento, por escrito, segundo as determinações da Comissão de Ética da Instituição. Todos os pacientes eram de origem étnica mista, oriundos de cruzamentos entre brancos, negros e índios, e provenientes de Campinas (SP) e regiões próximas.
2. *GRUPO CONTROLE*, constituído de 99 indivíduos sadios, doadores de sangue e funcionários do Hemocentro do Hospital das Clínicas, UNICAMP, sem antecedentes familiares de DM-1, e de origem étnica similar a dos pacientes.

III.2. METODOLOGIA DO ESTUDO

A composição detalhada dos reagentes utilizados e suas referências encontram-se no APÊNDICE.

2.1. Banco de DNA

Foi constituído um banco de DNA genômico dos indivíduos incluídos no estudo. O DNA foi obtido de sangue total periférico, através de adaptações do método rápido de extração de

DNA por sais, procedimento recomendado no XII “Workshop” Internacional de Histocompatibilidade (CHARRON & FAUCHET, 1996), utilizando-se NaCl, e finalização com a técnica clássica de extração por fenol (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS, 1989). O DNA foi, posteriormente, conservado a -20°C.

2.2. Extração de DNA

O sangue foi coletado em tubos de 10ml contendo 0,1 ml de E.D.T.A 10% como anticoagulante. Inicialmente, o sangue foi centrifugado 10 minutos a 1.500 rpm, sendo retirado o plasma e adicionado igual volume de tampão de lise de hemácias, misturando-se por inversão. Após repouso à temperatura ambiente por 15 minutos, o hemolisado foi centrifugado 10 minutos a 2.500 rpm. Removido o sobrenadante, o precipitado de leucócitos foi lisado em 5 ml de solução TKM1 e 125 µl de Triton, misturando-se por inversão e centrifugando-se 10 minutos a 2.500 rpm. Removido o sobrenadante, o precipitado foi ressuspendido com 800 µl de solução TKM2 e 50 µl de SDS 10%. Após misturar-se várias vezes, por inversão, incubou-se durante 30 minutos, a 55°C. Posteriormente, foi adicionado 360 µl de NaCl 5M, misturando-se por inversão e deixando-se em repouso à temperatura ambiente por 10 minutos.

Então, a mistura foi transferida para tubo eppendorf estéril e as proteínas foram precipitadas, centrifugando-se 10 minutos a 12.000 rpm. O sobrenadante foi recuperado, dividido em dois tubos eppendorf, sendo adicionado 500 µl de uma solução, contendo clorofórmio/álcool isoamílico (24:1) e 500 µl de fenol saturado. A amostra foi agitada e centrifugada 20 minutos a 2.500 rpm. A fase aquosa foi transferida para outro tubo estéril, repetindo-se o procedimento com 1000 µl de solução clorofórmio/álcool isoamílico (24:1). Após a transferência da fase aquosa para um novo tubo, a precipitação dos ácidos nucleicos foi conduzida pela adição de acetato de sódio 3M, pH 5,3 (10% de volume) e etanol absoluto gelado (3x volume), agitando-se

por inversão. O DNA precipitado foi recuperado e transferido para outro tubo eppendorf para a realização das lavagens. Inicialmente, o DNA foi lavado com etanol absoluto gelado e, posteriormente, com etanol 70%.

Finalmente, o DNA foi solubilizado em água destilada, deionizada, estéril e teve sua concentração estimada em espectrofotômetro, através do valor da densidade ótica em comprimento de onda 260 nm (SAMBROOK, et al, 1989).

2.3. Genotipagem HLA

Os alelos HLA de classe II do locus DRB1 foram genotipados, utilizando-se técnicas de referência do XII "Workshop" Internacional de Histocompatibilidade (CHARRON & FAUCHET, 1996).

A técnica *PCR-SSO* (do inglês, "Polymerase chain reaction - Sequence-specific oligonucleotide") foi padronizada no Laboratório de Histocompatibilidade do HEMOCENTRO-UNICAMP, através da análise de treze DNAs-controles, fornecidos pelos organizadores do "Workshop". Os oligonucleotídios (recomendados para "primers" e sondas, da tipagem HLA DRB1) foram cedidos pela Dra. Sophie Caillat-Zucman (INSERM U-25, França). O protocolo PCR-SSO para a genotipagem HLA-DRB1 consistiu das seguintes etapas:

a) Reação de PCR

Foi utilizado um par de "primers" para a amplificação específica do segundo exon do locus HLA-DRB1, a partir de, aproximadamente, 0,5 µg de cada amostra de DNA. Citam-se, abaixo, as sequências nucleotídicas dos "primers" utilizados:

- DRB P1: 5' CCGGATCCTTCGTGTCCCCACAGCACG 3'
- DRB P2: 5' TCGCCGCTGCACTGTGAA 3'

As reações de PCR foram realizadas com "Taq Polymerase" (Pharmacia), num aparelho termociclador "DNA Thermal Cycler" Perkin-Elmer Cetus (EUA). Trinta ciclos foram efetuados, consistindo das etapas: desnaturação, 1 min. a 95°C; anelamento, 1 min. a 55°C; extensão, 1 min. a 72°C. As três etapas consecutivas da reação de PCR (com sucessivas repetições) tiveram, como objetivo, a amplificação exponencial da região alvo. Desnaturação em altas temperaturas foi utilizada para a dissociação da dupla hélice de DNA; o anelamento (com temperatura diminuída) permitiu o pareamento dos "primers" com cada fita de DNA alvo, e a extensão a 72°C consistiu do início da síntese de DNA, pela enzima Taq DNA polimerase.

Estas reações foram realizadas em tubos estéreis de 0,5ml, da seguinte maneira:

Tampão 10x para Taq DNA polimerase	10 µl
MgCl ₂ (25 mM)	3 µl
DNTPs (2,0 mM)	10 µl
DRB P1 (25 pM)	1 µl
DRB P2 (25 pM)	1 µl
Taq DNA Polimerase (1 U/µl)	1,25 U (0,25 µl)
H ₂ O destilada estéril	qsp 100 µl
DNA	1 µl

Cada reação de PCR conteve um controle negativo, constituído de: solução PCR, H₂O destilada estéril, Taq DNA Polimerase, sem amostra de DNA.

b) Detecção dos Produtos de PCR

Os fragmentos resultantes da amplificação por PCR (tamanho esperado para DRB1 = 292 pb) foram migrados, eletroforeticamente, em gel de agarose 2% e corados com brometo de etídio (EtBr) na concentração de 0,5µg/ml. Os produtos de PCR foram aplicados em gel e migrados em cuba de eletroforese, com tampão TEB 10x, junto com um marcador de peso molecular de DNA

(100 Base-Pair Ladder, na concentração de 1 µg/µl). O gel foi, em seguida, exposto à luz Ultra Violeta, em transiluminador, acoplado a uma máquina fotográfica Polaroid, sendo os produtos de PCR visualizados e fotografados para documentação.

c) “Dot Blot”: Transferência do DNA em Membrana

As amostras de DNA foram feitas, utilizando-se 2,5 µl do produto amplificado por PCR e 17,5 µl de H₂O estéril. Inicialmente, em aparelho para “Dot Blot” (Minifold DOT BLOT Manifold tipo SRC 96D; Schleicher & Schuell – ref.447910, Alemanha) as membranas foram preparadas para a transferência do DNA. O “Dot Blotter” foi preparado por meio de lavagem com H₂O destilada. As membranas de nylon (Hybond, Amersham) e o papel Whatmann utilizados foram preparados com imersão em H₂O e, posteriormente, em tampão SSPE 10x, sendo ajustados para a recuperação da ordem de depósito das amostras de DNA. No presente caso, utilizou-se a convenção de cortá-los, em ângulo superior direito. As membranas foram, então, ajustadas no “Dot Blotter”, que foi acionado para o depósito das amostras de DNA.

Após o término do depósito das amostras de DNA, as membranas foram colocadas sobre 3 folhas de papel Whatmann, previamente embebidos em NaOH 0,4N, em recipiente plástico, deixando-se 10 minutos. As membranas foram, então, secadas em estufa a +80°C, durante 2 horas, entre dois papéis Whatmann. Os “blots” (membranas com DNA transferido) puderam ser assim conservados, em temperatura ambiente.

d) Marcação das sondas DRB1 com Digoxigenina-ddUTP

As reações de marcação das sondas DRB1 foram realizadas em tubos estéreis de 0,5 ml, utilizando-se kit de Boehringer Mannheim, da seguinte maneira:

Tampão 5x para a enzima Terminal Transferase	4µl
CoCl ₂ 25mM	4µl
Digoxigenina-11-ddUTP(DIG-ddUTP)	1µl
Terminal Transferase	25 U (1 µl)
H ₂ O	qsp 20µl

A mistura foi agitada, em vórtex, centrifugada e incubada 15 minutos a 37°C. Posteriormente, a reação foi bloqueada, incubando-se 30 min. a -80°C. As sondas marcadas foram conservadas a -20°C.

e) Pré-hibridização

Os "blots" foram umidificados em solução SSPE 4x e inseridos em tubos Falcon (50ml), por meio de enrolamento manual, para que as membranas pudessem se aderir às paredes dos tubos. Foram adicionados 10 ml de solução de hibridização (proporção: 0,15 ml/cm² de membrana) e procedeu-se à pré-hibridização dos "blots", durante 30 minutos a 54°C, em forno de hibridização (Hybridization Over/Shaker, Amersham Life Science).

f) Hibridização

A hibridização foi realizada durante uma noite, com a adição das sondas SSO (25 pM/10 ml de tampão de hibridização), marcadas com digoxigenina-11-ddUTP aos tubos contendo as membranas pré-hibridizadas. No total, foram utilizadas 18 sondas DRB1 e 2 sondas DRB3.

Citam-se, a seguir, as seqüências nucleotídicas das sondas utilizadas e suas respectivas especificidades:

Sondas	Sequência Nucleotídica	Especificidades
L11:	5' GTGGCAGCTTAAGTTTGAA 3'	DRB1*01
D11:	5' GCAGCAGGATAAGTATGAG 3'	DRB1*15 + *16
N77:	5' CGGGTGGACAACACTACTGCA 3'	DRB1*03
H33:	5' GATACTTCTATCACCAAGAG 3'	DRB1*04
E58:	5' GCCTGATGAGGAGTACTGG 3'	DRB1*11 + *12
L37:	5' CAGGAGGAGCTCCTGCGCT 3'	DRB1*11 + *12
E71:	5' CCTGGAAGACGAGCGGGCC 3'	DRB1*13 + *14
H60:	5' TGCTGCGGAGCACTGGAAC 3'	DRB1*13 + *14
G11:	5' GTGGCAGGGTAAGTATAAG 3'	DRB1*07
L74:	5' GGCGGGCCCTGGTGGACAC 3'	DRB1*08
Y26:	5' GGGTGC GG TATCTGCACAG 3'	DRB1*09
V11:	5' GGAGGAGGTTAAGTTTGAG 3'	DRB1*010
N37:	5' CAGGAGGAGAACGTGCGCT 3'	DRB1*03 + *06
K71:	5' CTGGAAGACAAGCGGGCCG 3'	DRB1*1303
D37:	5' AGAGGAGGACTTGCGCTTC 3'	DRB1*1501
AV86:	5' CTACGGGGCTGTGGAGAGC 3'	DRB1*15+*16+*0102+*05
Q70:	5' GAGCAGAGGCGGGCCGCG 3'	DRB1*13+*14+*01 + *04
E28:	5' GTTCCTGGAGAGATACTTC 3'	DRB1*03 + *13 + *14
R11:	5' GGAGCTGCGTAAGTCTGAG 3'	DRB3*
H30:	5' GTTCCTGGAGAGACACTTC 3'	DRB3*

g) Lavagens

Após a hibridização, as membranas foram colocadas em recipientes de plástico para os seguintes procedimentos de banho de lavagem:

- 1ª lavagem: 2 vezes, com 100 ml de solução SSPE 2x - SDS 0,1%, durante 15 minutos.
- 2ª lavagem: 2 vezes, com solução TMAC, durante 10 minutos, a temperaturas diferentes, segundo a sonda utilizada, a 59°C, para sondas de 19 pares de base e, a 58°C, para sondas de 18 pares de base.

8) Revelação

A revelação das sondas marcadas com digoxigenina (em “dot blot”) foi realizada por técnica de imuno-deteção, com o auxílio de kits Boehringer Mannheim, tratando-se as membranas conforme descrição abaixo:

- Etapa 1. Incubação, durante 5 minutos, com tampão de revelação I.
- Etapa 2. Incubação, durante 30 minutos, com tampão II.
- Etapa 3. Incubação, durante 1 hora, com tampão II e anticorpos anti-DIG (Fragmento Fab de cabra, conjugado com fosfatase alcalina, diluição: 1/5000), à temperatura ambiente, com agitação contínua.
- Etapa 4. Incubação, novamente com tampão I, 2 vezes, durante 15 minutos.
- Etapa 5. Adição de 2 ml de solução com tampão III contendo Lumigen PPD*, um substrato quimioluminescente para a fosfatase alcalina (diluição: 1/100), cobrindo-se cuidadosamente cada membrana. Fez-se, então, incubação em estufa a 37°C, durante 15 min., ao abrigo da luz. O excesso de tampão foi retirado com papel absorvente e o “blot” envolvido com um plástico tipo Saran.
- Etapa 6. Finalmente, as membranas foram expostas a filmes KODAK, durante 5 a 15 min., à temperatura ambiente e auto-radiografadas.

III.3. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A distribuição dos alelos DRB1 foi comparada, entre pacientes com DM-1 e controles de mesma origem étnica, pelo teste Qui-quadrado, com correção de Yates. Os resultados foram apresentados, comparando-se a distribuição das frequências fenotípicas e alélicas de HLA-DRB1. As frequências fenotípicas representaram a porcentagem (%) de pacientes que possuíam cada alelo DRB1 identificado. As frequências alélicas representaram a porcentagem de

cada alelo, em relação ao total do número de alelos, sobre 2 cromossomos ($2n$). Quando um único alelo DRB1 foi encontrado, o indivíduo foi considerado homozigoto e o alelo foi contado duas vezes. A frequência alélica tem importância para a verificação do efeito dos homozigotos sobre o Risco Relativo para o desenvolvimento da doença.

Os “odds ratios” foram calculados através da fórmula de Woolf e, por convenção, expressos como Riscos Relativos (RR) (TIWARI & TERASAKI, 1985). Quando um elemento foi igual a zero, foi utilizada a fórmula de Haldane para deduzir o RR. O nível de significância foi 0,05. O valor de P foi corrigido pelo método de Bonferroni, multiplicando-se P pelo número de alelos comparados (=13).

IV. Resultados

IV.1. PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA DE GENOTIPAGEM DOS ALELOS HLA DE CLASSE II: DRB1

Inicialmente, procedeu-se à amplificação, por PCR, do segmento correspondente ao segundo exon do gene DRB1, codificador do primeiro domínio, polimórfico, da cadeia DRB. Como matrizes genômicas, foram utilizados treze DNAs-controles, fornecidos pelos organizadores do "XII Workshop de Histocompatibilidade", o que permitiu a avaliação técnica dos laboratórios participantes do encontro. Após correta amplificação deste segmento do gene DRB1, nos treze DNAs controles analisados, foram realizadas as amplificações dos DNAs provenientes de pacientes com DM-1 e de indivíduos controles sadios. Na Figura 4 estão representadas as amplificações correspondentes a um grupo de onze indivíduos controles sadios. Os resultados demonstraram que houve correta e homogênea amplificação do gene DRB1. Os produtos de PCR, migrados eletroforéticamente em gel de agarose 2%, corresponderam ao tamanho molecular esperado, de 292 pb.

Após transferência dos DNAs amplificados, em membrana, procedeu-se à etapa de hibridização, utilizando-se 20 sondas específicas de diferentes alelos HLA-DRB1, marcadas com digoxigenina, no laboratório. Os resultados dos treze DNAs-controles foram submetidos à análise, realizada pela Dra. Sophie Caillat-Zucman (Hospital Necker, Paris), sendo confirmada a eficiência da técnica padronizada no Laboratório HLA-Hemocentro. A genotipagem dos alelos HLA-DRB1 de pacientes com DM-1 e do grupo-controle foi identificada, após revelação das auto-radiografias, como exemplificado nas Figuras 5a e 5b.

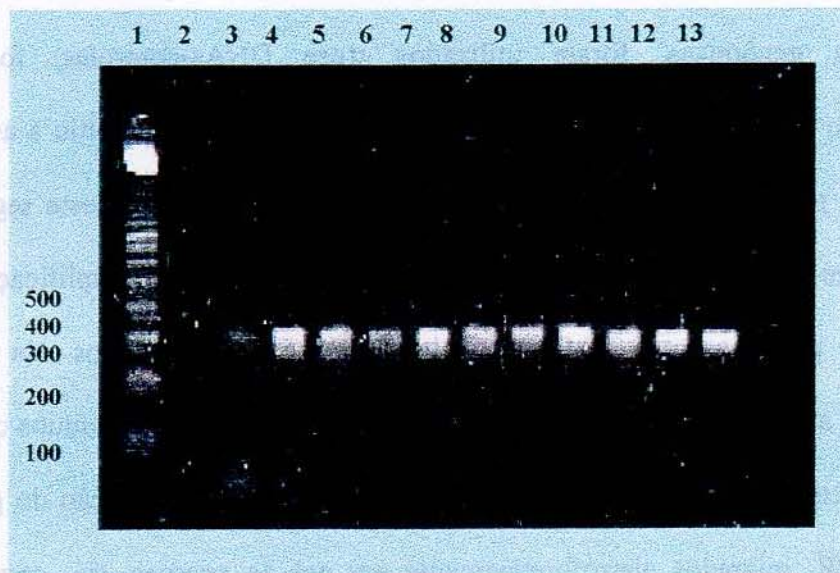


Figura 4. Análise dos produtos da PCR DRB1, sobre gel de agarose 2%. Pista 1: marcador de tamanho de DNA. Pistas 3 a 13: fragmentos amplificados a partir de amostras de DNAs-controles. Pista 2: controle negativo (amplificação, em ausência de matriz).

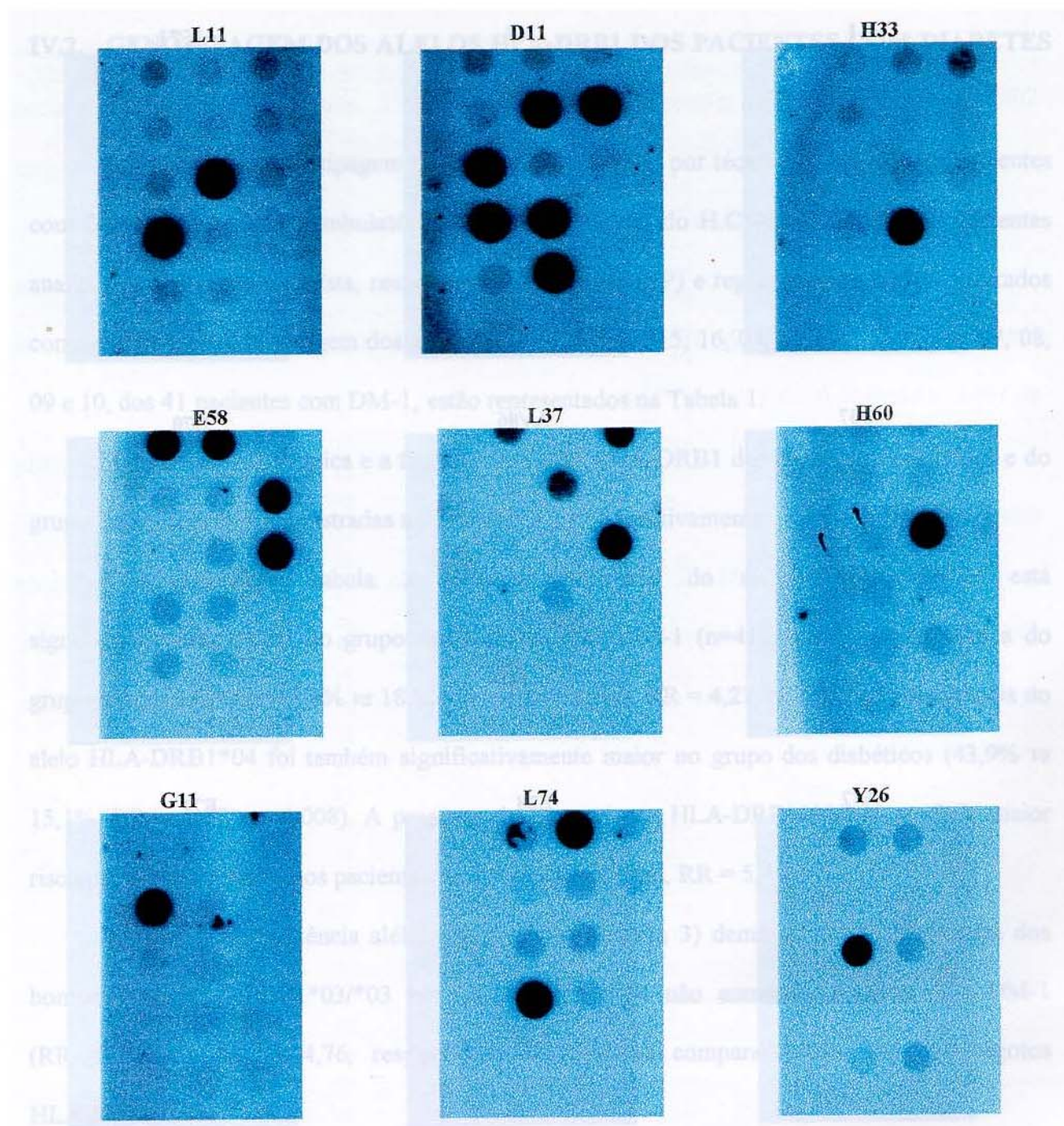


Figura 5a. Identificação de alelos HLA-DRB1 com sondas específicas. Auto-radiografias das membranas, após hibridização com 9 sondas específicas para DRB1. As membranas foram denominadas com a nomenclatura das respectivas sondas DRB1.

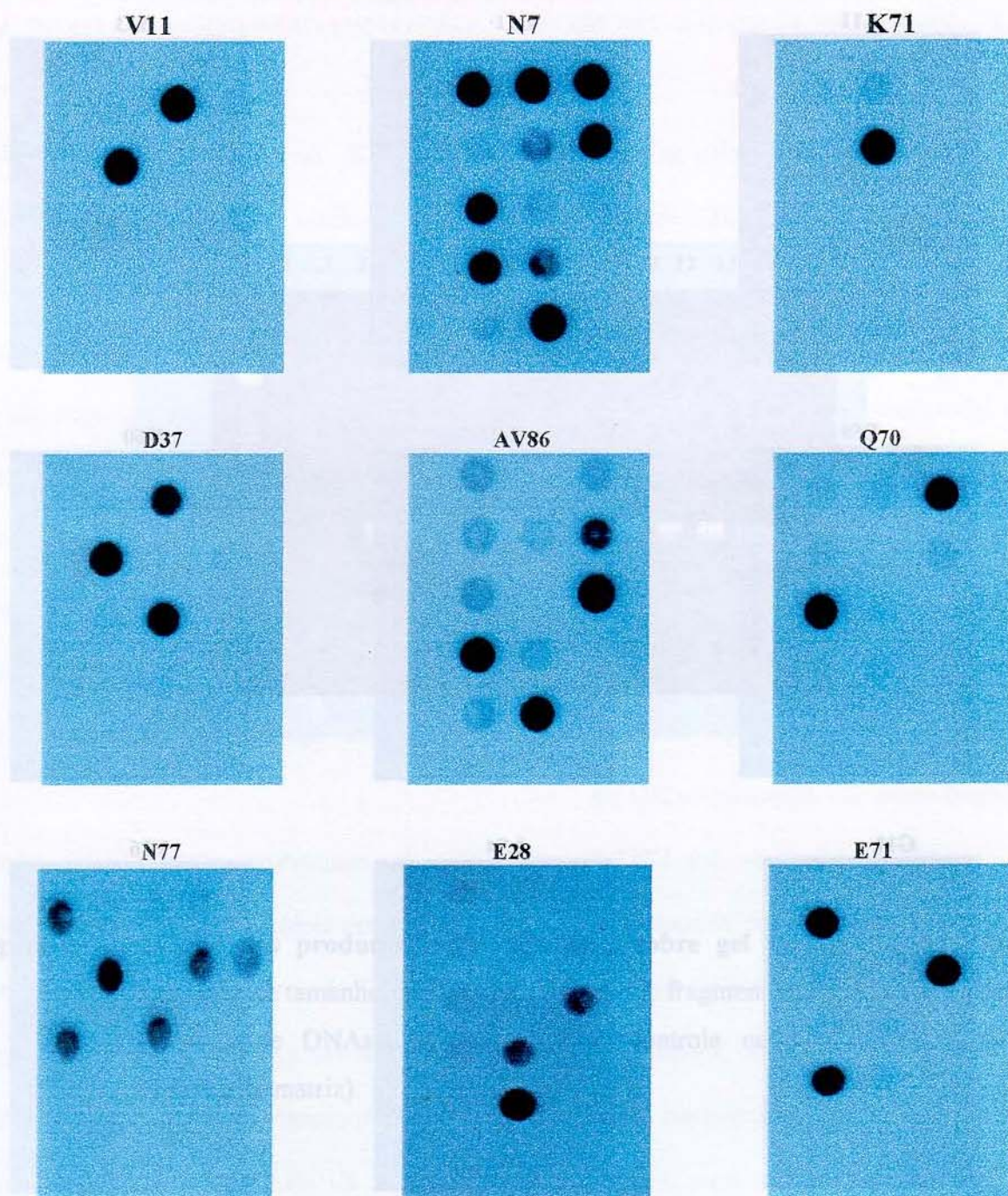


Figura 5b. Identificação de alelos HLA DRB1 com sondas específicas. Auto-radiografias das membranas, após hibridização com 9 sondas específicas para DRB1. As membranas foram denominadas com a nomenclatura das respectivas sondas DRB1.

IV.2. GENOTIPAGEM DOS ALELOS HLA-DRB1 DOS PACIENTES COM DIABETES

TIPO 1

Foi realizada a genotipagem dos alelos HLA-DRB1, por técnica PCR-SSO, em pacientes com DM-1, seguidos no Ambulatório de Endocrinologia, do H.C. - UNICAMP. Os pacientes analisados eram de etnia mista, residentes em Campinas (SP) e regiões próximas. Os resultados correspondentes à genotipagem dos alelos HLA-DRB1 01, 15, 16, 03, 04, 11, 12, 13, 14, 07, 08, 09 e 10, dos 41 pacientes com DM-1, estão representados na Tabela 1.

A frequência fenotípica e a frequência alélica HLA-DRB1 dos pacientes com DM-1 e do grupo-controle estão demonstradas nas Tabelas 2 e 3, respectivamente.

Observa-se, na Tabela 2, que a frequência do alelo HLA-DRB1*03 está significativamente maior no grupo de pacientes com DM-1 (n=41), quando comparada a do grupo-controle (n=99) (48,8% vs 18,2%, respectivamente, RR = 4,27, $p < 0,005$). A frequência do alelo HLA-DRB1*04 foi também significativamente maior no grupo dos diabéticos (43,9% vs 15,1%, RR = 4,37, $p < 0,008$). A presença do heterozigoto HLA-DRB1*03/*04 conferiu maior risco para DM-1 (14,6% nos pacientes vs 3,0% nos controles, RR = 5,44).

A análise da frequência alélica HLA-DRB1 (Tabela 3) demonstrou que a presença dos homozigotos HLA-DRB1*03/*03 e HLA-DRB1*04/*04 não aumentou o risco para DM-1 (RR = 4,13 e RR = 4,76, respectivamente), quando comparado com os heterozigotos HLA-DRB1*03 e *04.

Por outro lado, detectou-se que a frequência do alelo HLA-DRB1*11 estava diminuída nos pacientes com DM-1 (7,3%), ao se comparar com o grupo-controle (32,3%). Entretanto, esta diferença não foi significativa quando o valor de P foi corrigido pelo número de alelos DRB1 testados ($p < 0,02$, antes da correção). As frequências dos outros alelos HLA-DRB1 foi similar em ambos os grupos.

Os resultados obtidos neste estudo foram comparados com a distribuição fenotípica HLA-DRB1, descrita em outros grupos de pacientes com DM-1, avaliando-se crianças e adultos jovens. Os dados encontrados na literatura correspondem, preponderantemente, às populações caucasóides européias, estabelecendo-se a associação positiva entre DRB1*03 e *04 e DM-1.

A Tabela 4 descreve a frequência dos alelos encontrados neste estudo e em caucasóides da França (CAILLAT-ZUCMAN, 1996), Bélgica (BUYSE et al, 1994), Noruega (RONNINGEN et al, 1991) e Sardenia (CUCCA et al, 1993).

A Tabela 5 sumariza a frequência dos alelos DRB1*03 e *04, observada no presente trabalho e em duas populações latino-americanas, do Nordeste brasileiro (CAILLAT-ZUCMAN et al., 1997) e do México (ERLICH et al., 1993). A população mestiça mexicana e a da região de Campinas (SP) apresentaram a mesma associação positiva entre os alelos HLA-DRB1*03 e 04 e pacientes com DM-1. O mesmo não foi constatado entre DRB1*04 e diabéticos do Nordeste brasileiro.

Tabela 1. Genotipagem dos alelos HLA-DRB1 em pacientes com DM-1

Pacientes (n)	HLA-DRB1*
1	03, 04
2	03, 04
3	04, -
4	01, 04
5	03, 04
6	11, 04
7	03, 04
8	03, 12
9	01, 15
10	03, 04
11	03, -
12	03, -
13	04, -
14	03, 15
15	01, 13
16	03, -
17	11, -
18	07, 03
19	04, -
20	04, 15
21	01, 15
22	04, 08
23	03, -
24	13, -
25	15, 11
26	03, 04
27	03, 01
28	07, -
29	03, -
30	07, -
31	03, 13
32	01, 03
33	01, 04
34	04, 07
35	04, 01
36	03, -
37	04, -
38	03, -
39	03, 13
40	04, -
41	13, 07

Tabela 2. Distribuição das frequências fenotípicas HLA-DRB1 em pacientes com DM-1 e no grupo controle

DRB1*	DM-1 (n=41)		Grupo Controle (n=99)		RR	P _c
	n	%	n	%		
01	8	19.5	24	24.2	0.75	NS
15	5	12.2	14	14.1	0.85	NS
16	0	0.0	3	3.0	0.33	NS
03	20	48.8	18	18.2	4.27	< 0.005
04	18	43.9	15	15.1	4.37	< 0.008
11	3	7.3	26	26.3	0.22	**
12	0	0.0	4	4.0	0.25	NS
13	5	12.2	14	14.1	0.85	NS
14	0	0.0	8	8.1	0.13	NS
07	5	12.2	12	12.1	1.00	NS
08	1	2.4	6	6.1	0.39	NS
09	0	0.0	3	3.0	0.33	NS
10	0	0.0	7	7.1	0.15	NS
03/04	6	14.6	3	3.0	5.44	*

As frequências estão representadas como a porcentagem de pacientes e controles com cada alelo.

Os valores de P foram obtidos pelo teste Qui-quadrado e corrigido pelo número dos diferentes alelos DRB1 testados (P_c: multiplicação de P por 13). RR: risco relativo; NS: não significativo.

*: P < 0,03 antes da correção; **: P < 0,02 antes da correção.

Tabela 3. Distribuição das frequências alélicas de HLA-DRB1 em pacientes com DM-1 e no grupo-controle

DRB1*	DM-1 (2n=82)		Grupo-Controle (2n=198)		RR	P _c
	2n	%	2n	%		
01	8	9.7	30	15.1	0.62	NS
15	5	6.1	19	9.6	0.61	NS
16	0	0.0	5	2.5	0.21	NS
03	27	32.9	21	10.6	4.13	< 0.0002
04	23	28.0	15	7.6	4.76	< 0.0002
11	4	4.9	37	18.7	0.22	*
12	0	0.0	4	2.0	0.26	NS
13	5	0.061	18	9.1	0.65	NS
14	0	0.0	9	4.5	0.12	NS
07	7	8.5	15	7.9	1.14	NS
08	1	1.2	6	3.0	0.38	NS
09	0	0.0	4	2.0	0.26	NS
10	0	0.0	9	4.5	0.12	NS

As frequências estão representadas como a porcentagem de cada alelo sobre o número total de alelos (2n). Quando um único alelo DRB1 foi encontrado, considerou-se como homozigota, e o mesmo foi contado duas vezes; RR, risco relativo; os valores de P foram obtidos pelo teste Qui-quadrado, e corrigidos pelo número dos diferentes alelos DRB1 testados (P_c: multiplicação de P por 13); NS: não significativo; *: P < 0.006 antes da correção.

Tabela 4. Frequência dos alelos HLA-DRB1*03 e *04 observada neste estudo e em diferentes populações caucasóides com DM-1 e grupos-controles, descritas na literatura

Alelos HLA- DRB1	Presente estudo		caucasóides franceses (CAILLAT- ZUCMAN, 1996)		caucasóides belgas (BUYSE et al, 1994)		caucasóides noruegueses (RONNINGEN et al, 1991)		caucasóides da Sardinia (CUCCA et al, 1993)	
	P	C	P	C	P	C	P	C	P	C
	n=41	n=99	n=645	n=679	n=208	n=204	n=87	n=181	n=120	n=89
03	48,8	18,2	34,0	13,5	32,4	11,5	54,0	27,0	87,5	39,0
04	43,9	15,1	35,0	14,7	36,5	12,0	88,0	37,0	51,1	17,0
03,04	14,6	3,0	31,9	3,6	NR	NR	NR	NR	NR	NR

P= Pacientes; C= Controles

NR= Não Realizado

Tabela 5. Frequência dos alelos HLA-DRB1*03 e *04 observada neste estudo e em populações de etnia mista com DM Tipo 1 e grupos-controles, descritas na literatura

Alelos HLA- DRB1*	Presente estudo		Indivíduos do Nordeste do Brasil (VIEIRA & CAMPOS, 1997)		Mestiços mexicanos (ERLICH et al, 1993)	
	P	C	P	C	P	C
	n=41	n=99	n=75	n=37	n=84	n=231
03	48,8	18,2	37,3	10,8	21,4	6,9
04	43,9	15,1	34,7	29,7	42,9	24,0
03,04	14,6	3,0	6,7	0,0	NR	NR

P= Pacientes; C= Controles
NR= Não Realizado

IV.3. GENOTIPAGEM DOS ALELOS HLA-DRB1 NO GRUPO-CONTROLE

Foi realizada a genotipagem dos alelos HLA-DRB1, por técnica PCR-SSO, em um grupo constituído de 99 indivíduos sadios, não relacionados, de etnia mista, de Campinas (SP) e regiões próximas. Os resultados correspondentes à genotipagem dos alelos HLA-DRB1* 01, 15, 16, 03, 04, 11, 12, 13, 14, 07, 08, 09 e 10, dos 99 indivíduos controles, foram comparados aos dados publicados, em diferentes populações: mestiças, caucasóides, negróides e orientais (Tabela 6). Neste estudo, os três alelos HLA-DRB1 mais freqüentemente encontrados na população mista, foram, em ordem decrescente: 11, 01 e 03. Por outro lado, os menos encontrados foram os alelos DRB1*16, 09 e 12.

Citam-se, nesta tabela, dois estudos prévios de nosso país (MORAES et al., 1993; CAILLAT-ZUCMAN et al., 1997). O primeiro foi realizado em duas populações: caucasóide e negróide, oriundas da região do Rio de Janeiro (RJ), e o segundo, em uma população mista, de Fortaleza (CE). Os resultados do atual estudo, realizados em uma população de etnia mista, não foram totalmente similares aos observados nos trabalhos acima citados.

Estes dados representam o início do estudo da freqüência dos alelos HLA de classe II, DRB1, por tipagem genômica, na população de Campinas (SP) e regiões próximas.

Tabela 6: Frequência fenotípica HLA-DRB1* observada no grupo-controle deste estudo e em diferentes populações descritas na literatura

Mestiços														Caucasóides				Orientais		Negróides	
Alelos HLA- DRB1*	Campina BRA		MEX ¹	COL ¹	Fortaleza BRA ²	R.J. BRA ³	FRA ⁴	ITA ⁴	SPA ⁴	USA ⁴	JAP ¹	SEN ⁴	USA ⁴	R.J. BRA ³							
	n=99	N=164	N=61	N=37	n=96	n=158	n=281	n=146	n=274	n=195	n=172	n=132	n=72								
01	24,2	8,0	9,0	24,3	22,8	14,0	9,7	15,5	11,1	7,4	1,2	5,3	6,1								
15	14,1	16,8	7,3	10,8	14,5	8,3	7,8	10,8	11,0	15,3	0,0	9,4	23,5								
16	3,0	4,0	2,5	24,3	5,1	3,1	4,9	2,1	0,9	1,7	3,5	2,7	2,7								
03	18,2	3,3	7,3	10,8	14,5	10,9	10,5	6,7	9,9	0,0	12,2	14,2	29,1								
04	15,1	51,1	18,8	29,7	40,2	13,0	6,9	16,7	14,8	21,5	0,9	3,8	9,3								
11	26,3	14,1	13,1	21,6	16,5	11,6	21,6	6,6	7,6	5,4	17,3	13,2	28,7								
12	4,0	0,6	2,5	5,4	3,1	1,7	0,7	0,0	1,9	5,4	0,3	5,0	11,0								
13	14,1	6,5	10,6	18,9	25,9	10,7	10,8	5,9	11,4	8,7	38,2	15,7	23,5								
14	8,1	8,9	7,4	5,4	6,1	3,2	5,2	3,2	3,3	10,3	0,9	1,5	6,8								
07	12,1	6,9	12,3	24,3	27,0	14,0	12,5	18,9	14,4	0,0	7,8	9,8	18,0								
08	6,1	14,4	4,9	10,8	4,0	7,9	3,6	2,1	1,8	12,7	8,3	8,5	6,7								
09	3,0	0,6	0,8	5,4	1,0	1,6	0,2	1,0	1,1	10,8	0,9	2,0	5,5								
10	7,1	0,3	1,6	5,4	3,1	1,6	1,3	1,7	2,6	0,5	4,2	1,9	6,9								

BRA= Brasil; FRA= França; ITA= Itália; SPA= Espanha; USA= Estados Unidos da América; JAP= Japão; SEN= Senegal

1 XII Workshop Internacional de Histocompatibilidade O; 2 Comunicação pessoal; 3 Moraes et al., 1993 O; 4 XI Workshop Internacional de Histocompatibilidade O

V. Discussão

V.1. PADRONIZAÇÃO DA GENOTIPAGEM HLA-DRB1

A genotipagem dos alelos HLA de classe II do locus DRB1 por PCR-SSO foi padronizada no Laboratório de Histocompatibilidade do HEMOCENTRO - UNICAMP. Empregou-se uma metodologia de referência do XII Workshop Internacional de Histocompatibilidade (CHARRON & FAUCHET, 1996), realizado em Saint-Malo, França (1996). Esta padronização consistiu da análise de treze amostras de DNA, fornecidas e conferidas pelos organizadores do Workshop (Dra. Sophie Caillat-Zucman, INSERM-U25, França).

As técnicas de genotipagem dos alelos HLA de classe II estão sendo, preferencialmente, utilizadas como exames de rotina, em diversos centros europeus e norte-americanos. Esta análise tem aplicação em: Transplantes de órgãos e tecidos, na medicina forense e nos estudos de associações com doenças (COLOMBANI, 1992). No Brasil, entretanto, a genotipagem dos alelos HLA de classe II está sendo realizada como rotina somente em poucos laboratórios.

A implantação da genotipagem dos alelos HLA de classe II no Laboratório de Histocompatibilidade do HEMOCENTRO permitirá a abertura de novas linhas de pesquisa, nas áreas de transplante de órgãos e tecidos, e no estudo de associações HLA-doenças, em nosso meio. Além disso, a utilização da genotipagem HLA no HEMOCENTRO apresenta vantagens em comparação à tipagem por sorologia, por ser de maior confiabilidade e de fácil execução.

V.2. DISTRIBUIÇÃO DOS ALELOS HLA-DRB1 EM PACIENTES COM DIABETES TIPO 1

Comprovadamente, os alelos HLA de classe II são os principais marcadores genéticos do DM-1, em todas as populações estudadas (THORSBY, 1997). Atualmente, a genotipagem destes alelos tem importância tanto para a caracterização epidemiológica do DM-1, visto ser uma

doença heterogênea, como também em associação com os marcadores imunológicos, para a aplicação de estratégias de imuno-intervenção (ROSSINI et al., 1993).

No Brasil, o primeiro estudo publicado sobre associação entre HLA classe II (DR) e DM-1 datou de 1987 (EIZIRIK et al., 1987). Este estudo revelou, por análise sorológica dos antígenos HLA, o aumento da frequência de HLA-A2, -B15, -DR3 e -DR4, numa população do centro-sul do país. Estes dados foram concordantes com os inúmeros achados sobre a tipagem dos antígenos HLA, em diabéticos Tipo 1, de diferentes etnias, que demonstraram a forte associação de suscetibilidade à doença com HLA-DR3 e DR4, sobretudo a presença do heterozigoto DR3/DR4 (SUCIU-FOCA et al., 1979; REITNAUER et al., 1981; ZEIDLER et al., 1982; SAKURAMI et al., 1982). Estes trabalhos foram contemporâneos à utilização da tipagem sorológica como a única técnica de rotina para os antígenos HLA.

A implantação das técnicas de tipagem genômica dos alelos HLA de classe II permitiu uma melhor identificação do polimorfismo da região HLA, contribuindo, conseqüentemente, ao maior esclarecimento das associações com doenças auto-imunes (WORDSWORTH et al., 1990). Característicos da região HLA os desequilíbrios de ligação explicariam, em parte, os achados iniciais de associação do DM-1 com os antígenos HLA de classe I.

Em populações caucasóides, o extenso estudo de associação entre HLA e DM-1 revelou que, tanto a suscetibilidade, como a proteção à doença dependem preponderantemente do efeito combinado das moléculas DR e DQ (CAILLAT-ZUCMAN et al, 1997). Em todos os grupos étnicos estudados, caucasóides, negróides e japoneses, suscetibilidade ao DM-1 foi correlacionada, mais fortemente, com os haplótipos DRB1*04, DQA1*0301, DQB1*0302 e DRB1*03, DQA1*0501, DQB1*0201 (THORSBY & RONNINGEN, 1993). Porém, foram descritas particularidades inerentes aos diferentes grupos étnicos estudados. Em indivíduos negróides com DM-1, foi detectado o haplótipo DQA1*0301, DQB1*0201, associado com

DRB1*07. Em japoneses, foram detectados DQA1*0301, DQB1*0303 e DQA1*0301, DQB1*0401, associados com DRB1*09 e *04, respectivamente. Por outro lado, o haplótipo DRB1*15, DQA1*0102, __DQB1*0602 teve um efeito protetor dominante sobre o desenvolvimento da doença.

Neste estudo, foi realizada a genotipagem dos alelos HLA-DRB1 genéricos para análise de associação tipo caso-controle, em um grupo de pacientes com DM-1, clinicamente de início precoce. Os indivíduos com DM-1 e o grupo-controle eram de etnia mista, provenientes de Campinas (SP) e regiões próximas.

Campinas é uma cidade do século XVIII, situada no sudeste do estado de São Paulo, formada por uma população derivada de: caucasóides europeus, originários sobretudo de Portugal, Alemanha, França e Itália; africanos, originários sobretudo do Senegal, e ameríndios (BARRETO, 1995).

Os resultados demonstraram um aumento da frequência de HLA-DRB1*03 (48,8%) e *04 (43,9%) entre os pacientes, quando comparados com o grupo-controle (18,2% e 15,1%, respectivamente). Estes dados foram similares aos principais alelos DRB1 de suscetibilidade ao DM-1, encontrados em todos os grupos étnicos analisados: caucasóides, negróides e orientais, representados por DRB1*03 e *04 (RONNINGEN et al, 1991; BUYSE et al., 1994; CAILLAT-ZUCMAN, 1996).

Na população brasileira com DM-1, avaliada no presente estudo, os riscos relativos (RR) associados com DRB1*03 (RR = 4,27) e DRB1*04 (RR = 4,37) foram do mesmo grau de magnitude aos observados em pacientes caucasóides (RR de 3 a 6, KHALIL et al., 1992).

Nos pacientes diabéticos brasileiros, foi também observada maior frequência de heterozigotos HLA-DRB1*03,*04 (14,6%), em relação ao grupo controle (3,0%). Em populações caucasóides, o risco relativo (RR de 15 a 20) de heterozigose DR3/DR4 associado ao

DM-1 foi sempre maior ao referido à homozigose DR3 ou DR4 (RONNINGEN et al, 1991). No presente trabalho, observou-se, na população brasileira com DM-1 um RR de menor magnitude para heterozigotos DR3/DR4 (RR = 5,44), em comparação aos achados em caucasóides. Estas diferenças podem estar relacionadas à menor amostragem de pacientes deste estudo, e também às características étnicas peculiares desta população de indivíduos brasileiros.

De forma interessante, os resultados do XII Workshop HLA e DM-1 (CAILLAT-ZUCMAN et al., 1997) revelaram que, um grupo de pacientes do nordeste brasileiro não apresentou associação positiva com DRB1*04. Tratava-se de uma população de Fortaleza (CE), constituindo a única exceção da conhecida associação entre DR4 e DM-1, até então descrita. A explicação para tal fato encontra-se nos dados do estudo de Fortaleza, gentilmente fornecidos pela Dra. Laise Vieira, e apresentados nas Tabelas 5 e 6. Houve uma frequência aumentada de HLA-DRB1*04, no grupo-controle de Fortaleza (29,7% vs 15,1%, do grupo-controle de Campinas), que não difere significativamente do grupo de diabéticos cearenses. No entanto, deve ser ressaltada que a baixa amostragem de indivíduos-controles avaliados de Fortaleza (n = 37) pode ter influenciado diretamente estes resultados.

Outro fator importante a ser considerado é a proposição de que diferentes subtipos DRB1*04 (DRB1*0401 a 0420) modulariam diretamente o efeito de predisposição ou de proteção ao DM-1, de maneira independente do locus DQB1, como descrito no estudo colaborativo do XII Workshop HLA e DM-1 (CAILLAT-ZUCMAN et al., 1997). A distribuição dos subtipos DRB1*04 apresentou, porém, grande heterogeneidade, segundo o grupo étnico estudado, o que influiu no determinismo do DM-1. Um exemplo é o da população mestiça mexicana, onde foi observado que DRB1*0404 determinava um efeito de forte predisposição ao DM-1, sendo que o mesmo alelo representava efeito protetor em populações caucasóides.

Assim sendo, uma heterogeneidade na distribuição dos subtipos DRB1*04 seria uma hipótese atraente para explicar as diferenças descritas entre as populações brasileiras de Campinas (SP) e Fortaleza (CE), que têm etnias diferentes. No futuro, será fundamental nova análise com determinação dos subtipos dos alelos HLA-DRB1*04, e maior amostragem populacional, para elucidar seu efeito na predisposição e/ou proteção ao DM-1, em estudos de associação tipo caso-controle no Brasil.

Por outro lado, o estudo da população de Campinas demonstrou tendência à menor frequência de HLA-DRB1*11, nos pacientes com DM-1, em relação ao grupo-controle, embora a diferença não fosse significativa após correção do valor de P. Outros estudos prévios reportaram uma associação entre DRB1*11 e proteção ao DM-1, em populações não caucasóides, como negros (GARCIA-PACHECO et al., 1992) e norte-africanos (DJOULAH et al., 1992). No presente estudo, não foi observado, entre os pacientes com DM-1, uma diminuição de DRB1*15, alelo este, associado com a proteção à doença em caucasóides, e contido no haplótipo DQA1*0102, DQB1*0602 (THORSBY, 1997). A expansão da amostragem de indivíduos com DM-1 de Campinas também poderá resultar em melhor definição dos alelos DRB1 associados com a proteção à doença.

Os alelos HLA-DRB1 encontrados na população de Campinas deverão ser re-avaliados, em conjunto com a análise dos haplótipos DQA1-DQB1, para se obterem os genes primariamente envolvidos com a suscetibilidade e proteção ao DM-1, em nosso meio.

Recentemente publicado, o estudo desenvolvido neste trabalho foi o primeiro relato a contribuir para o início da definição da natureza da associação entre genes HLA e DM-1, clinicamente de início precoce, na população brasileira. Esta população é considerada de grande complexidade étnica, visto que todas as combinações raciais são possíveis. A alta taxa de miscigenação implicaria, como foi observada neste trabalho, maior amostragem de indivíduos a

serem avaliados, em estudos de associação entre HLA e DM-1 no Brasil. Ressalta-se a importância de se definir a região do país, do ponto de vista de sua formação étnica, pois existem diferenças raciais entre as várias regiões deste nosso extenso território.

V.3. FREQUÊNCIA DOS ALELOS HLA-DRB1 NO GRUPO CONTROLE

Neste estudo, foi avaliada a frequência dos alelos HLA-DRB1* 01, 15, 16, 03, 04, 11, 12, 13, 14, 07, 08, 09 e 10, em 99 indivíduos, de origem étnica mista, de Campinas (SP) e regiões próximas. Nesta população, os alelos mais frequentemente observados foram, em ordem decrescente, DRB1*11, *01 e *03.

Estes dados foram comparados aos do trabalho de MORAES et al. (1993), realizado também no Brasil, na cidade do Rio de Janeiro (RJ), em duas populações, subdivididas em caucasóide e negróide. Ressalta-se, entretanto, que os autores do estudo do Rio de Janeiro não citaram como a população caucasóide foi selecionada. No caso da população controle de Campinas, foi difícil identificar com precisão a etnia do grupo-controle, não diabético, apesar de os indivíduos de raça negra e de raça oriental terem sido excluídos do estudo. A comparação destes dois trabalhos revela as diferenças na frequência de alguns alelos HLA-DRB1 entre as populações de Campinas (SP) e do Rio de Janeiro (RJ). Os alelos DRB1*04 e *07 estavam aumentados e o DRB1*11 diminuído na população caucasóide do Rio de Janeiro, em relação à população mista de Campinas (SP). Ressalta-se que o referido aumento dos alelos HLA-DRB1*04 e *07, encontrados no Rio de Janeiro, também superaram os achados em outras populações caucasóides (COLOMBANI, 1992 b).

Os alelos HLA-DRB1*01 e *04 foram encontrados diminuídos no grupo negróide brasileiro do Rio de Janeiro, em relação ao grupo misto de Campinas (SP) e a todas as

populações caucasóides citadas na Tabela 6. Esta diminuição parece ser uma característica observada em outras populações negróides estudadas, como as do Senegal e dos USA (Tabela 6).

A frequência dos alelos HLA-DRB1*01 e *10 foi considerada aumentada, tanto na população de etnia mista de Campinas (SP), quanto nas populações estudadas do Rio de Janeiro (RJ) (MORAES et al., 1993), quando comparadas com outras populações de diferentes grupos étnicos.

Na população brasileira, a análise dos genes HLA de classe II é complexa devido, tanto à grande miscigenação racial ocorrente, como também à extensão territorial do país. Futuros estudos deverão abranger, não apenas um maior número de indivíduos, mas também amostragens das várias regiões brasileiras. Somente assim, estes estudos estarão adequados para a análise de frequência dos alelos HLA em nosso país.

VI. Conclusões

1. A técnica de genotipagem HLA-DRB1 por PCR-SSO foi padronizada e implantada com sucesso, no Laboratório de Histocompatibilidade do HEMOCENTRO-UNICAMP. Devido à sua praticidade e especificidade, esta técnica será escolhida para uso em rotina, na realização de exames laboratoriais para seleção imunológica de doadores de tecidos e órgãos e em futuros trabalhos de investigação da associação dos alelos HLA e doenças auto-imunes.
2. Realizou-se o estudo de 41 pacientes com Diabetes Tipo 1 clinicamente de início precoce, de etnia mista, seguidos no Serviço de Endocrinologia, do Hospital das Clínicas da UNICAMP, provenientes de Campinas (SP) e regiões próximas. Este estudo demonstrou o aumento significativo da frequência fenotípica dos alelos HLA-DRB1*03 (48,8 %, $p<0,005$) e *04 (43,9 %, $p<0,008$), em comparação ao grupo-controle ($n=99$; 18,2 % e 15,1 %, respectivamente). Foi também observada maior frequência na população de diabéticos Tipo 1, de heterozigotos HLA-DRB1*03,*04 (14,6 %), em relação ao grupo-controle (3,0 %), que conferiu o maior risco relativo (RR).
3. Procedeu-se a análise dos alelos HLA-DRB1* 01, 15, 16, 03, 04, 11, 12, 13, 14, 07, 08, 09 e 10, em 99 indivíduos, de origem étnica mista, de Campinas (SP) e regiões próximas. Esta análise demonstrou a maior frequência dos alelos HLA-DRB1*11, 01 e 03. A frequência do alelo DRB1*01 da população mista de Campinas (SP) foi similar à encontrada em uma população caucasóide do Rio de Janeiro (RJ) e superior aos achados em outras populações: européias, norte-americana, sul-americanas e africana.

VIII. Referências Bibliográficas

- ABBAS, LICHTMAN, POBER. The major histocompatibility complex. In **Cellular and Molecular Immunology**. W.B.Saunders, Philadelphia, USA, p. 97-114, 1994.
- BACH, J.F. Insulin-dependent diabetes mellitus as an autoimmune disease. **Endocrine Rev.**, 15: 516-42, 1994.
- BAEKESKOV, S.; NIELSON, J.H.; MARNER, B.; BILDE, T.; LUDVIGSSON, J.; LERNMARK, A. Autoantibodies in newly diagnosed diabetic children immunoprecipitate human pancreatic islet cell protein. **Nature**, 298:167-9, 1990.
- BARRETO, M. In Vivendo a História de Campinas. Mercado de Letras – Autores Associados, 1995.
- BODMER, J.G. and WHO Nomenclature Committee Nomenclature for factors of the HLA system, 1995. **Tissue Antigens**, 49:27-321, 1997.
- BOITARD, C.; DEBRAY-SACHS, M.; POUPLARD, A.; ASSAN, R.; HAMBURGER, J. Lymphocytes from diabetics suppress insulin release *in vitro*. **Diabetologia**, 21:41-6, 1981.
- BONIFACIO, E.; BIGLEY, P.; SHATTOCK, M.; DEAN, B.M.; DUNGER, D.; GALE, E.A.M.; BOTTAZZO, G.F. Quantification of islet-cell antibodies and prediction of insulin-dependent diabetes. **Lancet**, 335:147-9, 1989.
- BOUGNÈRES, P.F.; CAREL, J.C.; CASTAÑO, L.; BOITARD, C.; GARDIN, J.P.; LANDAIS, P.; HORS, J.; MIHATSCHI, M.J.; PAILLARD, M.; CHAUSSAIN, J.L. Factors determining early remission of type I diabetes in children with cyclosporin A. *New Engl. J. Med.*, 318:663-70, 1988.
- BUYSE, I.; SANDKUYL, L.A.; ZAMANI GHABANBASANI, M.; GU, X.X.; BOILLON, R.; BEX, M.; DOOMS, L.; EMONDS, M.P.; DUHAMEL, M.; MARYNEN, P.; CASSIMAN, J.J. Association of particular HLA class II alleles, haplotypes and genotypes with susceptibility to IDDM in the belgian population. **Diabetologia**, 37:808-17, 1994.
- CAILLAT-ZUCMAN, S. In **Insulin Dependent Diabetes Mellitus (individual data). XII International Histocompatibility Workshop**, Saint-Malo, 1996.

- CAILLAT-ZUCMAN, S.; DJILALI-SAIAH, I.; TIMSIT, J.; BONIFACIO, E.; SEPE, V.; COLLINS, P.; BOTTAZZO, G.F.; McLAREN, N.; DELAMAIRE, M.; MARTIN, S.; YAMAMOTO, A.M.; McWEENEY, S.; VALDES, A.M.; BABRON, M.C.; THORSBY, E.; CLERGET-DARPOUX, F.; THOMSON, G.; BACH J.F AND THE PARTICIPATING CENTERS. Insulin dependent diabetes mellitus (IDDM): 12th international histocompatibility workshop study. In **Genetic Diversity of HLA- Functional and Medical Implication**. Paris, 1997, p389-398.
- CARRIER, C.; GINSBERG, F.; RUSSO, E.; RUBINSTEIN, P. DRB1, DQA1-QAP, and DQB1-QBP haplotypes in 59 IDDM families. **Human Immunol.**, 47:151, 1996. Abstract
- CHARRON, D.; FAUCHET, R. In **Technical Handbook of the Twelfth International Histocompatibility Workshop**. Paris, HLA et Médecine, 1996.
- COLOMBANI, J. HLA classe II, chaîne inavariante (Ii), gènes et produits, structure et séquences. In **HLA**, 1992:63-68 a.
- COLOMBANI, J. Évolution du CMPI, des gènes et des allèles. La superfamille des immunoglobulines. Génétique des populations. In **HLA**, 1992:91-110 b.
- CUCCA, F.; MUNTONI, F.; LAMPIS, R.; FRAU, F.; ARGIOLOS, L.; SILVETTI, M.; ANGIUS, E.; CAO, A.; DE VIRGILIIS, S.; CONGIA, M. Combination of specific DRB1, DQA1, DQB1 haplotypes are associated with insulin-dependent diabetes mellitus in Sardinia. **Human Immunol.**, 37:85-94, 1993.
- DAVIES, J.L.; KAWAGUCHI, Y.; BENNETT, S.T. A genome-wide search for human type 1 diabetes susceptibility genes. **Nature**, 371:130-136, 1994.
- DJOULAH, S.; KHALIL, I.; BERESSI, J.P.; BENHAMAMOUCH, S.; BESSAOUD, K.; DESCHAMPS, I.; DEGOS, L.; HORS, J. The HLA-DRB1*0405 haplotype is most strongly associated with IDDM in Algerians. **European J. Immunogenetics**, 19:381-389, 1992.
- EIZIRIK, D.L.; MONTEIRO, C.M.C.; VOLTARELLI, J.C.; FOSS, M.C. Frequency of HLA antigens in a brazilian type I diabetic population. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, 20:533-7, 1987.

- ERLICH, H.A.; ZEIDLER, A.; CHANG, J.; SHAW, S.; RAFFEL, L.J.; KLITZ, W.; BESHKOV, Y.; COSTIN, G.; PRESSMAN, S.; BUGAWAN, T.; ROTTER, J.I. HLA class II alleles and susceptibility and resistance to insulin dependent diabetes mellitus in Mexican-American families. **Nature Genetics**, 3: 358-364, 1993.
- GARCIA-PACHECO, J.M.; HERBUT, B.; CUTBUSH, S.; HITMAN, G.A.; ZHONGLIN, W.; MAGZOUN, M.; BOTTAZZO, G.F.; KIERE, C.; WEST, G.; MVERE, D.; BIRO, P.A.; SACHS, J.A. Distribution of HLA-DQA1, -DQB1 and -DRB1 alleles in black IDDM patients and controls from Zimbabwe. **Tissue Antigens**, 40:145-149, 1992.
- GEPTS, W.; LECMPTE, P.M. The pancreatic islets in diabetes. **Am. J. Med.**, 70:105-15, 1981.
- GOMES, M.B.; RUZANY, F.; QUADRA, A.A.; SARNO, E.N.; ARDUÍNO, F. Histocompatibility antigens and insulin -dependent diabetes: a study of 20 brazilian families. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, 14:379-381, 1981.
- HARRISON, L.C.; CHU, S.X.; DeAIZPURUA, H.J.; GRAHAM, M.; HONEYMAN, M.C.; COLMAN, P.J. Islet-reactive T cell are a marker of preclinical insulin-dependent diabetes. **J. Clin. Invest.**, 89:1161-5, 1992.
- KHALIL, I.; D'AURIOL, L.; GOBET, M.; MORIN, L.; LEPAGE, G.; DESCHAMPS, I.; PARK, M.S.; DEGOS, L.; GALIBERT, F.; HORS, J. A combination of HLA-DQ β Asp57-negative and HLA-DQ α Arg52 confers susceptibility to insulin-dependent diabetes mellitus. **J. Clin. Invest.**, 85:1315-9, 1990.
- KHALIL, I.; JU, L.Y.; CARACEDO, J.; LEPAGE, V.; HORS, J.; CHARRON, D. HLA 1992 et diabète insulino-dépendant. In **Journées de Diabétologie**. Ed. Flammarion Médecine-Sciences, 1992:173-81.
- LILLY, F.; BOYSE, E.A.; OLD, L.J. genetic basis of susceptibility to viral leukamogenesis. **Lancet**, II:1207-1209, 1964.

- MALERBI, D.A.; FRANCO, L.J.; THE BRAZILIAN COOPERATIVE GROUP ON THE STUDY OF DIABETES PREVALENCE. Multicenter study of the prevalence of diabetes mellitus and impaired tolerance in the urban brazilian population aged 30-69 yr. **Diabetes Care**, 15: 1509-16, 1992.
- MARQUES, S.B.D.; VOLPINI, W.; CAILAT-ZUCMAN, S.; LIEBER, S.; PAVIN, E.J.; PERSOLI, L.B. Distribution of HLA-DRB1 alleles in a mixed population with insulin-dependent diabetes mellitus from the Southeast of Brazil. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, 31:365-368, 1998.
- MORAES, M.E.; FERNANDEZ-VIÑA, M.; SALATIEL, I.; TSAI, S.; MORAES, J.R.; STASTNY, P. HLA class II DNA typing in two brazilian populations. **Tissue Antigens**, 41:238-42, 1993.
- NEPOM, B.S.; NEPOM, G.T. Polyglot and polymorphism. An HLA update. **Arthritis & Rheumatism**, 38:1715-21, 1995.
- NERUP, J.; PLATZ, P.; ANDERSON, O.O.; CHRISTY, M.; LYGSOE, J.; POULSEN, J.E. HLA antigens and diabetes mellitus. **Lancet**, 2:864-6, 1974.
- PALMER, J.P.; ASPLIN, C.M.; CLEMONS, P.; LYON, K.; IATIPATI, O.; RAGHU, P.; PAQUETTE, T.L. Insulin autoantibodies in insulin-dependent diabetes before insulin treatment. **Science**, 222:1337-9, 1983.
- PETZ-ERLER, M.L.; GORODEZKY, C.; LAYRISSE, Z.; KLITZ, W.; FAINBOIM, L.; VULLO, C.; BODMER, J.G.; EGEA, E.; NAVARRETE, C.; INFANTE, E.; ALAEZ, C.; OLIVO, A.; DEBAZ, H.; BAUTISTA, N.; DE LA ROSA, G.; VASQUEZ, M.N.; NAVARRO, J. L.; PUJOL, M.J.; DURAN, C.; SCHAFFHAUSER, C.; FAUCZ, F.R.; JANZEN, M.; MACIAG, P.; BOLDT, A.B.W.; SOUZA, P.S.A.; PROBST, C.M.; DA SILVA, G.F.; MAKHATADZE, N.; DOMINGUEZ, E.; MONTAGNANI, S.; MATOS, M.; MARTINEZ, A.; HERRERA, F.; HOLLENBACH, J.; THOMSON, G.; PANDO, M.; SATZ, L.; LARRIBA, J.; FERNANDEZ, G.; PESOA, S.A.; BOROSKY, A.; GARAVITO, G.; ANGEL, L.; BROWN, J.; LLOP, E. Anthropology report for region Latin-America: Amerindian and admixed populations.. In **Genetic Diversity of HLA- Functional and Medical Implication**. Paris, 1997, p337-345.

- REITNAUTER, P.J.; ROSEMAN, J.M.; BARGER, B.O.; MURPHY, C.C.; KIRK, K.A.; ACTON, R.T. HLA associations with insulin-dependent diabetes mellitus in a sample of the American black population. **Tissue Antigens**, 17:286-93, 1981.
- ROITT, I.; BROSTOFF, J.; MALE, D. Major Histocompatibility Complex.. In **Immunology**; Gower Medical Publishing, Middlesex-House, London-New York, 1989. p
- RONNINGEN, K.S.; SPURKLAND, A.; IWE, T.; VARTDAL, F.; THORBY, E. Distribution of HLA-DRB1, -DQA1 and -DQB1 alleles and DQA1-DQB1 genotypes among Norwegian patients with insulin-dependent diabetes mellitus. **Tissue Antigens**, 37:105-11, 1991.
- ROSSINI, A.A.; GREINER, D.L.; FRIEDMAN, H.P.; MORDES, J.P. Immunopathogenesis of diabetes mellitus. **Diabetes Rev.**, 1:43-75, 1993.
- SAKURAMI, T.; UENO, Y.; NAGAOKA, K.; KUNO, S.; IWAKI, Y.; PARK, M.S. HLA-DR specifications in Japanese with juvenile-onset insulin-dependent diabetes mellitus. **Diabetes**, 31:105-106, 1982.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. - Purification of nucleic acids. In **Molecular Cloning. A Laboratory Manual**. Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA, 1989 (book 3):E.3.
- SCHLOSSTEIN, L.; TERASAKI, P.I.; BLUESTONE, R.; PEARSON, G.M. High association of an HLA antigen, W27, with ankylosant spondylites. **New Engl. J. Med.**, 288:704-6, 1973.
- SCHRANZ, D.B.; LERNMARK, A. Immunology in diabetes: an update. **Diabetes Metab. Rev.**, 14:3-29, 1998.
- SINGAL, D.P.; BLAJCHMAN, M.A. Histocompatibility (HLA) antigens, lymphocytotoxic antibodies and tissue antibodies in patients with diabetes mellitus. **Diabetes**, 22:429-32, 1973.
- SRIKANTA, S.; GANDA, O.P.; EISENBARTH, G.S.; SOELDNER, J.S. Islet-cells antibodies and beta-cell function in monozygotic triplex and twins initially discordant for type I diabetes mellitus. **New Engl. J. Med.**, 308:322-5, 1983.

- SUCIU-FOCA, N.; RUBINSTEIN, P.; NICHOLSON, J.; SUSINNO, E.; WEINER, J.; GODFREY, M. Juvenile diabetes mellitus and the HLA system. **Transplant. Proc.**, 11:1309-13, 1979.
- TANAKA, H.; TOKUNAGA, K.; INOKO, H.; TSUJI, K.; CHIMGE, N.º; JIA, G.J.; PARK, M H; HAN, H; NOSE, Y.; NAGAO, N; SAITOU, S; AKAZA, T.; JUJI, T. Distribution of HLA-A, B, and DRB1 alleles and haplotypes in Northeast Asia. In **Genetic Diversity of HLA- Functional and Medical Implication**. Paris, 1997, p285-291.
- TIWARI, J.L.; TERASAKI, P.I. The Data and Statistical Analysis. In **HLA and Disease Associations**. Springer-Verlag, new York, USA, 1985. p.18-27.
- THE EXPERT COMMITTEE ON THE DIAGNOSIS AND CLASSIFICATION OF DIABETES MELLITUS. Report of the Expert Committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. **Diabetes Care**, 20:1183-1197, 1997.
- THORSBY, E.; RONNINGEN, K.S. Particular HLA-DQ molecules play a dominant role in determining susceptibility or resistance to type I (insulin-dependent) diabetes mellitus. **Diabetologia**, 36:371-7, 1993.
- THORSBY, E. HLA associated diseases. **Human Immunol.**, 53:1-11, 1997.
- TIWARI, J.L.; TERASAKI, P.I. Malignancy. In: **HLA and Disease Association**, Springer-Verlag, 1985:472.
- TODD, J.A.; BELL, J.I.; MCDEVITT, H.O. HLA-DQ beta gene contributes to susceptibility and resistance to insulin-dependent diabetes mellitus. **Nature**, 329:599-604, 1987.
- WOLF, E.; SPENCER, K.M.; CUDWORTH, A.G. The genetic susceptibility of type-I (insulin dependent) diabetes: analysis of the HLA-DR association. **Diabetologia**, 24:224-9, 1983.
- WORDSWORTH, B.P.; ALLSOPP, C.E.M.; YOUNG, R.P.; BELL, J.I. HLA-DR typing using DNA amplification by the polymerase chain reaction and sequential hybridization to sequence-specific oligonucleotide probes. **Immunogenetics**, 32:413-6, 1990.

- ZEIDLER, A.; FRASIER, S.D.; KUMAR, D.; LOON, J. Histocompatibility antigens and immunoglobulin G insulin antibodies in Mexican-American insulin-dependent diabetic patients. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, 54:569-573, 1982.
- ZIMMET, P.Z.; TUOMI, T.; MACKAY, I.R.; ROWLEY, M.J.; KNOWLES, W.J.; COHEN, M. LANG, D.A. Latent autoimmune diabetes mellitus in adults (LADA) - the role of autoantibodies to glutamic acid decarboxylase in diagnosis and prediction of insulin dependency. **Diabetic Med.**, 11:299-303, 1994.

IX. Apêndice

1. ORIGEM DE REAGENTES ISOLADOS E OUTROS MATERIAIS UTILIZADOS

Nome	Origem/Referências
Acetato de Sódio ($C_2H_3O_2 Na$) PM 82,03	Sigma S-2889
Acido Bórico (H_3BO_3)	Sigma RT-195074
Ácido Clorídrico (HCL) PM 36,46	Synth A1-030
Ácido Etilenodiaminotetra Acético Sal disódico (EDTA) PM 372,2	Sigma RT-195173
Agarose	Gibco-BRL-5510-027
Anticorpos anti-Digoxigenin-AP (Fab fragments) 150 U	Boehringer Mannheim 1093274
Azul de Bromofenol ($C_{19}H_{10}BR_4O_5S$) PM 670,0	Sigma B-6896
Bicarbonato de Amônio (NH_4CO_3) PM 79,06	Sigma A-6141
Brometo Etídio ($C_{21}H_{20}N_3BR$) PM 394,3	Sigma RT-193993
Cloreto de Amônio (NH_4Cl) PM 53,40	Sigma A-5666
Cloreto de Magnésio ($MgCl_2$) PM 203,30	Merck 21.561
Cloreto de Sódio (NaCL) PM 58,44	Merck 106404.1000
DNA de Esperma de Salmão (11mg/ μ l)	Sigma D-9156
Digoxigenina (DIG-11-ddUTP) 25 nmol (25 μ l)	Boehringer Mannheim 1363905
Dodecil sulfato de sódio (SDS) PM 288,4	Sigma L-4390
Etanol absoluto ($C_2H_5O_D$) PM 47,1	Sigma RT-511919
Fenol (C_6H_6O) PM 94,1	Sigma 194011
Ficoll Type 400	Sigma F-4375
Fosfato de Sódio Bibásico (Na_2HPO_4) PM 141,96	Sigma 1.06586
Glicose monohidratada ($C_6H_{12}O_6.H_2O$) PM 198,17	Merck 8342
Hidroquinolina (C_9H_7NO) PM 145,2	Sigma RT-151310
Hidróxido de Sódio (NaOH) PM 40	Sigma S-5881
Leite em pó desnatado	Molico, Nestlé
Lumigen PPD (dil.1/1000)	Boehringer Mannheim 1357328
Marcador de DNA 100 Base Pair Ladder	Pharmacia 274001-01
Membrana Hybond-N+ (roll:0.300m x 3m)	Amersham RPN 303B
Polivinilpirrolidona (PVP-40) PM 40	Sigma 195451
Terminal transferase	Boehringer Mannheim 220582
Tetramethylamonium Chloride (TMAC)	Sigma T-3411
Triton X-100	Sigma T-9284
Trizma ($C_4H_{11}NO_3$) PM 121,1	Sigma T-8524

2. COMPOSIÇÃO E ORIGEM DOS KITS UTILIZADOS

Nome	Origem/Referência
Kit Taq DNA Polimerase	Pharmacia Biotech 27.0799-01
Tampão 10x para Taq	
Cloreto de Potássio (KCl) 500Mm	
Tris – HCl pH 9,0 100Mm	
Cloreto de Magnésio (MgCl ₂) 15Mm	
Taq DNA Polymerase 5000 U/ml	
Kit Desoxi-nucleotídeos trifosfato (dNTPs)	Pharmacia Biotech 27.2035-01
Desoxi-adenosina trifosfato (dATP) 200 µM	
Desoxi-citosina trifosfato (dCTP) 200 µM	
Desoxi-guanidina trifosfato (dGTP) 200 µM	
Desoxi-timidina trifosfato (dTTP) 200 µM	
Kit Terminal Transferase	Boehringer Mannheim 220582
Tampão 5x para TdT	
Cloreto de Cobalto (CoCl ₂) 25 U	
Terminal Transferase (TdT) 500 U	

3. SOLUÇÕES PREPARADAS

3.1. Soluções Estoques

EDTA 0,2 M

- EDTA PM = 372,24 g/mol
- Pesar 7,44 g EDTA p/ 100 ml de H₂O dest. - autoclavar

NACL

- NACL → PM = 58,44 g/mol
- 5M: Pesar 292,2g de NACL p/ 1.000 ml H₂O dest. – autoclavar
- 3M: Pesar 175,32g de NACL p/ 1.000 ml H₂O dest. – autoclavar

NH₄Cl

- Pesar 7,7g p/ 1000ml H₂O dest. – autoclavar

NH₄HCO₃

- Pesar 0,79g p/ 1000ml H₂O dest. – autoclavar

MGCL₂ 1 M

- MGCL₂ → PM = 203,30 g/mol
- Pesar 10,165 g MGCL₂ p/ 50 ml H₂O dest. ou 20,33 g - 100 ml - autoclavar

Tris HCL

- Tris HCL → PM = 121,1 g/mol
- 2M, pH 7,5: Pesar 121,1g Tris p/ 500 ml de H₂O dest. - autoclavar
- 50 mM, pH 8,0:
- 1M, pH 9,5: Pesar 60,5g Tris p/ 500 ml de H₂O dest. - autoclavar

KCL 1 M

- KCL → PM = 74,55 g/mol
- Pesar 121,1g Tris p/ 500 ml de H₂O dest. - autoclavar

S.D.S. 10% (Sódio Dodesil Sulfato)

- Pesar 10g de SDS p/ 100 ml de H₂O

E.D.T.A. 10% (Ácido Etileno Diamino Tetracetiol)

- 10 g de EDTA p/ 100 ml de H₂O dest. (aquecer)

NAOH 10%

- 10 g NAOH p/ 100 ml H₂O estéril

Solução de Clorofórmio / Álcool Isoamílico

- Misturar 24 partes de clorofórmio p/ 1 parte de álcool isoamílico
- (96:4 → 100 ml) armazenar em geladeira

Acetato de Sódio 3M

- Pesar 408,24 g de acetato de sódio (MERCK PM=136,08) e diluir em H₂O dest. Acertar pH p/ 5,2 com ácido acético glacial e completar volume p/ 1.000 ml

3.2 Soluções e Tampões

3.2.1. Extração de DNA

Tampão de Lise de Hemácias

- NH_4Cl :10v e NH_4HCO_3 :1v

Tampões de Lise de Leucócitos

TKM 1

- | | |
|---------------------------------------|---------------------------|
| - 10mM Tris HCl pH 7,6 | 2,5 ml Tris-HCL 2M |
| - 10mM KCl | 5,0 ml KCl 1M |
| - 10mM MgCl_2 | 5,0 ml MgCl_2 2M |
| - 2mM EDTA | 5,0 ml EDTA 0,2M |
| - H_2O deionizada qsp | 500ml |

-

TKM 2

- | | |
|---------------------------------------|--------------------------|
| - 2mM EDTA | 5,0 ml EDTA 0,2M |
| - 10mM Tris HCl pH 7,6 | 2,5ml Tris HCl 2M |
| - 10mM KCl | 5,0 ml KCl 1M |
| - 0,4M NaCl | 40ml NaCl5M |
| - 10mM MgCl_2 | 5,0ml MgCl_2 1M |
| - H_2O deionizada qsp | 500ml |

-

Saturação do Fenol

- O fenol foi colocado em Banho-Maria para se liquefazer, um dia antes do procedimento. Acrescentou-se o tampão antioxidante na mesma proporção de fenol. Para 200 ml de fenol, foi adicionado 0,2 g de hidroxiquinolina 0,1%. A solução foi agitada por 5 minutos. Posteriormente, adicionou-se tampão Tris-HCl 1M (pH 8), na mesma proporção do fenol agitando-se bem por vários minutos em Banho-Maria a 60°C. Após desprezar a fração superior, a saturação foi repetida com Tris 1M, após medição do pH, que deve estar acima de 7,6. A fração superior foi desprezada e nova saturação se realizou com Tris-HCl 0,1M (pH 8). Após agitação, mediu-se o pH da fase aquosa, que deve ser maior que 7,6. A amostra foi armazenada a 4°C, ao abrigo da luz.

3.2.2. Detecção dos Produtos de PCR

TEB (Tris/ EDTA/ ácido bórico) 10x

- Tris	216 g
- Acido Bórico	111 g
- EDTA	14,88 g
- H ₂ O deionizada qsp	1000 ml

Agarose 2,0%

- Agarose	2,0 g
- TEB	10 ml (10x)
- H ₂ O	qsp 100ml

Azul de Bromofenol

- Azul de Bromofenol	0,005g
- Glicose	1,0 g
- H ₂ O deionizada qsp	2,0ml

Brometo de Etídio (EtBr)

- Brometo de Etídio	0,8g
- H ₂ O deionizada qsp	100ml

Observação: Estocar a 4°C e ao abrigo de luz. Por se tratar de substância mutagênica, deve ser manipulada com luvas e máscaras.

3.2.3. Hibridização com Sondas marcadas com Digoxigenina

Solução de Cloreto de Tetrametilamônio 3 M (TMAC)

- | | |
|--------------------|-------------|
| - Tris HCl pH 8 1M | 600 ml |
| - TMAC 5M | 50 ml |
| - EDTA 0,25M | 8 ml |
| - SDS 0,1% | 10ml |
| - H ₂ O | qsp 1000 ml |

Solução de Hibridização para ¼ de blot (preparar 10ml)

- | | |
|--|--------|
| - Solução TMAC | 9,5ml |
| - Solução Denhardt 5x | 0,5ml |
| - DNA de esperma de salmão desnaturado
100µg/ml | 95,2µl |

Denhardt 100x

- Foram dissolvidos 4g de polivinilpirrolidona (PVP) e 4g de Ficoll 400 em água deionizada, completando o volume para 200ml. Em seguida, a solução foi autoclavada por 30 minutos a 100°C. Acrescentou-se, à solução, 4g de albumina fração V (Sigma). Após a filtragem em 0,45 Millipore, a solução foi aliquotada e armazenada a -20°C.

SSPE (Cloreto de Sódio, Fosfato de Sódio e EDTA) 20x

- | | |
|--|---------|
| - NaCl 3,6M | 174 g |
| - NaH ₂ PO ₄ 20 mM | 27,6 g |
| - EDTA 20 mM | 7,4 g |
| - H ₂ O deionizada qsp | 1000 ml |
| - Acertar pH 7,4 e autoclavar | |

Dodecil Sulfato de Sódio 10% (SDS 10%)

- Foram pesados 10g de SDS com aparato de proteção, devido à sua alta toxicidade. A água foi adicionada até completar 100 ml. A solução permaneceu em repouso por uma noite, até sua completa dissolução.

3.2.4. Revelação das Sondas Marcadas com Digoxigenina

Tampão I

- | | |
|-----------------------------------|--------|
| - Tris HCL 2M pH 7,5 | 50ml |
| - NaCl 3M | 50ml |
| - H ₂ O deionizada qsp | 1000ml |

Tampão II

- | | |
|--|----|
| - Leite desnatado em pó | 1% |
| - Tampão I | |
| - Dissolver a 70°C durante 1 hora, sob agitação permanente | |

Tampão III

- | | |
|-------------------------------|------------|
| - Tris HCl 1M pH 9,5 | 120ml |
| - NaCl 3M | 40ml |
| - MgCl ₂ 1M | 60ml |
| - H ₂ O deionizada | qsp 1200ml |