

Escola Superior de Saúde Egas Moniz

Mestrado em Biologia Molecular em Saúde



ASSOCIAÇÃO DO SNP A49G DO GENE
CTLA4 À DIABETES TIPO 1 NA POPULAÇÃO
MADEIRENSE

Tese de dissertação para obtenção do grau de Mestre em Biologia
Molecular em Saúde

Inês da Silva Vieira Nunes de Carvalho

Abril de 2015

Escola Superior de Saúde Egas Moniz

Mestrado em Biologia Molecular em Saúde



ASSOCIAÇÃO DO SNP A49G DO GENE
CTLA4 À DIABETES TIPO 1 NA POPULAÇÃO
MADEIRENSE

Tese de dissertação para obtenção do grau de Mestre em Biologia
Molecular em Saúde

Inês da Silva Vieira Nunes de Carvalho

Orientador: Doutor Hélder Spínola

Abril de 2015

Porque é imprescindível manter a “calma, descontração e estupidez natural”,
dedico esta minha paixão a todos aqueles que me fizeram
manter os pés na terra e que me acarinham
ao longo do caminho.

*Nothing in life is to be feared. It is only to be understood.
Now is the time to understand more, so that we may fear less.*

Marie Curie

Agradecimentos

A todos os que me acompanharam nesta jornada e a todos a quem dei menos atenção devido à falta de tempo e ao *stress* vivido neste último ano, mas que se mantêm sempre por perto, muito obrigada porque sem vocês tudo seria bem mais difícil.

Um especial agradecimento ao Doutor Hélder Spínola, meu orientador, por ter aceitado embarcar nesta minha aventura e pelo apoio, paciência, motivação e preparação para os maus resultados. Obrigada por me ter conseguido enquadrar na sua atarefada agenda, e por tudo o que me ensinou.

À professora Alexandra Maia, por nunca deixar de acreditar na nossa formação e por tanto esforço e aposta neste Mestrado que tanto nos ensinou.

Ao professor Fernando Afonso e à Alexandra Borges que me salvaram e me apoiaram na parte estatística da tese, aquela que mais me fez sofrer todo este caminho!

A todas as pessoas com quem estive diariamente na Universidade da Madeira pela vossa compreensão e receptividade e um especial agradecimento à Rita e à Sara pela simpatia, pelo apoio e motivação e pela disponibilidade que sempre mostraram.

Às minhas colegas, as melhores, pelos fins-de-semana preenchidos, pelo carinho, força e disponibilidade. Por terem tornado esta fase da minha vida muito mais agradável e cheia de boa disposição. E a nós, por termos criado uma nova família com a qual sei que contarei para toda a vida.

Last, but not least...

Aos melhores amigos do mundo pela paciência nas minhas ausências, por ainda assim contarem comigo para as próximas aventuras e pelo orgulho em me ver abdicar de muitas coisas da minha vida para conseguir alcançar este sonho. Apesar de longe, estão sempre por perto.

Aos colegas de trabalho, por compreenderem o cansaço e pelos cafés animados, ainda que poucos, para dar um alento ao dia. Fazem com que me sinta em casa.

À minha família, pelo apoio incondicional, por desculparem todas as minhas ausências ou esquecimentos, pelas mousses de chocolate da mãe e por todo o amor e compreensão durante esta fase atribulada e muito esgotante. Por nunca terem deixado de acreditar que eu era capaz, e por me lembrarem disso vezes sem conta. E pelo enorme orgulho que sinto ao me verem atingir os meus objetivos. São os maiores!

E ao meu apoio incondicional, nos bons e maus momentos, sempre presente. Porque só tu consegues fazer de uma jornada extenuante a melhor da minha vida.

Resumo

A Diabetes Mellitus tipo 1 (DMT1) é uma desordem metabólica de etiologia múltipla, caracterizada pela destruição autoimune de células β das ilhotas de Langerhans pancreáticas. Não há cura para esta doença e as complicações a longo prazo podem causar incapacidade grave, diminuindo a esperança média de vida. A sua etiologia exata e patogénese ainda são desconhecidas.

Com este estudo pretendeu-se verificar se o *Single Nucleotide Polymorphism* (SNP) A49G no gene CTLA4 está associado à suscetibilidade para o desenvolvimento da DMT1 na população madeirense. Para tal, através da técnica de *Restriction Fragment Length Polymorphism* caracterizaram-se 81 amostras de doentes e 98 de controlos para este polimorfismo, procedendo à sua análise estatística e incluindo dados previamente existentes para os genes HLA-DQA1, HLA-DQB1 e HLA-DRB1.

O presente estudo não permitiu confirmar a existência de uma associação entre o SNP A49G CTLA4 e o desenvolvimento da DMT1 nas análises efetuadas apenas com este polimorfismo. Contrariamente, os haplotipos HLA DQA1*03:01-DQB1*03:02-DRB1*04:01 (RE①), DQA1*03:01-DQB1*03:02-DRB1*04:02 (RE②) e DQA1*05:01-DQB1*02:01-DRB1*03:01 (RE④) revelaram-se significativamente mais prevalentes nos doentes e apresentaram valores que confirmam a sua associação ao aumento do risco de desenvolver a DMT1 na população madeirense. Os haplotipos HLA RE① e RE④ apresentam diferenças significativas na sua associação com o genótipo AA do SNP A49G CTLA4, e no que diz respeito à associação do genótipo heterozigótico (AG) aos haplotipos HLA de risco apenas os RE③ (DQA1*03:01-DQB1*03:02-DRB1*04:05) ($p=0,01255$) e RE④ ($p=0,00317$) apresentam diferenças significativas entre doentes e controlos, embora o primeiro possua um OR (0,037) indicador de proteção. Nesse sentido, a identificação da influência do genótipo AG na redução do risco conferido pelos haplotipos HLA RE③ e RE④ no desenvolvimento da DMT1 na população madeirense revela-se um contributo importante para o acompanhamento clínico de crianças de risco para o desenvolvimento de DMT1. Futuros estudos deverão ser desenvolvidos no sentido de permitir o esclarecimento dos resultados encontrados, sendo importante proceder ao aumento da amostra e à inclusão de outros marcadores genéticos.

Palavras-chave: Diabetes Mellitus tipo 1, HLA, CTLA4, População madeirense

Abstract

Type 1 Diabetes Mellitus (T1DM) is a metabolic disorder of multiple etiologies characterized by an autoimmune destruction of pancreatic β cells, from the Langerhans islets. There is no cure for this disease and the long-term complications can cause severe disability, decreasing the average life expectancy. Its exact etiology and pathogenesis are still unknown.

This study aimed to verify if the A49G Single Nucleotide Polymorphism (SNP) in the CTLA4 gene is associated with an increasing susceptibility to develop T1DM among Madeira Island's population. In order to test our hypothesis, we applied the Restriction Fragment Length Polymorphism technique to characterize a sample that comprises 81 diabetics and 98 individuals from Madeira's general population for this polymorphism, followed by statistical analysis with the inclusion of existing data concerning the HLA-DRB1, HLA-DQA1 and HLA-DQB1 genes.

Based on our results, we were not able to confirm the existence of any kind of association between the SNP A49G CTLA4 and its predisposition to develop T1DM. However, the results obtained related with the haplotypes HLA DQA1*03:01-DQB1*03:02-DRB1*04:01 (RE①), DQA1*03:01-DQB1*03:02-DRB1*04:02 (RE②) e DQA1*05:01-DQB1*02:01-DRB1*03:01 (RE④) revealed a significant predominance of these haplotypes among diabetics, which confirms its association with higher T1DM development risks among Madeira's population. There are significant differences between the haplotypes HLA RE① e RE④ and its association with the AA genotype of SNP A49G CTLA4, and regarding AG genotype association with risk haplotypes HLA, only the RE③ (DQA1*03:01-DQB1*03:02-DRB1*04:05) ($p=0,01255$) and RE④ ($p=0,00317$) indicate significant differences between diabetics, although the first RE possess an OR (0,037) protection indicator. The influence of the association between AG genotype and risk haplotypes HLA RE③ and RE④, reduces the risk of these specific haplotypes to develop T1DM among Madeira's population, revealing as an important contribute in treatments among children with a tendency to develop T1DM. Further studies should be performed considering a larger sample and other genetic markers, in order to back-up and clarify our results.

Key words: Type 1 Diabetes Mellitus, HLA, CLTA4, Madeira Island's population

Índice

Índice de Figuras	9
Índice de Tabelas	10
Índice de Gráfico	11
Índice de Anexos	12
Lista de Abreviaturas	13
1. Introdução	15
1.1 Diabetes Mellitus	16
1.1.1 Contexto Histórico	16
1.1.2 Diferentes Classificações	18
1.1.2.1 Diabetes Mellitus Tipo 1	19
1.1.2.2 Diabetes Mellitus Tipo 2	20
1.1.2.3 Diabetes Gestacional	21
1.1.2.4 Outros tipos específicos	22
1.2 Diabetes Mellitus Tipo 1	24
1.2.1 Mecanismos da doença	24
1.2.2 Diagnóstico	26
1.2.3 Prevenção	27
1.2.4 Epidemiologia	28
1.2.5 Causas Patológicas.....	30
1.2.5.1 Suscetibilidade genética	31
1.2.5.2 Autoimunidade	31
1.2.5.3 Fatores ambientais.....	32
1.3 Aspetos genéticos.....	33
1.3.1 HLA	35
1.3.1.1 Haplotipos HLA	36
1.3.2 CTLA4.....	38
1.3.2.1 Polimorfismo A49G do gene CTLA4	39
1.3.3 PTPN22.....	42
1.3.3.1 Polimorfismo C1858T do gene PTPN22	42
1.3.4 Avanços da Biologia Molecular	44

1.4	População em Estudo	46
2.	Objetivos.....	49
3.	Metodologia.....	50
3.1	População em estudo.....	50
3.2	Colheita das amostras.....	50
3.2.1	Amostras de doentes com Diabetes Mellitus tipo 1.....	50
3.2.2	Amostras de casos controlo	50
3.3	Processamento das amostras	51
3.3.1	Extração de DNA genómico a partir de saliva	51
3.3.2	Extração de DNA genómico a partir de sangue periférico	51
3.4	Deteção do polimorfismo A49G do locus CTLA4	51
3.4.1	Amplificação de fragmentos de DNA por PCR.....	51
3.4.2	Controlo da eficiência dos produtos amplificados	52
3.5	Técnica de RFLP.....	53
3.5.1	Enzima de restrição <i>Lsp1109I (BbvI)</i>	53
3.5.2	Eletroforese em gel de agarose 3% (p/v) do produto da digestão	54
3.6	Interpretação dos produtos da digestão	54
3.7	Seleção dos haplotipos HLA.....	55
3.8	Abordagem à caracterização do polimorfismo C1858T no gene PTPN22... 55	
3.8.1	Enzima de restrição <i>RsaI</i>	56
3.8.2	Eletroforese em gel de agarose 3% (p/v) do produto da digestão	56
3.9	Análise estatística.....	57
4.	Resultados	59
4.1	Produtos de PCR	59
4.2	Produto das digestões enzimáticas	60
4.3	Equilíbrio de <i>Hardy-Weinberg</i>	61
4.4	Frequências alélicas e genóticas do polimorfismo A49G CTLA4	61
4.2.2	Distribuição dos haplotipos HLA de risco em casos de doentes com DMT1 e casos controlo	63
4.2.3	Distribuição dos haplotipos HLA de proteção em casos de doentes com DMT1 e casos controlo.....	65
4.2.4	Distribuição genotípica e alélica do SNP A49G CTLA4 em associação com os haplotipos HLA de risco	68

5. Discussão	73
6. Conclusão	80
7. Referências Bibliográficas	82
8. Anexos.....	93

Índice de Figuras

Figura 1. Mecanismos de autoimunidade na DMT1	26
Figura 2. Valores de Diabetes Mellitus apresentados pela OMS referentes ao ano 2013	28
Figura 3. Fatores implicados na autoimunidade	30
Figura 4. Loci de suscetibilidade à DMT1	33
Figura 5. Mapa genético do sistema HLA	36
Figura 6. Esquema para designação da nomenclatura do sistema HLA.....	37
Figura 7. Esquema do processo que leva à destruição das células β na DMT1	40
Figura 8. Recetores de ligação entre o linfócito T CD4+ e a APC.....	41
Figura 9. Esquema de sinalização inapropriada do TCR.....	43
Figura 10. Mapa da localização geográfica das populações estudadas pelo Laboratório de Genética Humana da Universidade da Madeira no que à diversidade dos genes HLA diz respeito (Portugal Continental, Açores, Madeira, Cabo Verde, Guiné-Bissau e São Tomé e Príncipe).....	48
Figura 11. Eletroforese em gel de agarose a 3% (p/v) do produto de PCR de quinze amostras para o polimorfismo A49G CTLA4	59
Figura 12. Eletroforese em gel de agarose a 3% (p/v) do produto de PCR de quatro amostras para o polimorfismo C1858T PTPN22.....	59
Figura 13. Eletroforese em gel de agarose a 3% representativa dos produtos de digestão com a enzima de restrição Lps1 109I para o polimorfismo A49G CTLA4 .	60
Figura 14. Eletroforese em gel de agarose a 3% (p/v) representativa dos produtos de digestão com a enzima de restrição RsaI para o SNP C1858T PTPN22.....	60
Figura 15. GeneRuler 50pb DNA Ladder.....	98

Índice de Tabelas

Tabela 1. Haplotipos HLA definidos como de risco e proteção à DMT1	38
Tabela 2. Distribuição genotípica e alélica correspondente ao SNP A49G do gene CTLA4 em doentes com DMT1 e casos controlo	62
Tabela 3. Distribuição dos haplotipos de risco dos genes HLA-DQA1, HLA-DQB1 e HLA-DRB1 em doentes com DMT1 e casos controlo	64
Tabela 4. Distribuição dos haplotipos de proteção dos genes HLA-DQA1, HLA-DQB1 e HLA-DRB1 em doentes com DMT1 e casos controlo.....	67
Tabela 5. Distribuição genotípica e alélica correspondente ao SNP A49G do gene CTLA4 em associação com os haplotipos de risco elevado DQA1*03:01-DQB1*03:02-DRB1*04:01 e DQA1*03:01-DQB1*03:02-DRB1*04:02, em doentes com DMT1 e casos controlo.....	70
Tabela 6. Distribuição genotípica e alélica correspondente ao SNP A49G do gene CTLA4 em associação com os haplotipos de risco elevado DQA1*03:01-DQB1*03:02-DRB1*04:05 e DQA1*05:01-DQB1*02:01-DRB1*03:01, em doentes com DMT1 e casos controlo.....	71
Tabela 7. Distribuição genotípica e alélica correspondente ao SNP A49G do gene CTLA4 em associação com os haplotipos de risco moderado DQA1*04:01-DQB1*04:02-DRB1*08:01 e DQA1*01:01-DQB1*05:01-DRB1*01:01, em doentes com DMT1 e casos controlo.....	72

Índice de Gráficos

Gráfico 1. Distribuição dos haplotipos de risco dos genes HLA-DQA1, HLA-DQB1 e HLA-DRB1, em doentes com DMT1 e casos controlo	65
--	----

Índice de Anexos

Anexo 1. Protocolo de extração de DNA genómico de amostras de saliva	93
Anexo 2. Protocolo <i>Salting out</i> de extração de DNA genómico de amostras de sangue periférico	94
Anexo 3. Sequências de <i>primers</i> utilizados para amplificação da região alvo.....	95
Anexo 4. Protocolos de preparação dos reagentes utilizados para extração de DNA e controlo de eficácia de reação.....	96
Anexo 5. Tabela de resultados da caracterização das amostras de doentes com DMT1	99
Anexo 6. Tabela correspondente aos resultados da caracterização das amostras dos casos controlo	100

Lista de Abreviaturas

% (p/v) – percentagem expressa em peso por volume

a.C. – Antes de Cristo

A49G – Alteração de uma adenina por uma guanina na posição 49 do gene CTLA4 no locus posicionado no exão 1, no braço curto do cromossoma 2

APC – Célula apresentadora de antigénio

C1858T - Alteração de uma citosina por uma tirosina na posição 1858 do gene PTPN22 posicionado no braço curto do cromossoma 1

Csk - *Tyrosine-protein kinase*

CTL - *Cytotoxic T-Lymphocytes*

CTLA4 - *Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4*

d.C. – Depois de Cristo

DM – Diabetes Mellitus

DMG – Diabetes Mellitus Gestacional

DMT1 – Diabetes Mellitus tipo 1

DMT2 – Diabetes Mellitus tipo 2

DNA – Ácido desoxirribonucleico

dNTPs - Desoxirribonucleótidos

EDTA - Ácido etilenodiaminotetracético

GAD – Descarboxilase do ácido glutâmico

HbA1c – Hemoglobina glicada A1c

HLA – Antigénio Leucocitário Humano (*Human Leukocyte Antigens*)

HWE - Equilíbrio de *Hardy-Weinberg*

IC – Intervalo de confiança

IDDM – *Insulinodependent Diabetes Mellitus*

IFN- γ – Interferão γ

IL-1 β – Interleucina 1 β

IL-2 α – Interleucina 2 α

INS – Gene da insulina

kpb – Kilopares de bases

LADA - *Latent Autoimmune Diabetes in Adults*

Lyp - *Lymphoid Tyrosine Phosphatase*

MHC – Complexo Maior de Histocompatibilidade (*Major histocompatibility complex*)

MODY – *Maturity Onset Diabetes of the Young*

NIDDM - *Noninsulindependent Diabetes Mellitus*

NK – *Natural Killer*

OMS – Organização Mundial de Saúde

OR – *Odds Ratio*

pb – Pares de bases

PCR – Reação da Polimerase em cadeia

PTGO – Prova de tolerância à glicose oral

PTPN22 – *Protein tyrosine phosphatase non-receptor type 22*

RAM – Região Autónoma da Madeira

RFLP - *Restriction Fragment Length Polymorphism*

SNP - *Single nucleotide polymorphism*

TCR - Recetores dos linfócitos T

Th – Linfócitos T *helper*

TNF- α – Fator de necrose tumoral α

Treg – Linfócitos T reguladores

X^2 - Qui-quadrado

1. Introdução

A Diabetes Mellitus (DM), comumente referida como diabetes, é uma desordem metabólica de etiologia múltipla, caracterizada por uma hiperglicémia crónica (WHO, 1999); um aumento anormal dos níveis de glicose no sangue (Kumar, 2004), que ocorre quando o pâncreas não produz insulina suficiente ou quando o corpo não consegue utilizar eficazmente a insulina que produz (WHO, 2014).

A etiologia e fisiopatologia são significativamente diferentes entre os pacientes, ditando diferentes estratégias de prevenção, métodos de rastreio de diagnóstico e tratamentos (Mayfield, 1998). Um longo período de hiperglicémia pode levar a complicações específicas de diabetes, como a retinopatias, nefropatias, neuropatias, entre outros, dependendo da gravidade do distúrbio metabólico, podendo progredir para cetoacidose e finalmente coma (Seino *et al.*, 2010).

A DM está a aumentar a nível mundial, particularmente nos países em desenvolvimento, atingindo mais de 387 milhões de pessoas, correspondendo a 8,3% da população mundial, estando Portugal posicionado entre os países Europeus que registam uma das mais elevadas taxas de prevalência da doença (Whiting *et al.*, 2011) (Correia, 2014). Em aproximadamente 50% destas pessoas, a diabetes ainda não foi diagnosticada, prosseguindo a sua evolução silenciosa. Se os padrões demográficos atuais continuarem, mais de 592 milhões de pessoas serão afetadas com diabetes dentro de uma geração (IDF, 2014).

A Diabetes Mellitus tipo 1 (DMT1) é um distúrbio autoimune caracterizado pela destruição imunológica de células β das ilhotas de Langerhans pancreáticas, produtoras de insulina (Purohit e She, 2008). Apesar da administração de insulina exógena ajudar a manter o nível de glicose no sangue, não há cura para esta doença e as complicações a longo prazo podem causar incapacidade grave, diminuindo a esperança média de vida (Jin e She, 2012).

A etiologia exata e patogénese da DMT1, no entanto, ainda é desconhecida. O modelo da história natural da doença sugere etapas que começam com uma suscetibilidade genética, autoimunidade, sem doença clínica e finalmente diabetes clínicos (Achenbach *et al.*, 2005), sendo que este longo período assintomático oferece excelentes oportunidades para a sua predição e prevenção (Purohit e She, 2008).

Ao longo dos últimos quinze anos, vários grupos iniciaram estudos prospetivos a partir do nascimento, que analisam o desenvolvimento da autoimunidade,

proporcionando uma oportunidade para testar esses modelos teóricos em pacientes que desenvolvem DMT1. Os resultados têm contribuído significativamente para a compreensão atual da patogênese da doença na infância. Sabemos hoje alguns dos fatores genéticos que influenciam o desenvolvimento de autoanticorpos das ilhotas de Langerhans e quais as características dos autoanticorpos das ilhotas que estão mais associados à progressão da DMT1 (Achenbach *et al.*, 2005).

Aqui se insere a importância deste estudo, pois pretende-se contribuir para esclarecer se determinadas características genéticas estão associadas a uma maior predisposição para o desenvolvimento da DMT1, na população madeirense.

1.1 Diabetes Mellitus

1.1.1 Contexto Histórico

A diabetes foi descrita pela primeira vez em 1500 a.C. pelos antigos egípcios, que a consideravam uma condição rara (Polonsky, 2012). Os sintomas da doença estão descritos num papiro egípcio que data de 1552 a.C, o papiro *Ebers*, que se encontra em exibição na biblioteca da Universidade de Leipzig. Este é considerado o documento médico mais antigo e mais importante que se conhece, com relatos de sintomas e receitas para vários distúrbios (Bryan, 1930) (Carpenter *et al.*, 1998). Um parágrafo é dedicado aos sintomas mais fortes da diabetes. Fala de pacientes que emagrecem, sentem uma sede contínua e urinam em abundância. O tratamento incluía folhas de hortelã, dieta e apelos a Ísis e Osíris (Das e Shah, 2011) (ADJ, 2015).

O termo diabetes foi primeiramente utilizado pelo grego Apolónio de Memphis, em 250 a.C. (Ahmed, 2002), mas foi cunhado por Aretaeus (150 d.C.), médico grego a quem se deve a primeira descrição completa da doença (ADJ, 2015) (Feudtner, 2008). Verificou que estes doentes urinavam excessivamente e como resultado nomeou a condição de diabetes, derivado da palavra grega *diabaínein* que significa “passagem” ou “sifão” (Polonsky, 2012) (Ahmed, 2002) (Mimbacas e Javiel, 2010) (Das e Shah, 2011).

É registada pela primeira vez em inglês como “diabete”, num texto médico escrito em 1425 (Ahmed, 2002). A palavra Mellitus, que em latim significa mel, foi adicionada mais tarde, em 1675 por Thomas Willis, numa referência à urina adocicada (Ahmed, 2002) (Mimbacas e Javiel, 2010) (ADJ, 2015).

Em 1776, Matthew Dobson confirmou que o seu sabor doce se devia ao excesso de um tipo de açúcar na urina e no sangue de pessoas com diabetes, apresentando a medida real do aumento da concentração de glicose na urina desses pacientes. Esta medida de concentração tornou-se uma entidade clínica para o diagnóstico da diabetes, reconhecida quando o *New England Journal of Medicine and Cirurgy* foi fundado em 1812 (Polonsky, 2012) (Mimbacas e Javiel, 2010).

Em 1910, Edward Albert Sharpey-Schafer colocou a hipótese de a diabetes se dever à deficiência de uma única substância química produzida pelo pâncreas, à qual deu o nome de Insulina Química, a partir da palavra em latim *insula*, que significa ilha, referindo-se às células das ilhotas pancreáticas de Langerhans (Polonsky, 2012).

O papel endócrino do pâncreas e da insulina no metabolismo não foi clarificado até 1922, quando Frederick Banting, cirurgião canadiano, assistido por um estudante de medicina, Charles Best, demonstraram que podiam reverter a diabetes induzida em cães, com um extrato de células das ilhotas pancreáticas de cães saudáveis (Polonsky, 2012) (Feudtner, 2008) (Mimbacas e Javiel, 2010) (Ionescu-Tirgoviste, 1996). Mais tarde, juntamente com James Collip e John Macleod, purificaram a hormona insulina a partir de pancreases bovinas e foram os primeiros a usá-la para tratar um paciente com diabetes (Polonsky, 2012) (Mimbacas e Javiel, 2010). A produção de insulina para uso terapêutico rapidamente se espalhou por todo o mundo (Polonsky, 2012).

O estudo da diabetes e de aspetos relacionados com o metabolismo da glicose tem sido um terreno tão fértil para a investigação científica que dez cientistas receberam o Prémio Nobel de investigações relacionadas com a diabetes desde 1923, quando Banting e Macleod foram distinguidos com o Prémio Nobel de Fisiologia ou Medicina pela descoberta da insulina (Simoni *et al.*, 2002) (Das e Shah, 2011).

Neste intervalo de 200 anos têm sido alcançados grandes avanços, fundamentais para a compreensão das causas subjacentes da diabetes e da abordagem para a sua prevenção e tratamento (Polonsky, 2012).

Apesar de a diabetes ainda estar associada a uma expectativa de vida mais reduzida, as perspetivas para os pacientes com esta doença têm melhorado consideravelmente. Os pacientes geralmente levam vidas ativas e produtivas por muitas décadas após o seu diagnóstico (Polonsky, 2012).

No entanto, o mecanismo molecular preciso da doença está apenas a começar a ser compreendido. Felizmente, o aumento da noção da variação genética humana veio facilitar a compreensão da suscetibilidade à doença, variando entre indivíduos e

populações. Apesar dos avanços científicos terem levado ao desenvolvimento de estratégias eficazes para a prevenção da diabetes, o caminho para a cura permanece uma incógnita (Polonsky, 2012) (Mimbacas e Javiel, 2010).

1.1.2 Diferentes Classificações

A primeira distinção entre as diferentes apresentações da doença, como é atualmente conhecida, foi publicada em 1936. As diferentes classificações passaram por mudanças na tentativa de obter uma melhor adaptação da organização da nosologia da diabetes. A idade foi o principal critério da primeira classificação, mas foi rapidamente abandonado porque as diferentes formas podem aparecer em qualquer idade. O segundo critério baseava-se na dependência de insulina, fácil de usar na prática clínica, permitindo considerar subgrupos com diferentes mecanismos patogénicos (Mimbacas e Javiel, 2010).

A classificação e os critérios de diagnóstico da doença foram elaborados pelo *National Diabetes Data Group*, em 1979, que produziu um documento de consenso de forma a padronizar a nomenclatura e definições para a DM, pondo fim à confusão existente de terminologias e de critérios de diagnóstico (Paiva, 2001). Este documento foi aprovado pela Organização Mundial da Saúde (OMS), que atribuía dois tipos principais de DM (Mayfield, 1998), baseando-se fundamentalmente numa combinação de manifestações clínicas ou necessidades terapêuticas, representando um compromisso entre a classificação clínica e a etiológica, atribuindo nomes descritivos da sua apresentação clínica: Diabetes Mellitus dependente de insulina (*Insulindependent Diabetes Mellitus - IDDM*) e Diabetes Mellitus não dependente de insulina (*Noninsulindependent Diabetes Mellitus - NIDDM*) diferenciando-as de acordo com as necessidades dos doentes em utilizar insulina para prevenir a cetose (WHO, 1999) (Paiva, 2001) (Mayfield, 1998).

No entanto, como as recomendações terapêuticas evoluíram, a classificação correta do tipo de DM tornou-se confusa, dificultando a definição do tipo correto (Mayfield, 1998). O crescimento do número de casos de DM e o aumento de casos diagnosticados tardiamente, através das complicações crónicas, o reconhecimento da perigosidade da hiperglicémia e a maior informação do valor preditivo dos diferentes níveis da glicémia nas complicações tardias da doença, foram aspetos que contribuíram para a necessidade da revisão dos critérios de diagnóstico (Paiva, 2001).

A descoberta de outros tipos de diabetes com fisiopatologias específicas, que não se adaptavam neste sistema de classificação, complicou ainda mais a situação. A evolução dos conhecimentos em áreas como a genética e a imunologia, tornou ainda mais evidente as limitações desta classificação, levando vários autores nos últimos anos a discutir a necessidade da sua revisão (Paiva, 2001) (Mayfield, 1998).

Assim, em 1995, foi nomeada uma comissão internacional de peritos, a fim de rever a literatura científica desde 1979 e decidir sobre as alterações possíveis a propor, com base nos conhecimentos atuais da etiologia e patogénese (Paiva, 2001).

Atualmente a classificação da DM contempla quatro grandes grupos, classificados de acordo com a fase clínica, que refletem os diferentes graus de hiperglicémia em pacientes individuais (WHO, 1999): Diabetes Mellitus Tipo 1 (DMT1); Diabetes Mellitus Tipo 2 (DMT2); Outros tipos específicos de diabetes e Diabetes Mellitus gestacional (DMG) (Mimbacas e Javiel, 2010) (Seino *et al.*, 2010) (Gross *et al.*, 2002).

1.1.2.1 Diabetes Mellitus Tipo 1

A DMT1 compreende um grupo clínico e geneticamente heterogéneo de doenças que apresentam como característica comum níveis elevados de glicémia (Sesterheim *et al.*, 2007). Resulta da destruição seletiva, autoimune, de células β dos ilhéus de Langerhans, produtoras de insulina, devido a uma infiltração progressiva de células inflamatórias, particularmente por linfócitos T autorreativos. Noutros casos menos comuns, não é possível identificar a existência do processo imunológico, passando a ser denominada de DMT1 idiopática (Pace *et al.*, 2005) (DGS, 2011).

Doentes tipo 1 podem ser metabolicamente normais antes da doença se manifestar clinicamente, mas o processo de destruição das células β pode em última análise levar a insulinopénia absoluta, passando a insulinoterapia a ser indispensável para assegurar a sobrevivência, evitando o desenvolvimento de cetoacidose, coma e morte (WHO, 1999) (Pace *et al.*, 2005).

O quadro de cetoacidose é a expressão máxima da deficiência de insulina e pode também ocorrer na presença de um agente infeccioso, de qualquer etiologia, ou ser decorrente do uso inadequado da insulina (Gross *et al.*, 2002).

Nesta forma de diabetes, a taxa de destruição de células β é muito variável entre cada paciente e a evolução da doença não é aguda, mas sim um processo de

autoagressão lenta que maioritariamente se desenvolve durante anos, numa fase pré-clínica (Sesterheim *et al.*, 2007). O intervalo máximo de tempo após o diagnóstico e até que a insulinoaterapia se torne indispensável, é em geral de 1 a 2 anos (Gross *et al.*, 2002).

A DMT1 corresponde a 5 a 10% de todos os casos de diabetes e é considerada como uma das doenças crónicas mais comuns entre crianças e adultos jovens, podendo-se desenvolver em qualquer faixa etária, mas mais frequentemente antes dos 20 anos de idade (Pace *et al.*, 2005). O pico de incidência ocorre dos 10 aos 14 anos, havendo posteriormente uma diminuição progressiva da incidência até os 35 anos. De tal modo os casos de DMT1 que surgem após esta idade, são pouco frequentes (Gross *et al.*, 2002).

A partir da década de 1980 foi descrita a diabetes de origem autoimune, de instalação insidiosa, denominada de LADA (*Latent Autoimmune Diabetes in Adults*). A idade média dos doentes com LADA situa-se em torno dos 50 anos, pelo que são inicialmente classificados de forma errónea como tipo 2. A LADA partilha com a DMT1 a evidência de autoimunidade e falência de secreção de insulina pelas células β , e com a DMT2 a idade de instalação e a presença de resistência insulínica. Por estas razões, sugeriu-se considerar um tipo distinto de diabetes (Gross *et al.*, 2002).

Em geral, os doentes apresentam índice de massa corporal normal, mas a presença de obesidade não exclui o diagnóstico. Estes pacientes são também propensos à associação com outras desordens autoimunes, como a tireoidite de Hashimoto, doença de Graves, doença de Addison, *miastenia gravis*, entre outras (Mayfield, 1998).

1.1.2.2 Diabetes Mellitus Tipo 2

DMT2 é a forma mais comum da doença, responsável por 90 a 95% dos casos de diabetes. É uma entidade heterogénea, caracterizada por distúrbios da ação e secreção da insulina, resultando na existência de insulinopénia relativa com maior ou menor grau de insulinoresistência (Gross *et al.*, 2002) (DGS, 2011).

Inicialmente, doentes com este tipo de diabetes são resistentes à ação da insulina e ao longo da vida não dependem de insulinoaterapia para sobreviver (WHO, 1999). No entanto, muitos pacientes com DMT2 perdem a função das células β ao longo do tempo e necessitam de insulina para o controle da glicose (McCulloch, 2014).

Frequentemente a DMT2 não é diagnosticada por um longo período, dado que a hiperglicémia se desenvolve gradualmente, muitas vezes não sendo grave o suficiente para provocar sintomas de diabetes. No entanto, estes doentes estão em maior risco de desenvolver complicações micro e macrovasculares (WHO, 1999) (McCulloch, 2014) (Gross *et al.*, 2002) (Seino *et al.*, 2010).

A etiologia específica, responsável pelo desenvolvimento destas irregularidades, ainda não está claramente identificada (Gross *et al.*, 2002) (DGS, 2011). Desenvolve-se em associação a múltiplos fatores genéticos que levam à diminuição da secreção de insulina ou resistência à insulina, aumentada por hábitos de vida, pela idade, obesidade, aumento da percentagem de gordura corporal, hipertensão arterial, dislipidémia e falta de atividade física (Seino *et al.*, 2010). É clinicamente silenciosa na maioria dos casos e é diagnosticada frequentemente em exames de rotina ou no decurso de uma hospitalização por outra causa (Gross *et al.*, 2002) (DGS, 2011) (American Diabetes Association, 2004).

Ocorre mais frequentemente em mulheres que desenvolveram DMG e a sua frequência varia em diferentes subgrupos étnicos (American Diabetes Association, 2004). A idade de início da DMT2 é variável, embora seja mais frequente após os 40 anos, com pico de incidência aos 60 anos. Tem no entanto vindo a aumentar recentemente em crianças e jovens (Gross *et al.*, 2002).

A sensibilidade à insulina pode melhorar com uma redução do peso, aumento da atividade física e tratamento farmacológico da hiperglicémia, mas raramente é restaurado ao normal (American Diabetes Association, 2004).

1.1.2.3 Diabetes Gestacional

A diabetes gestacional corresponde a qualquer grau de anomalia do metabolismo da glicose, resultando em hiperglicémia de gravidade variável, diagnosticado pela primeira vez durante a gestação, podendo ou não persistir após o parto. Não exclui no entanto a possibilidade de a intolerância à glicose anteceder a gravidez, sem ter sido detetada anteriormente. É definida por qualquer grau de tolerância à glicose e aplica-se independentemente da necessidade de recorrer a insulinoaterapia (WHO, 1999).

A etiologia baseia-se em mecanismos patogénicos comuns com a DMT1 e DMT2, sendo os fatores de risco associados à DMG semelhantes aos descritos para a

DMT2, incluindo ainda idade superior a 25 anos, ganho excessivo de peso na gravidez atual, deposição central excessiva de gordura corporal, baixa estatura, crescimento fetal excessivo, polidrâmnio, hipertensão ou pré-eclâmpsia na gravidez atual, antecedentes obstétricos de morte fetal ou neonatal, história prévia de intolerância à glicose, determinados grupos étnicos de alto risco e qualquer grávida com glicémia elevada em jejum (WHO, 1999) (Gross *et al.*, 2002).

O rastreio da diabetes é realizado a partir da primeira consulta pré-natal, utilizando-se a medida da glicose em jejum e com o objetivo de detetar a presença de diabetes pré-existente (Gross *et al.*, 2002).

Após a gravidez, a mulher deve ser reclassificada com base nos resultados de seis semanas ou mais após o parto. Distúrbios do metabolismo da glicose durante a gravidez muitas vezes voltam ao normal, mas deve ser enfatizado que estas mulheres têm um risco aumentado de desenvolver diabetes posteriormente (WHO, 1999).

1.1.2.4 Outros tipos específicos

Novas categorias têm sido acrescentadas aos tipos específicos de diabetes, correspondendo a situações em que a doença se desenvolve por consequência de um processo etiopatogénico identificado, que segundo a Organização Mundial de Saúde se classificam e subdividem em (DGS, 2011) (Paiva, 2001) (Gross *et al.*, 2002) (WHO, 1999) (Seino *et al.*, 2010) (American Diabetes Association, 2014):

a) Defeitos genéticos da função das células β

Estes doentes apresentam um defeito de secreção de insulina associado a mutações em genes específicos, geralmente herdados num padrão autossómico dominante, que afetam a função das células β , frequentemente caracterizadas pelo aparecimento de hiperglicémia ligeira numa idade precoce (antes dos 25 anos). Pacientes com esta forma de diabetes referidos como *Maturity Onset Diabetes of the Young* - MODY, têm uma diminuição da secreção de insulina e englobam um grupo heterogéneo de diabetes sem predisposição para a cetoacidose e sem obesidade, com várias gerações de familiares afetados com a doença. Estima-se que este tipo de diabetes seja responsável por cerca de 1 a 5% dos casos de diabetes.

A segunda forma é associada a mutações pontuais no DNA (ácido desoxirribonucleico) mitocondrial, de herança materna, caracterizando-se por ocorrer

em indivíduos jovens. Inicialmente a hiperglicemia é leve, mas pode progredir lentamente levando a graus mais avançados que necessitam de insulino terapia. Os doentes usualmente apresentam surdez neurossensorial e distrofia macular. Menos frequentemente podem desenvolver miopatias, cardiomiopatias e doenças renais.

b) Defeitos genéticos na ação da insulina

Determinadas modificações genéticas levam a alterações da ação da insulina, que associadas a mutações do seu recetor, podem variar entre hiperinsulinemia e hiperglicemia ligeira, até à diabetes sintomática.

c) Doenças do pâncreas exócrino

Qualquer processo que difusamente agride o pâncreas, pode causar diabetes. Incluindo pancreatite, trauma, infeção, carcinoma do pâncreas e pancreatectomia. Se extensa o suficiente, a fibrose cística e a hemocromatose também poderão danificar as células β e conseqüentemente diminuir a secreção de insulina.

d) Endocrinopatias

Algumas doenças como a acromegalia, síndrome de Cushing, glucagonoma e feocromocitoma, são associadas ao excesso de secreção de hormonas que antagonizam a ação da insulina, levando ao aparecimento da diabetes. Estas formas de hiperglicemia são resolvidas quando o excesso da hormona é removido.

e) Diabetes induzida por químicos ou fármacos

Muitos químicos ou fármacos podem prejudicar a secreção de insulina, precipitando o desencadear da diabetes. Algumas toxinas, como a pentamidina (medicação antimicrobiana), podem permanentemente destruir as células β .

f) Infeções

Alguns vírus têm sido associados à destruição das células β , como é o caso da rubéola congénita, ou implicados na indução da doença, como o Coxsackie B, citomegalovírus, adenovírus, entre outros.

g) Formas incomuns mas específicas de Diabetes Mellitus

Quando associada a várias doenças imunológicas com uma etiologia ou patogênese diferente daquela que desencadeia o processo da DM.

h) Outras síndromes genéticos

Muitos síndromes genéticos são acompanhados por um aumento da incidência de DM, como no caso de alterações cromossômicas (síndrome de Down, síndrome de Klinefelter, síndrome de Turner e o síndrome de Wolfram).

No entanto, com base em observações clínicas, genéticas e estudos moleculares realizados, esta classificação nem sempre é adequada pois o fenótipo pode não refletir o genótipo (Mimbacas e Javiel, 2010) (Pace *et al.*, 2005) (American Diabetes Association, 2004). Todos os anos são reavaliadas as recomendações mais atuais para a classificação, diagnóstico e triagem de diabetes, refletindo novas informações a partir da investigação e prática clínica (McCulloch, 2014).

1.2 Diabetes Mellitus Tipo 1

Como descrito anteriormente, a DMT1 caracteriza-se por ser uma doença multifatorial, dependente de uma complexa interação ainda pouco definida entre resposta imunológica, várias predisposições de fatores genéticos e a influência do meio-ambiente na destruição das células β . O entendimento dos aspetos envolvidos no desenvolvimento desta patologia constitui a base para a deteção e prevenção da DMT1 (Seino *et al.*, 2010) (Gross *et al.*, 2002).

1.2.1 Mecanismos da doença

As manifestações clássicas ocorrem numa fase mais tardia da doença, após a destruição de mais de 80% das células β , sendo que vários mecanismos contribuem para a sua destruição, causando a diabetes clínica (Kumar, 2004). A DMT1 é desencadeada quando ocorre um desequilíbrio nos mecanismos de tolerância aos próprios antigénios, envolvendo a interação de diferentes subpopulações de linfócitos e células apresentadoras de antigénios. Resulta inicialmente em insulite, um infiltrado

inflamatório composto por populações celulares como linfócitos T CD4+ e T CD8+, células B, células NK (*Natural Killer*), macrófagos e células dendríticas, que desempenham um importante papel na resposta autoimune (Purohit e She, 2008) (Silva *et al.*, 2008).

A apresentação de autoantígenos específicos das células β pancreáticas pelos macrófagos e/ou células dendríticas para os linfócitos T CD4+, constitui o primeiro evento no processo de autoimunidade visto na DMT1 (Purohit e She, 2008). Os linfócitos T CD4+ agem no processo de insulite, determinando reações inflamatórias e a secreção de citocinas, cuja principal ação é a de promover a proliferação e a diferenciação de linfócitos T e de outras células, incluindo linfócitos B e macrófagos. A libertação de citocinas pró-inflamatórias, como interferão γ (IFN- γ) produzido pelas células T, fator de necrose tumoral α (TNF- α) e a interleucina 1 beta (IL-1 β) produzidos pelos macrófagos ativados durante a reação imunológica, favorece a iniciação e a perpetuação da resposta inflamatória e autoimune na DMT1, culminando na destruição das células β através da ativação de macrófagos (imunidade celular) (Purohit e She, 2008) (Silva *et al.*, 2008).

Ativados, os macrófagos secretam citocinas que induzem a migração celular e estimulam vários tipos celulares a secretarem radicais livres, extremamente tóxicos às células β pancreáticas. Durante o processo de insulite, que parece ocorrer com maior intensidade em ilhotas onde existam células β metabolicamente ativas, os linfócitos T CD8+ são as células predominantes. Após reconhecimento dos autoantígenos pancreáticos, destroem as células β por citólise, através da liberação de perforinas e granzimas, e por indução de apoptose (imunidade humoral) (figura 1) (Purohit e She, 2008) (Silva *et al.*, 2008).

As células β que sobrevivem, geralmente expressam moléculas classe II do Complexo Maior de Histocompatibilidade (MHC - *Major Histocompatibility Complex*), provavelmente um efeito da produção local de IFN- γ pelas células T, cuja especificidade é desconhecida. Vários estudos com base em modelos da doença em animais, indicaram que uma enzima das células β , a descarboxilase do ácido glutâmico (GAD) e a própria insulina atuam como autoantígenos (Kumar, 2004). Ao longo do tempo as células β vão diminuindo em número, assim como a intensidade do processo inflamatório (Purohit e She, 2008).

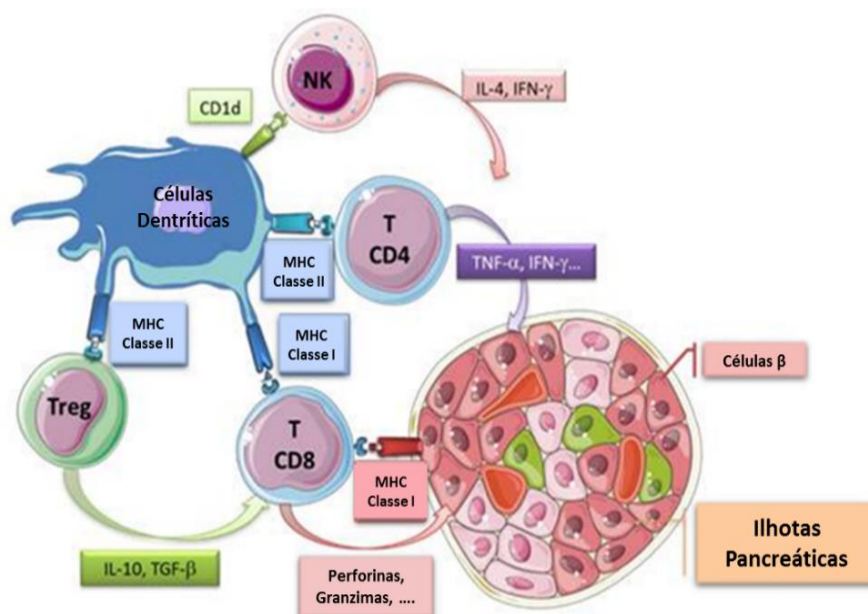


Figura 1. Mecanismos de autoimunidade na DM1. A DM1 ocorre quando sucede um desequilíbrio nos mecanismos de tolerância aos antígenos próprios, resultando em insulite. As células dendríticas atuam como “sensores de perigo” do sistema imune, ativando as células NK. Dá-se assim uma amplificação da cascata de imunidade, levando as células T CD4+ e T CD8+ a se ligar aos epítomos dos alvos moleculares selecionados. As células T CD4+ agem neste processo determinando reações inflamatórias e secreção de citocinas, culminando com a morte das células β. As células T CD4+ também funcionam como células auxiliares ativadoras das células T CD8+ e linfócitos B produtores de autoanticorpos. Recuperado em 2014, julho 6, de <http://cochin.inserm.fr/Departements/emd/equipe-lehuen-mallone/equipe-immunologie-des-diabetes/images/Lehuen.jpg>.

1.2.2 Diagnóstico

Até há alguns anos, o diagnóstico da DM1 era fundamentado no quadro clínico. Com o aprimoramento das ferramentas diagnósticas, a identificação do estadiamento em que a pessoa com alterações do metabolismo da glicose se encontra em cada momento, permite iniciar as estratégias de intervenção e monitorização mais adequadas (Silva *et al.*, 2008). Consideram-se atualmente dois estádios intermédios de alteração da homeostase da glicose: a anomalia da glicemia em jejum e a tolerância diminuída à glicose após sobrecarga oral (prova de tolerância à glicose oral - PTGO). Tanto uma como outra identificam grupos de indivíduos para os quais existe um risco aumentado de vir a desenvolver diabetes e doenças cardiovasculares, em relação à população normoglicêmica (DGS, 2011).

A OMS recomenda ainda a utilização da Hemoglobina glicada A1c (HbA1c), uma forma de hemoglobina presente naturalmente nos eritrócitos humanos, formada a

partir de reações não enzimáticas entre a hemoglobina e a glicose. Se a concentração de glicose no sangue é mais elevada, haverá mais de ligação à hemoglobina (Andriolo *et al.*, 2004).

O diagnóstico da diabetes é feito com base nos seguintes parâmetros e valores para plasma venoso na população em geral (DGS, 2011):

- a) Glicémia de jejum ≥ 126 mg/dl; ou
- b) Sintomas clássicos + glicémia ocasional ≥ 200 mg/dl; ou
- c) Glicémia ≥ 200 mg/dl às 2 horas, PTGO com 75g de glicose; ou
- d) HbA1c $\geq 6,5\%$

O rastreio da diabetes deve ser realizado em todos os indivíduos com mais de 45 anos de idade, a cada 3 anos. Mais precocemente e com maior frequência, em indivíduos assintomáticos quando apresentarem fatores de risco para o desenvolvimento da doença (Gross *et al.*, 2002).

1.2.3 Prevenção

Não existe ainda um teste de triagem para a DMT1 em pessoas que não apresentam sintomas, de forma a evitar o seu desencadear (Wisse, 2014). Apesar de alguns investigadores acreditarem que pode ser prevenida na fase autoimune latente, antes que haja destruição das células β (Borch-Johnsen, *et al.*, 1984), na fase pré-clínica e tendo em conta o seu longo período assintomático, oferece muitas oportunidades para a prevenção da doença e intervenção. Embora muitos ensaios de prevenção da DMT1 tenham sido realizados nas últimas três décadas, nenhum deles provou ser bem-sucedido (Jin e She, 2012).

Alguns imunossuppressores, como a Ciclosporina A, foram testados e aparentemente parecem interromper a destruição de células β (com base na utilização reduzida de insulina), mas a sua toxicidade renal e outros efeitos colaterais tornam altamente inadequado o seu uso a longo prazo (Borch-Johnsen *et al.*, 1984).

O pouco sucesso em descobrir a etiologia exata da DMT1 e o desenvolvimento de terapias devem-se à falta de biomarcadores adequados para a identificação e estratificação da população de alto risco, de forma a intervir especificamente e ainda à falta de marcadores para avaliar a eficácia da intervenção (Jin e She, 2012).

1.2.4 Epidemiologia

A prevalência da DM tem vindo a aumentar drasticamente, sobretudo nas últimas três ou quatro décadas, resultando numa epidemia mundial que faz da doença uma das condições médicas mais comuns e mais graves de sempre (Polonsky, 2012).

Todos os anos são apresentadas pela OMS as estimativas do ano transato, da DM no mundo, mostrando-nos um crescente número de doentes (figura 2) (IDF, 2014). Atualmente existem 387 milhões de pessoas a viver com diabetes, o que corresponde a 8,3% da população mundial, para além de 316 milhões de pessoas com baixa tolerância à glicose e portanto com elevado risco de desenvolver a doença. Estima-se que uma em cada doze pessoas sofre de DM, sendo que uma em cada duas não sabe que tem a doença (IMS, 2014).

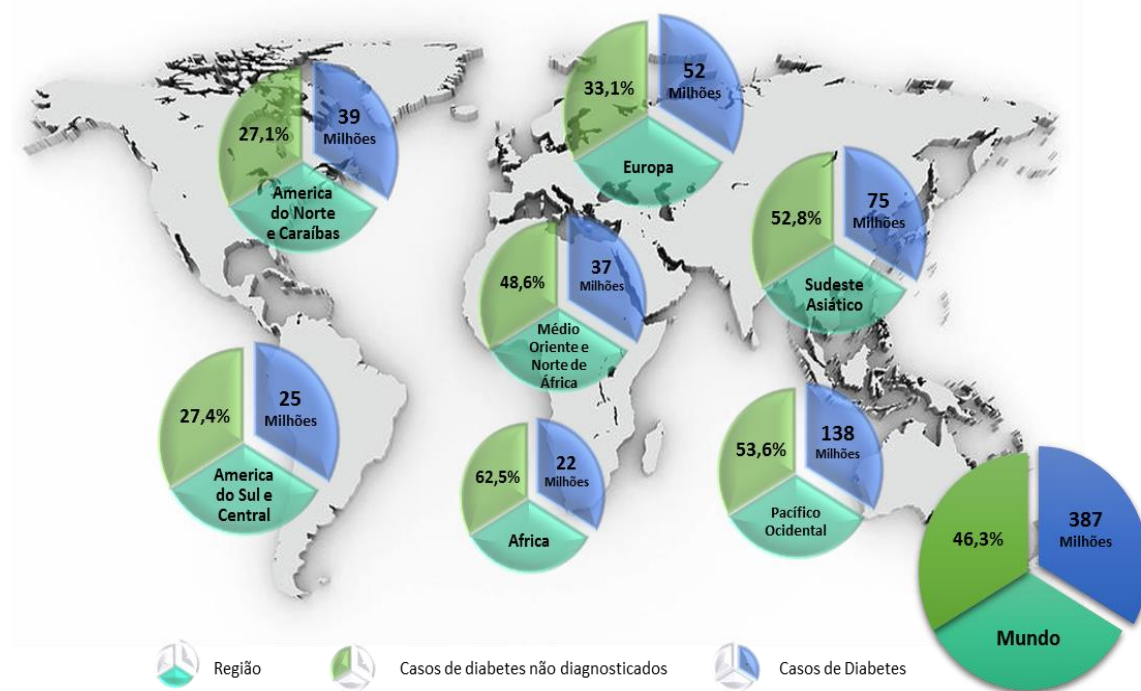


Figura 2. Valores de Diabetes Mellitus apresentados pela OMS referentes ao ano 2013. Valores retirados de (IDF, 2014)

A cada 7 segundos que passam, uma pessoa morre devido à doença. Em 2014 vitimou 4,9 milhões de pessoas em todo o mundo (50% das quais com idades inferiores a 60 anos) (IDF, 2014). A atingirem-se as previsões, em 2035 o número de diabéticos aumentará em 205 milhões, para um total de 592 milhões, representando um aumento de 55% da população atingida pela doença (IMS, 2014) (IDF, 2014). Para 2014, previa-se um número total de 7994 mil mortes relacionadas com a DM (entre os 20 e os 79 anos (IDF, 2014).

Dados disponibilizados no Relatório Anual do Observatório Nacional da Diabetes e pela OMS, mostram que Portugal está entre os países Europeus que registam uma maior prevalência da DM. Segundo os dados referentes a 2013, a prevalência total estimada numa população dos 20 aos 79 anos de idade, foi de 13 %. O número de novos casos de diabetes previstos para 2014 ronda os 1042 (por cada 100 mil habitantes), em que cerca de 354 (por 100 mil habitantes) não terão sido ainda diagnosticados (IDF, 2014). Apresenta uma maior incidência no sexo masculino do que no feminino (15,6% e 10,7%, respetivamente), existindo ainda uma correlação direta com o envelhecimento da população (IMS, 2014) (IDF, 2014).

Considerada uma das doenças crónicas mais comuns em crianças e adultos jovens, a DMT1 compreende 90% dos casos de diabetes da infância e 5 a 10% de início na idade adulta. Apresenta um predomínio na população caucasiana, acometendo cerca de 0,3%, porém a sua incidência é variável entre populações e áreas geográficas, em que 77% das pessoas com a doença vivem em países de baixo e médio desenvolvimento, refletindo também diferentes genes de suscetibilidade e fatores ambientais desencadeantes (Silva *et al.*, 2008) (IDF, 2014). A relação familiar é rara, mas superior à da população normal. Cerca de 10 a 13% dos pacientes com DMT1 recém-diagnosticados, têm um familiar de primeiro grau afetado. A concordância entre gémeos monozigóticos (50%) difere acentuadamente da dos dizigóticos (5%) (Silva *et al.*, 2008).

Em 2013 foram detetados 18,2 novos casos de DMT1 em Portugal, por cada 100 mil jovens com idades compreendidas entre os 0 e os 14 anos. Tendo em conta a faixa etária entre os 0 e os 19 anos, atingia 3262 indivíduos, com uma prevalência de 0,16% (Correia, 2014).

Em 2009, a Região Autónoma da Madeira (RAM) apresentava os valores mais baixos, ligeiramente inferiores à média nacional: 10,9% de casos de diabetes, com 7,4% de casos previamente diagnosticados e 3,5% não diagnosticados. Em termos globais, a prevalência situa-se a nível dos 2,8% (Secretaria Regional dos Assuntos Sociais da RAM, 2003) (Instituto de Higiene e Medicina Social Faculdade de Medicina de Coimbra, 2009) (DGS, 2011).

Num estudo realizado em 2003, a DMT1 na RAM, apresentando 7,1 novos casos por cada 100 mil habitantes por ano, era considerada intermédia comparativamente à incidência de casos de DMT1 verificada nas várias populações mundiais (Karvonen *et al.*, 2000).

1.2.5 Causas Patológicas

A DMT1 é uma doença multifatorial, causada por uma complexa interação de suscetibilidade genética, autoimunidade e fatores ambientais, mecanismos associados na destruição das células β das ilhotas de Langerhans (figura 3) (Wagner, 2011).

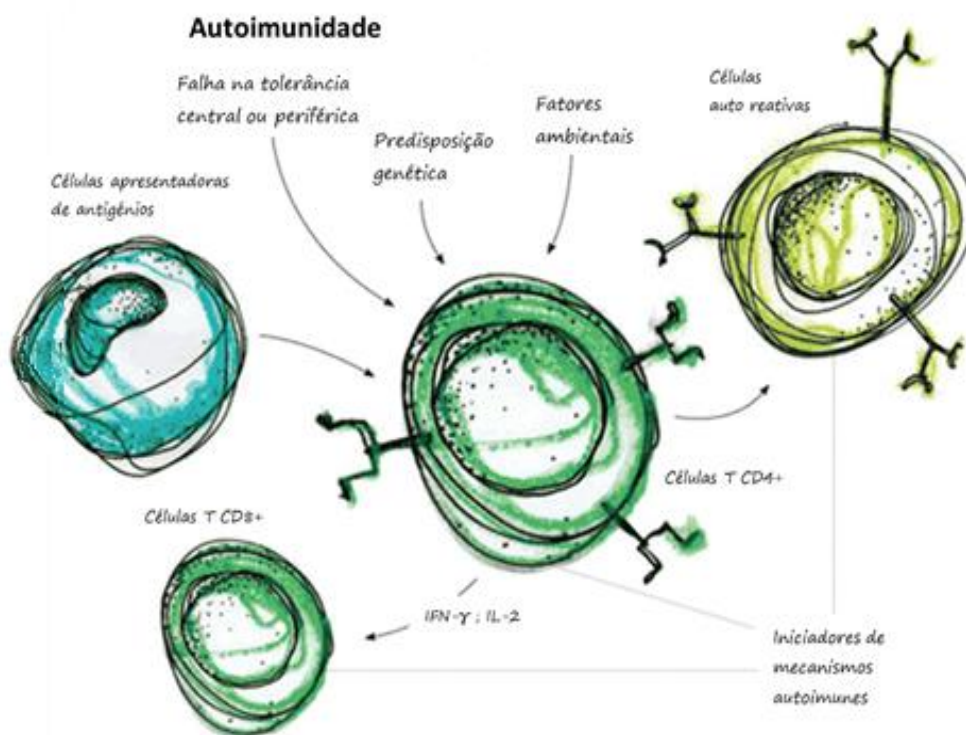


Figura 3. Fatores implicados na autoimunidade. A autoimunidade resulta de uma combinação de fatores que levam a uma insuficiência dos mecanismos de tolerância do sistema imunitário. As células T CD4 +, que produzem citocinas pró-inflamatórias e citotóxicas, iniciam uma cascata autoimune, ativando células B produtoras de autoanticorpos e células T CD8 +. Recuperado em 2015, março 8, de <http://www.the-scientist.com/?articles.view/articleNo/24986/title/Supplement--A-Balanced-Attack/>.

Acredita-se que estes fatores se interliguem sendo que a suscetibilidade genética associada aos alelos específicos predispõe ao desenvolvimento de autoimunidade contra as células β . A reação autoimune desenvolve-se espontaneamente, ou mais provavelmente é deflagrada por um agente ambiental, causando uma lesão inicial (Guyton e Hall, 2006).

1.2.5.1 Suscetibilidade genética

A suscetibilidade à DMT1 é herdada, apresentando uma alta incidência familiar, particularmente entre parentes em primeiro grau, bem como uma maior concordância para o aparecimento da doença entre gêmeos monozigóticos, indicando que os fatores genéticos têm grande importância na patogênese da doença (Pace *et al.*, 2005) (Purohit e She, 2008). Porém, 85% de novos casos não contemplam tal linhagem familiar (Sesterheim *et al.*, 2007). Apenas 5 a 10% com parentes em primeiro grau com DMT1 desenvolvem a doença, sendo que os fatores ambientais possivelmente desempenham um papel importante nos restantes casos (Guyton e Hall, 2006).

Considerada uma herança poligênica complexa, a DMT1 apresenta algumas dezenas de loci genéticos, ainda em processo de estudo, associados ao desenvolvimento da doença, mas apenas alguns destes grupos apresentam evidências estatisticamente significantes de associação (Sesterheim *et al.*, 2007) (Pace *et al.*, 2005).

1.2.5.2 Autoimunidade

O papel da autoimunidade na patogênese da diabetes é apoiado por várias observações morfológicas, clínicas e experimentais (Guyton e Hall, 2006). A DMT1 tem início quando ocorre um desequilíbrio nos mecanismos de tolerância aos próprios antígenos, resultando em insulite (Silva *et al.*, 2008).

Como referido anteriormente, diversos mecanismos imunológicos, tanto celulares como humorais, têm sido relatados na patogênese da doença. As participações de várias linhagens celulares, constituintes do sistema imune, tais como os linfócitos T, os linfócitos B e as células apresentadoras de antígenos (APC), como macrófagos e células dendríticas, têm sido definidas (Pace *et al.*, 2005). As células T CD4+ agem no processo da insulite, determinando reações inflamatórias e secreção de citocinas, culminando com a morte das células β (Silva *et al.*, 2008). Entre os mecanismos humorais, a participação de autoanticorpos específicos para antígenos das ilhotas pancreáticas, produzidos pelas células T CD8+ e linfócitos B, ativados pelas células T CD4+, e as citocinas pró-inflamatórias são as mais relevantes. Adicionalmente, os antígenos leucocitários humanos (*Human Leukocyte Antigen - HLA*) e as moléculas co-estimulatórias também participam na patogenia do DMT1,

envolvendo a interação de diferentes subpopulações de linfócitos e células apresentadoras de antígenos, que desempenham importante papel na geração da resposta autoimune (Sesterheim *et al.*, 2007) (Pace *et al.*, 2005).

1.2.5.3 Fatores ambientais

Além da herança genética, outros mecanismos de regulação da expressão de genes, incluindo a epigenética, influenciam efeitos de suscetibilidade ao modificar a transmissão e a transcrição de genes herdados. A suscetibilidade genética predispõe à destruição das células β iniciando uma reação autoimune. É também uma possibilidade intrigante que os fatores genéticos adicionais ou a sua expressão possam ser adquiridos após o nascimento, talvez através da exposição a agentes ambientais que agem como modificadores da patogênese da doença, podendo servir como “gatilhos” influenciando as respostas autoimunes que conduzem à destruição da célula β (Steck *et al.*, 2010) (Guyton e Hall, 2006).

Embora o mecanismo de lesão tecidual não esteja esclarecido, o papel do mimetismo molecular tem sido proposto (Pace *et al.*, 2005). Vários vírus possuem tropismo pelas células β , mas a lesão direta que induzem raramente é extensa o suficiente para causar DMT1. Num quadro mais provável, esta lesão é seguida por uma reação autoimune contra as células β (Guyton e Hall, 2006). A libertação local de citocinas pró-inflamatórias decorrentes da infecção viral, constitui um fator central para a perda da tolerância aos autoantígenos e na ativação de linfócitos autorreativos (Sesterheim *et al.*, 2007). A hipótese recai sobre evidências epidemiológicas, clínicas e experimentais da associação entre a presença do agente infeccioso com o surgimento da doença e ainda com a reação cruzada entre antígenos próprios e os antígenos microbianos (Pace *et al.*, 2005). A associação entre os processos de inflamação e autoimunidade tem sido extensamente ligada à ação de citocinas pró-inflamatórias libertadas no local da lesão. Estas citocinas, capazes de recrutar e ativar células apresentadoras de antígenos e linfócitos T autorreativos, perpetuam o processo de autoimunidade nas ilhotas de Langerhans iniciando a cascata de processos inflamatórios, culminando em insulite (Sesterheim *et al.*, 2007).

Outros fatores não genéticos modificadores da doença, incluem administração de vacinas, influências climáticas, sazonalidade, acesso aos cuidados de saúde, exposição a toxinas e entre outros os fatores, a amamentação e a vitamina D podem

diminuir a suscetibilidade, contrariamente à exposição ao leite de vaca e outros fatores diatéticos que podem aumentar a suscetibilidade de desenvolver a DMT1 (Sesterheim *et al.*, 2007) (Ma e Chan, 2009).

1.3 Aspetos genéticos

A procura dos genes associados à DMT1 começou na década de 1970, recorrendo principalmente a duas abordagens: estudos de ligação (usando pares de parentes afetados, geralmente irmãos) e estudos de associação (usando casos controlo) (Jin e She, 2012). Após décadas de esforços para desvendar a genética associada ao desenvolvimento da doença, genes de diversos loci têm sido estudados quanto à sua participação no desenvolvimento da DMT1. Concluiu-se que apresenta cerca de 20 grupos de genes, 50 loci associados à suscetibilidade à doença, mas apenas 13 grupos apresentam evidências estatisticamente significativas de associação, estando os mais importantes localizados nos cromossomas 6, 11 e 2, denominados IDDM (figura 4) (Rani *et al.*, 2014) (Silva *et al.*, 2008) (Pace *et al.*, 2005) (Atkinson, 2012). A maior contribuição vem da região onde estão localizados os genes do MHC, contribuindo em cerca de 40% na suscetibilidade à doença (Pace *et al.*, 2005) (Guyton e Hall, 2006).

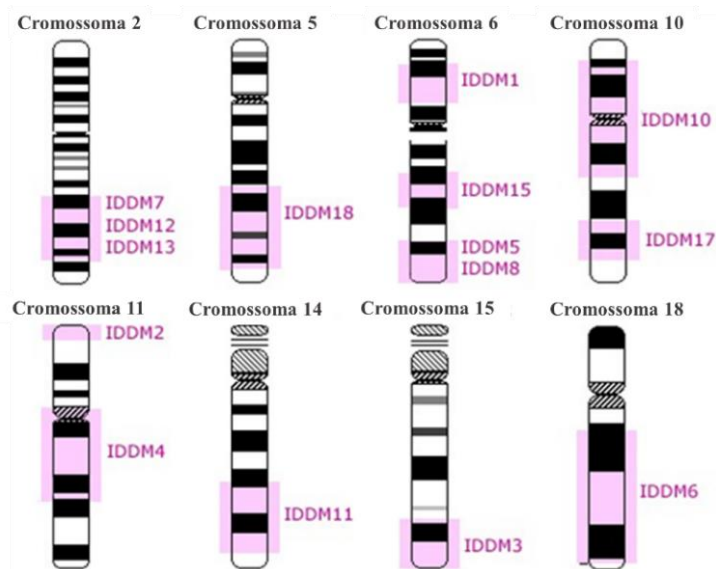


Figura 4. Loci de suscetibilidade à DMT1 (Retirado em 2015, março 3, de http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1662/bin/IDDM_loci.jpg)

SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*) corresponde a uma variação da sequência de DNA, sem significado clínico, em que um único nucleótido difere entre

os membros de uma espécie biológica. Responsáveis pela variabilidade genética entre indivíduos, ocorrem normalmente em mais de 1% da população (Almeida, 2014).

Polimorfismos da região HLA, que codifica múltiplos genes envolvidos na função e regulação da resposta imune, são conhecidos por influenciar o risco da DMT1. Em especial nos genes HLA-DQA1, HLA-DQB1, HLA-DRB1, sendo que a suscetibilidade ao desenvolvimento da doença está mais relacionada a determinados haplotipos HLA, ou seja, que são herdados em conjunto, específicos de classe II, do que a alelos isolados (Sesterheim *et al.*, 2007) (Pace *et al.*, 2005).

Embora alguns estudos de ligação revelem a importante contribuição do MHC para a DMT1, loci não-MHC foram identificados utilizando estudos de associação. Tais como do gene da insulina (INS), do recetor alfa da interleucina 2 (IL-2 α), do gene do antígeno 4 dos linfócitos T citotóxicos (CTLA4) que codifica uma molécula da superfície celular da superfamília das imunoglobulinas (Pace *et al.*, 2005) (Sesterheim *et al.*, 2007) e do gene PTPN22 (Protein tyrosina phosphatase non-receptor type 22) que codifica a proteína tirosina fosfatase, expressa primariamente nos tecidos linfoides. À semelhança dos genes anteriores, estes predispõem ao desenvolvimento de patologias autoimunes (Guelho *et al.* 2013) (Jin e She, 2012).

Inúmeros polimorfismos destes genes têm sido associados à DMT1 devido aos seus papéis reguladores da resposta imune (Guelho *et al.*, 2013), de influência no metabolismo da insulina e de regulação das células β . Para além dos referidos, que têm apresentado uma maior associação à suscetibilidade para a doença, em diversos estudos direcionados, genes como CCR5, SH2B3, IL-10, IFIH1, UBASH3A, IL-2, GLIS3, entre outros, apresentam também um relativo efeito na associação à suscetibilidade da DMT1 (Todd *et al.*, 1987) (Gillespie, 2011) (Steck *et al.*, 2010).

A identificação de genes associados a doenças complexas é difícil pelo envolvimento de diversos fatores. A heterogeneidade genética é uma questão importante devido às diferenças nas frequências e padrões de desequilíbrio de ligação em diferentes grupos étnicos ou populações de genes. Corresponde à diferença entre as proporções haplotípicas observadas e aquelas esperadas se os alelos segregassem independentemente, sendo que as associações podem ser encontradas em diversos estudos, mas excluídas noutros tantos (Terwilliger e Weiss, 1998). Portanto, os estudos de múltiplas populações e grupos étnicos são necessários para identificar e associar todos os genes de suscetibilidade (Purohit e She, 2008) (Barnett, 2011). Estudos de diferentes etnias são também uma ferramenta poderosa para a identificação de

mutações etiológicas como no caso de estudos dos genes HLA na população madeirense.

1.3.1 HLA

O MHC é constituído por um conjunto de moléculas da superfície das células, codificadas por uma grande família de genes que controla uma parte importante do sistema imune em todos os vertebrados. Aqui localizam-se os genes do sistema humano de antígenos leucocíticos (*Human Leukocyte Antigens*- HLA), situados no braço curto do cromossoma 6 (6p21.3), numa região que se estende por 3.600kpb (kilopares de bases) e contém pelo menos 150 genes. O IDDM1 constitui o principal locus de suscetibilidade para DM1, assim como outras desordens autoimunes. Conhecido há mais de 30 anos é responsável por 40 a 50% do risco genético para a doença (Dorman e Bunker, 2000) (Silva *et al.*, 2008) (Brosson *et al.*, 2010) (Alves *et al.*, 2006).

Diversos estudos foram direcionados na tentativa de determinar quais os alelos responsáveis pela associação à DM1, atingindo cruciais avanços no campo da genética da doença. Após quase cinco décadas da descoberta desta patologia, já se conhece em detalhe a estrutura e função dos genes classe I e classe II do sistema HLA (Noble e Erlich, 2012) (Jin e She, 2012). Os primeiros estudos deste tipo foram com base em marcadores genéticos para famílias afetadas, em que até 15 regiões cromossómicas mostraram evidência de ligação com a doença, localizados nos loci IDDM1-IDDM15, embora vários deles não tenham sido replicados posteriormente (Salas *et al.*, 2013). Com múltiplos papéis na reação imunitária, tais como a seleção de células T e a apresentação de antígenos, os genes HLA podem influenciar o risco de doença e progressão de diversas formas, podendo ser considerado o primeiro ponto de verificação para a seleção e ativação da autoimunidade (Jin e She, 2012).

A região MHC, altamente polimórfica, compreende genes agrupados em classe I (teloméricos) e classe II (centroméricos), separados pelos genes classe III. As moléculas de classe I e II estão envolvidas na apresentação de peptídeos patogénicos aos linfócitos T e a resposta imune adaptativa. Na região classe II estão também localizados genes que codificam diversas proteínas citosólicas, associadas ao transporte e ao processamento de antígenos. Já a região classe III é responsável por

proteínas importantes na resposta imune, como o TNF (figura 5) (Silva *et al.*, 2008) (Alves *et al.*, 2006).

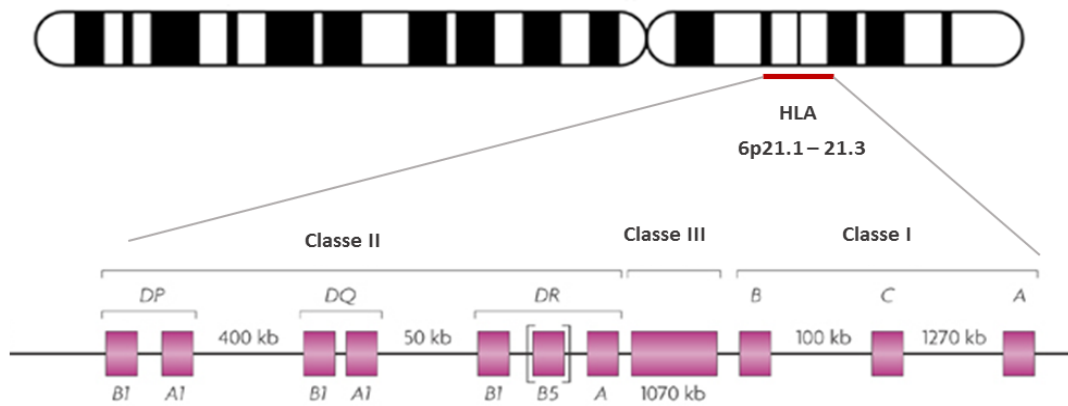


Figura 5. Mapa genético do sistema HLA. (Retirado em 2015, março 3, de <http://journals.cambridge.org/> e de <http://www.nature.com/nrg/journal/v9/n7>)

As moléculas da classe I são expressas na maioria das células somáticas e estão relacionadas com o processamento e a apresentação de antígenos intracelulares. As moléculas de classe II, expressas num grupo de células do sistema imune incluem macrófagos, células dendríticas, linfócitos B e linfócitos T ativados, que atuam no processamento e na apresentação de proteínas extracelulares. As proteínas extracelulares capturadas pelas APC são degradadas e os peptídeos resultantes ligam-se às moléculas de classe II. Estes complexos serão reconhecidos pelos recetores dos linfócitos T (TCR) como próprios do organismo ou como invasores, determinando a resposta imunológica a ser desenvolvida (Silva *et al.*, 2008).

1.3.1.1 Haplotipos HLA

O sistema HLA foi descoberto em 1937 por Peter Gorer durante um estudo de transplantes em ratos e, em 1958, Jean Dausset publicou as suas observações sobre a capacidade do soro de pessoas submetidas a transfusões sanguíneas aglutinar leucócitos de outros indivíduos, descobrindo o primeiro antígeno humano. Com a invenção da técnica de cultura linfocitária mista em 1964, foram-se acumulando resultados que conduziram à descoberta de novos genes (Hora, 2014) (Marsh, 2015) (Waldrigues, 1981).

Devido à sua enorme diversidade genética, em 1968 foi estabelecida a nomenclatura do sistema HLA pelo Comité da OMS, de forma a estabelecer uma padronização clara (Marsh, 2015).

O envolvimento do MHC na resposta imunitária do organismo só foi confirmado no início da década de setenta, que devido às suas múltiplas funções despertou o interesse de várias equipas de investigação em torno do sistema HLA, possibilitando desde então a descoberta de centenas de alelos nos diferentes genes (Hora, 2014).

Desde 1989, quando um grande número de sequências de alelos HLA foram analisadas e nomeadas e devido aos extensos polimorfismos dos genes HLA, o Comité Internacional decidiu alterar o sistema de nomenclatura destes genes, aumentando o número de dígitos e definindo a cadeia onde o polimorfismo é mais acentuado. Desde então diversas alterações têm sido feitas, sendo que por último em 2010 o sistema foi novamente alterado para adicionar um delimitador de dois pontos entre as seções de designação de um alelo, resultando numa composição da sua nomenclatura da seguinte forma (figura 6) (Marsh, 2015) (Donadi, 2000):

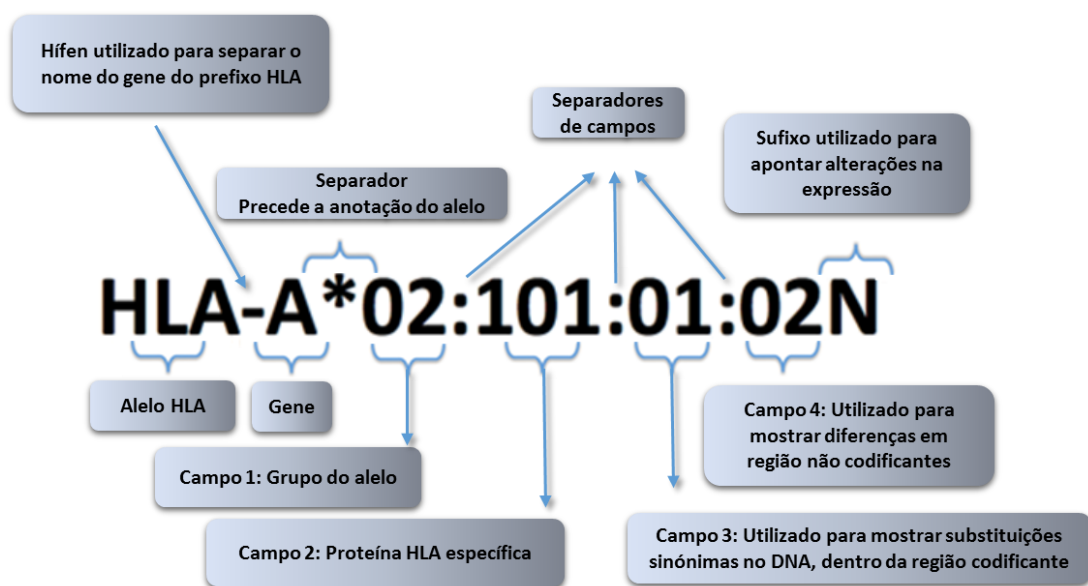


Figura 6. Esquema para designação da nomenclatura do sistema HLA (Marsh, 2015).

Este mesmo Comité é responsável pelas alterações da nomenclatura de genes, antígenos e alelos. Todos os relatórios são publicados em diversos jornais de forma a permitir uma padronização mundial (Donadi, 2000).

Um haplotipo é definido como um fenómeno no qual alelos adjacentes, situados no mesmo segmento cromossómico, são transmitidos em conjunto, em bloco. Durante a meiose, quando se dá o processo de recombinação genética que tende a misturar e combinar pequenas variações genéticas de tal forma que diferentes combinações de genes são herdadas, com uma frequência superior à que seria de esperar pelo acaso, fornecendo marcadores convenientes para indivíduos e/ou populações humanas (Cox *et al.*, 2011) (Andrade, 2013).

Com a atenção de diversos investigadores voltada para a associação de diferentes haplotipos HLA à suscetibilidade à DMT1, foram definidos diversos haplotipos que pela combinação de determinados alelos conferem risco ou proteção à doença (tabela 1):

Tabela 1. Haplotipos HLA definidos como de risco e proteção à DMT1 (Redondo *et al.*, 2001).

Haplotipos que conferem risco elevado:	Haplotipos que conferem risco moderado:	Haplotipos que conferem proteção fraca ou moderada:	Haplotipos que conferem proteção elevada:
<ul style="list-style-type: none"> • DQA1*03:01-DQB1*03:02-DRB1*04:01 • DQA1*03:01-DQB1*03:02-DRB1*04:02 • DQA1*03:01-DQB1*03:02-DRB1*04:05 • DQA1*05:01-DQB1*02:01-DRB1*03:01 	<ul style="list-style-type: none"> DQA1*04:01-DQB1*04:02-DRB1*08:01 DQA1*01:01-DQB1*05:01-DRB1*01:01 DQA1*03:01-DQB1*03:03-DRB1*09:01 	<ul style="list-style-type: none"> • DQA1*03:01-DQB1*03:02-DRB1*04:03 • DQA1*02:01-DQB1*02:01-DRB1*07:01 • DQA1*05:01-DQB1*03:01-DRB1*11:01 	<ul style="list-style-type: none"> • DQA1*01:02-DQB1*06:02-DRB1*15:01 • DQA1*01:01-DQB1*05:03-DRB1*14:01 • DQA1*02:01-DQB1*03:03-DRB1*07:01

1.3.2 CTLA4

O gene CTLA4 codifica uma molécula de superfície celular da superfamília das imunoglobulinas, que se expressa em linfócitos T *helper* (Th) CD4+ e CD8+ ativados e liga-se às moléculas B7-1 e B7-2 das APC, inibindo a ativação das células B e T, a proliferação das células T, a produção de citocinas e de imunoglobulinas (Silva *et al.*, 2008).

Este gene está localizado no cromossoma 2q33 (Locus IDDM12) e a sua associação com a DMT1 tem sido analisada por diversos grupos de pesquisa, considerando um locus de suscetibilidade à doença (Silva *et al.*, 2008) (Salas *et al.*, 2013) (Steck e Rewers, 2011). Esta região possui 300kpb e contém pelo menos três

genes - CD28, CTLA4 e o gene para o co-estimulador induzível (ICOS), em desequilíbrio de ligação. Todos desempenham um papel na regulação e função imune e podem ser responsáveis pela associação genética ligada à desregulação do sistema imune. A associação à DMT1 foi confirmada para o gene CTLA4 (Salas *et al.*, 2013).

1.3.2.1 Polimorfismo A49G do gene CTLA4

Foram identificados diversos polimorfismos do gene CTLA4 em humanos, associados à DMT1, incluindo os polimorfismos na região flanqueadora da extremidade 5' e também na região do promotor. Entre os mais estudados está o SNP A49G (rs231775), que corresponde a uma substituição de bases, de uma adenina por uma guanina (ACC – GCC), na posição 49 do exão 1. Resulta numa substituição de aminoácidos, de treonina (T) para alanina (A) no codão 17 (p.Thr17Ala) (Salas *et al.*, 2013), correspondendo a uma mutação *missense*. Mostra um significativo grau de associação com uma idade mais precoce para apresentação de perfis específicos de autoanticorpos, com associação à DMT1. Pouco se sabe sobre o envolvimento funcional de CTLA4 em doenças humanas, em parte devido ao facto de que a deteção desta proteína em células não estimuladas ser difícil, devido à baixa densidade de expressão. A expressão de CTLA4 parece ser induzida seletivamente em certos estados patológicos *in vivo*, mas o mecanismo subjacente a esta indução é desconhecido (Pérez *et al.*, 2009).

O desenvolvimento de uma resposta imune adequada depende da regulação cuidadosa de sinais de ativação de linfócitos. Este processo envolve a interação dinâmica de várias moléculas da membrana presentes nas APC e nos linfócitos, mas também a transmissão intracelular de sinais independentes que permitem às células proliferar e diferenciarem-se em células efetoras e de memória (Fernández-Ponce *et al.*, 2006).

As APC apresentam péptidos antigénicos das células β através da interação do TCR, do MHC de classe II e de co-recetores de CD4 + e CD8 +, às células Th. Estas por sua vez ativam uma cascata de respostas imunitárias, incluindo a ativação de células B (que produzem autoanticorpos específicos de antígenos dos ilhéus de Langerhans) e dos *Cytotoxic T Lymphocytes* (CTL), que podem diretamente lisar células que apresentam na sua superfície péptidos β dos ilhéus, através de moléculas de classe I do MHC (figura 7). O recetor de CTLA4 é o principal inibidor envolvido

na regulação negativa da ativação dos linfócitos, presente principalmente na superfície dos linfócitos T ativados e a sua expressão é constitutiva apenas em células CD4 + e CD8 + ativadas (Pérez *et al.*, 2009) (Fernández-Ponce *et al.*, 2006).

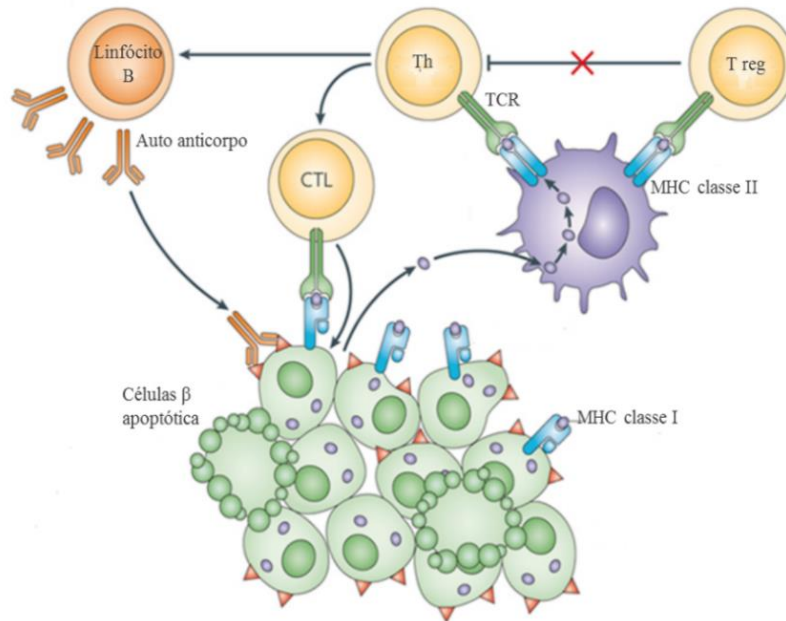


Figura 7. Esquema do processo que leva à destruição das células β na DM1. As proteínas celulares β são fagocitadas pelas APC e pelas células dendríticas. Fragmentos destes péptidos são apresentados por moléculas MHC de classe II às células Th, que por sua vez ativam uma cascata de respostas imunitárias, incluindo a ativação de células B (que produzem autoanticorpos específicos de antígenos das ilhotas) e de linfócitos CTL que lisam células que apresentam peptídeos β na sua superfície, através de moléculas MHC de classe I. Alternativamente, as APC podem apresentar peptídeos antigénicos às células Treg que suprimem a cascata pró-inflamatória e impedem a destruição das células β (Roep e Peakman, 2010).

O gene CTLA4 é assim considerado um importante regulador da autoimunidade. Codifica uma proteína que juntamente com o CD28 (outra molécula co-estimuladora expressa na superfície das células T ativadas), desempenha uma importante função na resposta dos linfócitos T aos antígenos (Bedin, 2013).

A ativação dos linfócitos T inicia-se quando o TCR se liga ao antígeno, que se encontra acoplado a uma molécula de MHC classe II na superfície da APC. Para continuar a ativação é necessário um segundo sinal estimulador representado pela interação do CD 28 com os ligandos B7-1 (CD80) e B7-2 (CD86). Dessa maneira, há a transmissão dos sinais de estímulo e produção de uma variedade de citocinas. A expressão destes ligandos está aumentada na membrana dos linfócitos B ativados. Na

ausência deste sinal, a ligação antígeno-recetor não é efetiva, causando apoptose da célula T (Lee *et al.*, 1998) (Bedin, 2013).

No entanto, vários estudos têm demonstrado a expressão do gene CTLA4 noutros tipos de células, incluindo as células B, monócitos e granulócitos (Fernández-Ponce *et al.*, 2006). O CTLA4 também se liga à B7, mas esta interação resulta na diminuição da regulação da resposta imune em curso (figura 8). Alternativamente, as APC podem apresentar péptidos antigénicos das ilhotas aos linfócitos T reguladores (Treg), que suprimem a cascata pró-inflamatória e impedem as células β de serem destruídas (Pérez *et al.*, 2009).

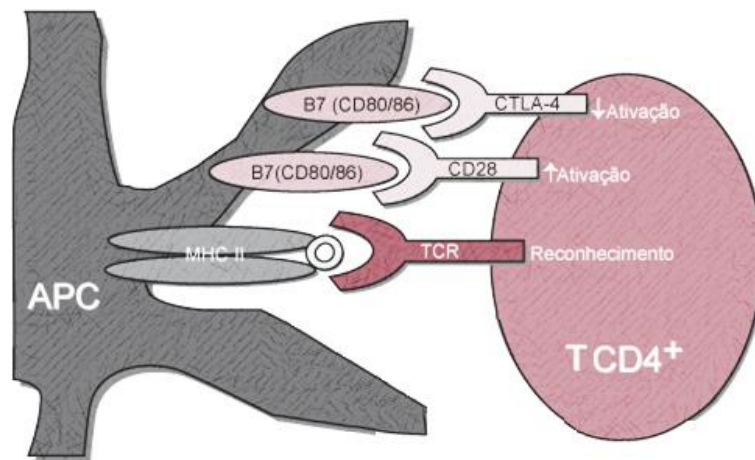


Figura 8. Recetores de ligação entre o linfócito T CD4+ e a APC (Silva *et al.*, 2008).

Devido ao facto de o CTLA4 parecer ser um regulador negativo da resposta imunitária normal, é de interesse investigar se a alteração da sua expressão em células T pode contribuir para uma resposta imunitária alterada (Karumuthil-Melethil *et al.*, 2010). A hipótese mais estudada, que poderá estar na origem do desencadear da resposta autoimune, recai sobre uma perturbação no equilíbrio de ligação entre a CTLA4 com a B7 da APC (Li *et al.*, 2014).

Este polimorfismo encontra-se descrito na base de dados *National Center for Biotechnology Information - NCBI* (dbSNP -<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), pelo que a sua associação não se restringe apenas à DMT1. Diversos estudos analisaram este polimorfismo de forma a estudar a significância da sua associação com outros transtornos autoimunes como é o caso da doença celíaca, lúpus eritematoso sistémico, artrite reumatoide, entre outras.

Ainda assim a correlação do polimorfismo A49G CTLA4 com a DMT1 tem sido exaustivamente estudada em populações de diferentes regiões, mas os resultados

de relatórios anteriores sobre esta possível associação permanecem controversos e ambíguos. É evidenciada a associação deste gene à doença em vários países incluindo Espanha, Reino Unido, Rússia, Polónia, Itália, França, China, Coreia, Marrocos, Bélgica, Japão, México, Líbano, Filipinas, Eslovénia, Estónia, Irão, Croácia e Alemanha. No entanto, outras publicações referentes ao estudo do mesmo SNP em certas populações japonesa, do Reino Unido, Alemanha, Turquia, Dinamarca, Sardenha, EUA, na antiga Checoslováquia, República Checa, Irão, Gana, Marrocos, Brasil, Azerbaijão, Argentina, Chile, Turquia e ainda numa população de crianças portuguesas, não mostram esta mesma associação (Zalloua *et al.*, 2004) (Donner *et al.*, 1997) (Pérez *et al.*, 2009) (Rani *et al.*, 2014) (Saleh *et al.* 2013) (Lemos *et al.*, 2009). A associação com a DMT1 parece depender da distribuição do alelo na população estudada e da incidência da doença (Salas *et al.*, 2013) (Silva *et al.*, 2008) (Pérez *et al.*, 2009).

1.3.3 PTPN22

O gene PTPN22, localizado no cromossoma 1p13, codifica uma proteína tirosina fosfatase linfóide (*Lymphoid Tyrosine Phosphatase*). Constituída por 807 resíduos de aminoácido, é expressa primariamente nos tecidos linfóides, também conhecida como Lyp (Silva *et al.*, 2008) (Rani *et al.*, 2014). Inibe a transdução de sinal do recetor das células T através da desfosforilação de importantes quinases de sinalização para o TCR, inibindo a ativação e proliferação das células T. Esta proteína intracelular interage com o C-terminal da proteína-quinase Src reguladora, *Tyrosine-protein* kinase (Csk), que suprime os mediadores de sinalização do TCR, as quinases da família Src (Lck), formando um complexo que inibe a ativação de células T (Salas *et al.*, 2013) (Steck e Rewers, 2011) (Wang *et al.*, 2013).

1.3.3.1 Polimorfismo C1858T do gene PTPN22

Em 2004 foi relatada por Bottini *et al.* uma associação entre a presença de um SNP no gene PTPN22 e a suscetibilidade à DMT1 em duas populações distintas, utilizando uma abordagem de gene candidato (estudo de associação). Descrita na base de dados NCBI (rs2476601), esta é uma mutação *missense* na qual se dá uma substituição de uma citosina por uma timina na posição 1858 do exão 14 (CGG –

TGG), na região de codificação do gene PTPN22, e resulta na alteração de um aminoácido arginina (R) para um triptofano (W), no codão 620 (p.Arg620Trp) (Burn *et al.*, 2011). Estudos funcionais classificaram este polimorfismo no gene PTPN22 como um locus de suscetibilidade autoimune, indicando que a ligação da Lyp ao C-terminal da Csk encontra-se alterada na variante C1858T. Incapaz de ter uma regulação negativa através desta interação favorecendo a ativação imune, devido a uma supressão da sinalização do recetor de células T, uma vez que a mutação altera a interação Lyp-Csk, anulando a capacidade da molécula para se ligar à molécula de sinalização Lck, conduz a uma sinalização do TCR descontrolada e inapropriada, e a uma ativação dos linfócitos T prolongada que mantém a indução autoimunidade (figura 9) (Giza *et al.*, 2013) (Rani *et al.*, 2014) (Steck e Rewers, 2011). Esse polimorfismo está fortemente associado a um aumento do risco de resposta autoimune no humano, conferindo suscetibilidade à DMT1 em várias populações, sendo que o seu efeito parece ser independente do HLA (Silva *et al.*, 2008) (Burn *et al.*, 2011) (Wang *et al.*, 2013).

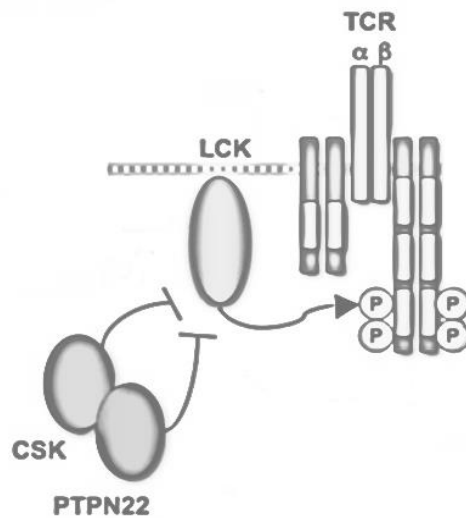


Figura 9. Esquema de sinalização inapropriada do TCR. A variante C1858T do PTPN22 altera a interação Lyp-CSK, incapacitando a molécula de se ligar à Lck, conduzindo a uma sinalização do TCR descontrolada e inapropriada, e a uma ativação dos linfócitos T prolongada que mantém a indução autoimunidade (Zikherman e Weiss, 2009).

Pela primeira vez Bottini *et al.* (2004) relataram que o alelo 1858T foi observado com maior frequência em pacientes com DMT1, quando comparados com indivíduos saudáveis da América do Norte e da Sardenha. Desde então, diferentes estudos associaram a presença do polimorfismo C1858T em várias populações com DMT1, como em Itália, Alemanha, Dinamarca, América do Norte, Reino Unido,

Suécia, Espanha, Ucrânia, Estónia, Holanda, Finlândia, França, Croácia, Noruega, Polónia, Rússia, Colômbia, República Checa, Azerbaijão, norte da Índia e no Brasil (Zhernakova *et al.*, 2005) (Santiago *et al.*, 2007) (Zheng e She, 2005) (Giza *et al.*, 2013) (Rani *et al.*, 2014). Observou-se um número significativamente maior de doentes com DMT1 na Ucrânia, com associação ao genótipo TT e alelo T, em comparação com controlos saudáveis. A frequência deste mesmo SNP varia de 0% em algumas populações asiáticas (Japão, Coreia e China) a 8 a 17% em diferentes grupos étnicos de origem europeia. A população africana também regista uma baixa frequência de associação do SPN com a doença (Rani *et al.*, 2014) (Giza *et al.*, 2013) (Zheng e She, 2005).

Tais diferenças étnicas tornam importante o estudo do papel deste SNP nas manifestações da doença em diferentes populações (Rani *et al.*, 2014).

1.3.4 Avanços da Biologia Molecular

Desde 1972 que uma série de descobertas tem vindo revolucionar a genética, surgindo assim a genética molecular. Com estes avanços tornou-se possível a aplicação de um conjunto de técnicas que permitem isolar e purificar genes de um determinado fragmento de DNA (Garcia e Chamas, 1996). Desde então a biologia molecular tem fornecido ferramentas essenciais que permitem aprofundar mecanismos moleculares que influem na variação da distribuição de doenças em famílias e nas populações (Gattás *et al.*, 2002).

Em 1978 desenvolveu-se o estudo de ligações genéticas baseado em RFLPs (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), restrição enzimática do DNA genómico humano por endonucleases de origem bacteriana, que originavam fragmentos polimórficos provocados por mutações, alterando a sequência reconhecida por enzimas de restrição (Regateiro, 2003). As endonucleases de restrição são enzimas bacterianas que atuam como "tesouras moleculares", que reconhecem uma curta sequência de DNA e clivam a dupla cadeia num ponto específico. Hoje conhecem-se centenas destas enzimas altamente específicas (uma vez que cada tipo de enzima reconhece e corta apenas uma determinada sequência de nucleótidos, em geral constituída por 4 ou 6 pares de bases), que são purificadas e comercializadas por diversos laboratórios no mundo.

Corresponde à variação, entre indivíduos, do comprimento dos fragmentos de DNA obtidos com enzimas de restrição e resulta de alterações da sequência de nucleótidos do DNA, que ocorrem normalmente cerca de uma vez em cada cem pares de bases e que podem alterar o sítio de restrição identificado pela nuclease utilizada (Regateiro, 2003).

Os RFLPs têm sido utilizados extensivamente em diversos campos da investigação básica, bem como na prática clínica, através da detecção de mutações por estudos de ligação genética (Regateiro, 2003).

Desenvolvida por Kary Mullis em 1980, a PCR (Reação da polimerase em cadeia) baseia-se na utilização da capacidade da DNA polimerase (uma enzima extraída da bactéria termofílica *Thermus aquaticus*, termoestável e termorresistente, que mantém a sua atividade a temperaturas elevadas) para sintetizar uma nova cadeia de DNA complementar da cadeia de molde, *in vitro* (PubMed, 2014). Apresenta uma ampla gama de aplicações em diversos ramos da pesquisa científica, possibilitando que determinada região do genoma, de qualquer organismo, seja multiplicada em milhões de cópias, facilitando a análise genética e permitindo o desenvolvimento de técnicas de diagnóstico muito mais sensíveis e mais específicas (Oliveira, 2007).

É um método que se realiza em três etapas e ciclos repetidos, iniciando-se com um processo de desnaturação, que consiste na rutura das ligações de hidrogénio que sustentam a dupla hélice, através de altas temperaturas. O que permite que se dê o segundo processo, *annealing*, através da ligação dos *primers* (oligonucleotídeos) à região complementar à sua sequência na amostra de DNA, hibridando com as extremidades 3'-OH da cadeia dupla. A temperatura de *annealing* depende, entre outros fatores, do tamanho do *primer* e da sua sequência de nucleótidos. Finalmente segue-se o processo de extensão, que consiste na elongação da cadeia de DNA pela enzima *Taq* polimerase, que se posiciona junto aos *primers*. Com o auxílio do magnésio (Mg^{2+}) (co-fator enzimático), é iniciada a síntese da nova cadeia, através da utilização de nucleótidos (desoxirribonucleótidos - dNTPs). São então formadas novas cadeias de DNA de dupla hélice, correspondente à região alvo de amplificação (delimitada pelos *primers*) (Oliveira, 2007).

Com os avanços da biologia molecular e das suas técnicas na área da saúde, tornou-se possível desenvolver a pesquisa e compreensão de alguns mecanismos de inúmeras doenças crónicas muito comuns como da demência, doença de Alzheimer e Diabetes Mellitus (Gattás *et al.*, 2002).

1.4 População em Estudo

Habitado desde o Paleolítico, o continente português foi palco de migração de diversos povos de diferentes origens. Celtas, Germânicos, Fenícios e uma grande diversidade de povos da bacia Mediterrânica, tendo sido habitado por povos Árabes e do norte de África por mais de 700 anos (Spínola, 2005).

Com o início da era dos descobrimentos, Portugal inaugurava a longa história da Civilização Ocidental (NEWCO, 2013).

Em 1418 João Gonçalves Zarco descobriu a ilha do Porto Santo, chegando à ilha da Madeira em 1420. Procedeu à sua colonização em 1425 por nobres portugueses, judeus, exilados, condenados e escravos africanos (NEWCO, 2013).

No mesmo século foi descoberto o arquipélago de Cabo Verde. Povoado por alguns caucasianos e por escravos da costa oeste de África, capturados a partir da costa da Guiné, serviu como um posto central no comércio de escravos para a Europa (Spínola *et al.*, 2005).

A Madeira, devido à proximidade com o continente africano e envolvida no seu processo de reconhecimento, ocupação e defesa, tinha as portas abertas ao comércio de escravos da costa oeste africana. Estes chegaram mesmo a constituir em meados do século XVI 10% da população, tendo contribuído para o arranque económico do arquipélago nos séculos XV e XVI (Spínola, 2005) (Vieira, 2003) (Saldanha *et al.*, 2009). As populações da costa oeste africana constituem o resultado de uma complexa e contínua rede de migrações, invasões e cruzamento de povos de diferentes origens que se iniciou há 40 mil anos (Spínola, 2005). A sociedade madeirense resultou desse processo de migração de colonos do reino, e estrangeiros que surgem na ilha sob a condição servil (Vieira, 2003). Durante este processo, os homens portugueses comumente escolhiam escravas como companheiras (Saldanha *et al.*, 2009).

A Madeira tornou-se o primeiro e mais importante entreposto comercial insular no Oceano Atlântico. Com o crescimento das explorações geográfica e comercial da costa ocidental africana, e mais tarde com a expansão dos descobrimentos, crescia a importância do Funchal como porto de escala dos navios portugueses a caminho do Golfo da Guiné, e posteriormente do Brasil e da Índia (NEWCO, 2013). A partir deste momento, inúmeros indivíduos de várias origens europeias tais como espanhóis, italianos, franceses e ingleses também se fixaram na ilha (Spínola, 2005). Começava

desta forma o ciclo económico do açúcar na História da Madeira, que perduraria por mais de um século como principal fonte de riqueza dos seus habitantes. Com esta evolução, aportam à ilha várias famílias de negociantes e financeiros oriundos daquelas paragens, que acabaram por fixar residência no arquipélago (NEWCO, 2013).

Temos hoje uma vaga ideia da presença de algumas das minorias étnicas que no início do povoamento do arquipélago moldaram a população, já que nos primórdios da sua ocupação constituíam um autêntico mosaico, contribuindo para a *pool* genética atual deste arquipélago (Vieira, 2010).

Estudos anteriores demonstraram que as frequências dos haplotipos são características de populações específicas e mesmo certos alelos são encontrados exclusivamente em alguns grupos étnicos. Foram estudados alguns haplotipos HLA em populações da África subsaariana, no entanto os dados ainda são escassos, especialmente entre povos do oeste africano (Spínola *et al.*, 2005).

Investigadores lançaram o maior estudo já feito de dados genéticos africanos, em que incluíram a pesquisa de mais de quatro milhões de genótipos, contribuindo para uma biblioteca de novas informações sobre o continente do qual se pensa ser a fonte genética das mais antigas povoações dos humanos modernos. O estudo demonstra uma diversidade surpreendente no continente, ancestralidade partilhada entre diversos grupos divergentes (University of Pennsylvania, 2009).

O Laboratório de Genética Humana (LGH) da Universidade da Madeira (UMa), realizou, sob a coordenação do biólogo madeirense Hélder Spínola, um estudo que permitiu identificar o perfil genético da população do Arquipélago, como também de Portugal Continental, Arquipélagos dos Açores, Cabo Verde, São Tomé e Príncipe e da Guiné (figura 10). Como resultado, comprovou-se que os perfis genéticos dos habitantes do Arquipélago da Madeira terão influências de cerca 10 a 15% de características genéticas africanas (Silva, 2007). Apesar da filogenia da população madeirense apresentar um comportamento semelhante a Portugal continental, posicionando-se entre as populações europeias e africanas, com este estudo verificou-se que a população madeirense apresenta 3,5% de haplotipos e ainda alelos raros de origem africana, o que a distingue de outras populações portuguesas (Spínola, 2005).



Figura 10. Mapa da localização geográfica das populações estudadas pelo Laboratório de Genética Humana da Universidade da Madeira no que à diversidade dos genes HLA diz respeito (Portugal Continental, Açores, Madeira, Cabo Verde, Guiné-Bissau e São Tomé e Príncipe) (Silva, 2007).

É conhecida a diversidade dos haplotipos HLA-DQA1-DQB1-DRB1 em populações etnicamente distintas, comprovado por inúmeros estudos populacionais, o que pode explicar em parte a diferença nas taxas de ocorrência da doença.

2. Objetivos

Esta investigação teve como objetivo estudar a associação do SNP A49G no gene CTLA4 à suscetibilidade genética para o desenvolvimento da DMT1 na população madeirense, tendo sido, para o efeito, caracterizadas todas as amostras (controlo e doentes) em função da presença deste polimorfismo. Por fim, através de análise estatística, pretendeu-se avaliar a relação deste polimorfismo no gene CTLA4 com os existentes nos genes HLA, tendo-se para esse fim recorrido a resultados obtidos num estudo previamente desenvolvido na mesma população.

3. Metodologia

3.1 População em estudo

No presente estudo foram analisadas 81 amostras de doentes diagnosticados com DMT1 pelo Serviço de Endocrinologia do Hospital Dr. Nélio Mendonça, no Funchal, e 98 amostras representativas da população madeirense, constituídas por indivíduos aparentemente saudáveis, para servirem como controlo. As amostras utilizadas no presente estudo já haviam sido recolhidas previamente pelo Laboratório de Genética Humana da UMa e pelo Serviço de Endocrinologia do Hospital Dr. Nélio Mendonça, após aprovação por parte da Comissão de Ética do hospital e mediante consentimento informado dos doentes, tendo inclusive sido já caracterizadas relativamente aos genes HLA-DQA1, HLA-DQB1 e HLA-DRB1.

3.2 Colheita das amostras

3.2.1 Amostras de doentes com Diabetes Mellitus tipo 1

A colheita de DNA genómico de doentes com diagnóstico de DMT1 foi feita a partir de saliva recolhida com a utilização do *kit* comercial *Oragene*[®], da *DNA Genotek*, de acordo com as indicações do fabricante. Este *kit* consiste em dois recipientes, um destinado à recolha da saliva e outro (a tampa) contendo um líquido transparente e incolor com o propósito de preservar o DNA genómico, que ao fechar permite a sua mistura com o material biológico.

Após a colheita, os *kits* foram armazenados à temperatura ambiente (15 a 30°C).

3.2.2 Amostras de casos controlo

A recolha de DNA genómico das amostras correspondentes aos casos controlo foi realizada a partir de sangue periférico colhido entre voluntários a cumprir serviço militar obrigatório em meados dos anos 1990, aparentemente saudáveis e com ascendentes nascidos na Madeira, e armazenado a -80°C.

3.3 Processamento das amostras

3.3.1 Extração de DNA genómico a partir de saliva

A extração do DNA genómico das amostras de saliva foi realizada de acordo com as indicações do fabricante e segundo o protocolo incluído no *kit Oragene*[®], que consiste em diversos passos de purificação do DNA (anexo 1). Posteriormente à extração, foram armazenadas alíquotas correspondentes a cada amostra, diluídas em água destilada ultrapura (GIBCO[®]) e armazenadas a -20°C.

3.3.2 Extração de DNA genómico a partir de sangue periférico

O DNA genómico de sangue periférico, correspondente a cada amostra de casos controlo, já havia sido extraído através da técnica de *Salting out* (anexo 2) e armazenado a -20°C em alíquotas diluídas em água destilada ultrapura (GIBCO[®]).

3.4 Deteção do polimorfismo A49G do locus CTLA4

3.4.1 Amplificação de fragmentos de DNA por PCR

A amplificação de uma região correspondente ao polimorfismo A49G, do cromossoma 2, localizada no codão 17, do exão 1 do gene CTLA4, foi desenvolvida utilizando os *primers forward* (5'-GCTCTACTTCCTGAAGACCT-3') e *reverse* (5'-AGTCTCACTCACCTTTGCAG-3') (anexo 3) de acordo com o descrito por Donner *et al.* (1997). Procedeu-se a algumas modificações da técnica descrita de forma a conseguir a obtenção dos resultados pretendidos. Foi necessário proceder a alterações na concentração de cada reagente de forma a obter apenas a banda de DNA de interesse, aumentando a especificidade e eficiência da técnica desfavorecendo a amplificação de fragmentos inespecíficos e a formação de dímeros de *primers*. Foram ainda feitas alterações ao nível da concentração de DNA e na temperatura e tempo de *annealing*.

Para amplificação do DNA preparou-se previamente uma mistura com um volume final de 27 µl da qual constavam todos os reagentes necessários à realização da técnica de PCR. Para tal adicionaram-se 2 µl de DNA genómico correspondente a cada amostra de doentes e de controlo, 3,5 µl de tampão [10x], 3,5 µl de MgCl₂ (25

mM), 2 µl de dNTPs (2mM), 1 µl de cada *primer* (100 pmol/µl) a [10x], 0,2 µl de *Taq* polimerase (5U/µl) (*Solis BioDyne*). Foi também adicionado 2,5 µl vermelho de Cresol (AppliChem), um corante laranja comumente utilizado em biologia molecular, que permite dar cor à amostra (uma cor púrpura devido ao seu pH quando em junção com a mistura preparada) de forma a monitorar o processo de eletroforese e ainda facilitar a manipulação da amostra. Finalmente adicionou-se 11,5 µl de água destilada ultrapura (GIBCO®) perfazendo o volume total da reação.

Colocaram-se os tubos de PCR correspondentes a cada amostra no termociclador *2720 Thermal Cycler* (Applied Biosystems™) para amplificação da sequência alvo do gene CTLA4.

A PCR foi programada para realizar uma desnaturação inicial a 96°C durante 5 minutos, passando a uma repetição de 30 ciclos de desnaturação a 96°C durante 45 segundos, *annealing* a 58°C durante 45 segundos e extensão a 72°C por 45 segundos, após a conclusão dos 30 ciclos seguiu-se de uma extensão final a 72°C por 7 minutos.

3.4.2 Controlo da eficiência dos produtos amplificados

Para controlo da eficiência de cada reação de PCR foi realizada uma eletroforese em gel de agarose a 3% (p/v) (percentagem expressa em peso por volume) que envolveu a migração dos fragmentos de DNA amplificados, de forma a separar através da aplicação de um campo elétrico, cada fragmento de acordo com o seu peso molecular e de acordo com as suas cargas elétricas, em campo elétrico. Moléculas com carga negativa migram para o polo positivo (ânodo), como é o caso da molécula de DNA e moléculas com carga positiva migram para o polo negativo (cátodo).

Para realização deste gel a 3% foram diluídas 3g de agarose (SeaKem®) em 100 mL de tampão TAE 1x (anexo 4) e finalmente adicionados 7 µl de brometo de etídio (Fisher Scientific), utilizado como corante fluorescente, de forma a permitir a visualização dos produtos de PCR quando sujeitos à radiação ultravioleta de um transiluminador. Devido ao seu poder intercalante na molécula de ácido nucleico, o brometo de etídio possibilita a visualização dos fragmentos de DNA através da eletroforese em gel de agarose, uma vez que quando se expõe esta substância à luz ultravioleta, emite uma luz vermelha alaranjada que se intensifica 20 vezes depois de se ter intercalado à cadeia de DNA. Trata-se de um procedimento de risco uma vez

que o brometo de etídio é considerado um agente mutagénico potente e possivelmente cancerígeno (Carniello *et al.*, 2008), contornável com a utilização de outros corantes fluorescentes, como o caso do *GelRed*[™].

Do volume total submetido à reação de PCR, foram utilizados 10 µl para controlo de eficiência da reação de amplificação através da sua eletroforese em gel de agarose a 3% (p/v) (SeaKem[®]), a uma voltagem de 70V (volts) durante 30 minutos.

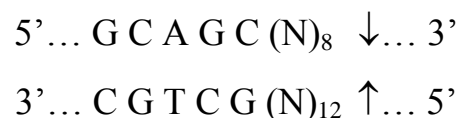
Após a visualização do gel, com ajuda de um transiluminador (Syngene), procedeu-se à seleção das amostras que possuíam, de acordo com o sucesso da reação de amplificação, as condições necessárias para ser submetida à digestão da enzima utilizada para a análise do polimorfismo em estudo. Estas foram selecionadas tendo em conta a intensidade e nitidez da banda correspondente a cada amostra. Uma vez que quanto mais intensa a banda, melhor a interpretação dos resultados após a digestão enzimática, menor a perda de qualidade após os diversos processos aos quais são submetidas até à caracterização da amostra.

3.5 Técnica de RFLP

Para este estudo foi utilizada uma enzima de restrição de forma a reconhecer a sequência de pares de bases em estudo, cortando-a nos pontos específicos do polimorfismo em estudo, uma vez que esta reconhece e corta apenas uma determinada sequência de nucleótidos. Para tal, recorreu-se à utilização da enzima *Lsp1109I* para reconhecimento do polimorfismo associado à sequência estudada do gene CTLA4.

3.5.1 Enzima de restrição *Lsp1109I* (*BbvI*)

A enzima de restrição *Lsp1109I*, da *Thermo Scientific*, foi utilizada para o estudo do polimorfismo A49G presente no gene CTLA4, uma vez que reconhece a sequência:



Baseia-se na utilização de proteínas da bactéria *Lactobacillus sp.*, também conhecida como bacilo de Döderlein, um género de bactérias anaeróbicas gram-positivas presentes no sistema ginecológico e no trato gastrointestinal dos seres humanos.

Esta enzima de restrição é um isoesquisómero, ou seja, uma enzima que reconhece a mesma sequência que a anteriormente utilizada, a *BbvI*, retirada de uma bactéria gram-positiva, aeróbica, a *Brevibacillus brevis*, comumente encontrada no solo, ar, água e matéria em decomposição (Vincze *et al.*, 2003), para reconhecimento da sequência em estudo.

Para realização da digestão enzimática foram utilizados 10 µl de produto de PCR, aos quais adicionou-se 1 µl da enzima de restrição *Lsp1109I Fast Digest Enzyme* (Thermo Scientific), 2 µl de Tampão 10x *Fast Digest* e 17 µl de água destilada ultrapura (GIBCO®) de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante.

Colocou-se a mistura referente ao protocolo de digestão enzimática em banho-maria a 37°C, durante 5 minutos, após o qual procedendo-se à inativação da enzima de restrição, submetendo as amostras a uma temperatura de 65°C durante 5 minutos.

3.5.2 Eletroforese em gel de agarose 3% (p/v) do produto da digestão

Para análise do polimorfismo referente a cada amostra, após a digestão enzimática, utilizou-se o volume total dos produtos de digestão e realizou-se uma eletroforese capilar em gel de agarose a 3% (p/v) (SeaKem®), durante cerca de 45 minutos, a 70V, de forma a separar bem as bandas obtidas, permitindo uma melhor avaliação do tamanho destas, para posterior caracterização das amostras.

Para a primeira eletroforese, correspondente à pesquisa do polimorfismo no gene CTLA4, foi utilizado um marcador de peso molecular, *GeneRuler 50pb* (pares de bases) *DNA Ladder* (anexo 4), permitindo quantificar e dimensionar os produtos obtidos, após o qual passou-se a utilizar duas referências: uma constituída pelo amplificado não digerido, ou seja, com um total de 162pb e outra correspondente a uma amostra caracterizada inicialmente com a ajuda do marcador molecular como heterozigótica, ou seja, no qual se verificou a presença de 3 bandas, correspondentes aos dois alelos, uma com 162pb (produto não digerido) e outras duas com 88pb e 74pb (após o corte pela enzima de restrição *Lsp1109I*).

3.6 Interpretação dos produtos da digestão

Após ter submetido os produtos amplificados à digestão enzimática obtiveram-se, em gel de agarose a 3% (p/v), três diferentes padrões que permitiram caracterizar

cada amostra. De forma a facilitar a posterior padronização e avaliação estatística, foram atribuídas siglas a cada um dos três padrões observados. Assim sendo, AA corresponderá às amostras homozigóticas normais (*wild-type*), não se verificando substituição de bases nestes casos; AG corresponderá às amostras heterozigóticas mutadas, em que se verifica a presença de uma mutação apenas num dos alelos dos indivíduos e finalmente GG a amostras de indivíduos homozigóticos mutados, em que se verifica a presença do SNP A49G em ambos os alelos.

3.7 Seleção dos haplotipos HLA

Os haplotipos HLA utilizados no presente estudo foram selecionados a partir de dados previamente obtidos pelo Laboratório de Genética Humana da Universidade da Madeira com as mesmas amostras de doentes e de população controlo utilizadas para caracterizar o polimorfismo A49G CTLA4. Para esta seleção tomou-se como referência os haplotipos já identificados em estudos anteriores como conferindo risco ou proteção ao desenvolvimento da DMT1 (tabela 1) (Redondo *et al.*, 2001) e confirmou-se a sua associação à população em estudo.

3.8 Abordagem à caracterização do polimorfismo C1858T no gene PTPN22

Como abordagem inicial à continuação do estudo genético da DMT1 na população madeirense foi desenvolvido no âmbito deste projeto a adaptação da técnica de caracterização do polimorfismo C1858T no gene PTPN22 para aplicação no LGH – UMA. Os *primers* 5'-ACTGATAATGTTGCTTCAACGG-3' (*forward*) e 5'-TCACCAGCTTCCTCAACCAC-3' (*reverse*) (anexo 3) foram utilizados para amplificação de uma região do cromossoma 1, localizada no codão 620 do exão 14, do gene PTPN22 de acordo com o estudo realizado numa população de origem indiana por Rani *et al.* (2014), de forma a estudar a presença do polimorfismo C1858T.

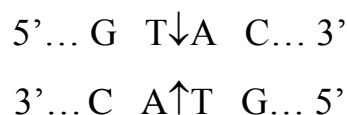
Para amplificação do DNA referente a cada amostra introduziram-se algumas alterações à técnica descrita. Preparou-se uma mistura com 2 µl de DNA genómico, 3,5 µl de tampão [10x], 3,5 µl de MgCl₂ (25 mM), 2 µl de dNTPs (2mM), 1 µl de cada *primer* (100 pmol/µl) a [10x], 0,2 µl de *Taq* polimerase (5U/µl) (Solis BioDyne), 2,5

μl de vermelho de Cresol e 11,5 μl de água destilada ultrapura (GIBCO®) perfazendo um volume final da reação de 27 μl.

Colocaram-se as amostras no termociclador *2720 Thermal Cycler* (Applied Biosystems™), seguindo o protocolo descrito com uma desnaturação inicial a 94°C durante 2 minutos, passando a uma repetição de 30 ciclos de 30 segundos de desnaturação a 94°C, *annealing* a 60°C durante e extensão a 72°C, finalizando com uma extensão a 72°C por 7 minutos.

3.8.1 Enzima de restrição *RsaI*

A enzima de restrição *RsaI*, da *Thermo Scientific*, retirada de uma espécie de bactérias roxas, *Rhodobacter sphaeroides*, foi utilizada para o estudo do polimorfismo C1858T no gene PTPN22, uma vez que estas endonucleases cortam a molécula de DNA através do reconhecimento da seguinte sequência nucleotídica:



Para digestão enzimática da região da amostra foram utilizados 10 μl de DNA dos produtos de PCR, aos quais adicionou-se 1 μl da enzima de restrição *RsaI* (Thermo Scientific), 2 μl de Tampão 10x *Tango* e 18 μl de água destilada ultrapura (GIBCO®) de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante.

Efetuaram-se diversas tentativas para chegar a um consenso do que seria o tempo mais adequado para a atuação da enzima de restrição, uma vez que o protocolo fornecido pelo fabricante indica um intervalo de tempo de 1 a 16 horas, em banho-maria a 37°C. Chegou-se à conclusão que, para o tamanho do fragmentos amplificado (218pb), a digestão enzimática de 2 horas era o suficiente para permitir uma caracterização das amostras em estudo.

3.8.2 Eletroforese em gel de agarose 3% (p/v) do produto da digestão

Recorreu-se aos mesmos parâmetros utilizados para o estudo do polimorfismo A49G, de forma a caracterizar as amostras correspondentes ao estudo do polimorfismo C1858T no gene PTPN22, tendo em conta que o padrão de corte da enzima de restrição

RsaI (Thermo Scientific) difere da anteriormente utilizada. Neste caso, a enzima reconhece e cliva uma região da sequência amplificada correspondente às amostras normais, originando um fragmento com 176pb e outro com 42pb. Nos casos homozigóticos mutados, o fragmento permanece intacto, com 218pb.

3.8.3 Interpretação dos produtos da digestão

Obtiveram-se em gel de agarose a 3% (p/v) após ter submetido os produtos amplificados à digestão enzimática, três diferentes padrões que permitiram caracterizar cada amostra. Foram atribuídas siglas a cada um dos três padrões observados sendo CC correspondente às amostras homozigóticas *wild-type*; CT às amostras heterozigóticas e TT a amostras de indivíduos homozigóticos mutados, em que se verifica a presença do SNP C1858T em ambos os alelos.

3.9 Análise estatística

Através do programa *SPSS Statistic 20* (IBM) calcularam-se, na amostra de doentes e na população controlo, as frequências alélicas e genotípicas do polimorfismo A49G CTLA4 e a prevalência dos haplotipos HLA que conferem risco ou proteção ao desenvolvimento da doença.

Recorrendo ainda ao programa *SPSS Statistic 20*, pesquisou-se a existência de associações entre os polimorfismos genéticos estudados (A49G CTLA4 e haplotipos HLA) e o desenvolvimento da DMT1, calculando para o efeito os valores de *Odds Ratio* (OR), e respetivo intervalo de confiança 95% (IC) e significância, assim como identificando, para cada um dos polimorfismos, as diferenças significativas entre a amostra de doentes e a população controlo, através da aplicação do teste do Qui-quadrado (X^2). A significância foi calculada tendo por base uma probabilidade de 95% num teste unilateral (*1-tailed*). Para a população controlo foi ainda avaliado o Equilíbrio de *Hardy-Weinberg* (HWE), recorrendo à folha de cálculo disponibilizada pela Universidade de Tufts, em Massachusetts (Court, 2008).

O OR corresponde a uma medida de associação entre uma exposição e um resultado, utilizado neste estudo para avaliar a força da associação entre o polimorfismo A49G no gene CTLA4 e o risco de desenvolver DMT1. Ou seja, é uma estimativa do risco relativo utilizada para análise em estudos caso-controlo (Regateiro, 2003) (Sedgwick e Marston, 2010). Um valor de OR igual a 1 indicia que o

polimorfismo não confere risco nem proteção, quando é inferior a 1 indicia a existência de proteção e quando é superior a 1 indicia a existência de risco para o desenvolvimento de DMT1.

O intervalo de confiança de 95% é usado para verificar a precisão da OR. Um grande IC em torno do valor de OR indica um baixo nível de precisão. Sendo que, pelo contrário, um pequeno IC revela uma maior precisão (Sedgwick e Marston, 2010). É também importante ter em conta que se o limite inferior do IC for superior a 1 reforçará a associação de risco conferida pelo OR (Rumel, 1986).

Um teste de significância refere-se a uma regra decisória que permite rejeitar ou não a hipótese estatística formulada com base na amostra em estudo. O nível de significância considerado ($\alpha < 0,05$) corresponde ao limite que se coloca como base para afirmar que os valores comparados são significativamente diferentes, indicando a existência de associações entre os polimorfismos genéticos estudados e o desenvolvimento da DMT1. Os valores obtidos foram avaliados para um teste unilateral (1-tailed), uma vez que o intuito foi o de verificar se o padrão mínimo estipulado foi atingido (Câmara e Silva, 2001) (Afonso, 2014).

O Equilíbrio de *Hardy-Weinberg* avalia a representatividade da amostra comparando os genótipos observados com os esperados em condições em que ocorram cruzamentos ao acaso, as frequências alélicas e genotípicas sejam constantes e não haja uma alteração na frequência dos genes na população por mutação, seleção natural ou migração (uma vez que a entrada de uma determinada percentagem de genes numa população altera a frequência génica verificada antes da migração) (Regateiro, 2003). O HWE estabelece que, para um determinado par de alelos com frequências p e q , numa população mendeliana em equilíbrio, a frequência dos diferentes genótipos em cada geração estará de acordo com a expressão $p^2 + 2pq + q^2 = 1$. O equilíbrio obtido no modelo de HWE é probabilístico, sendo exato apenas quando o desvio-padrão associado às frequências dos genes é nulo (Andrews, 2010). Para a análise deste modelo foi considerado 1 grau de liberdade (calculado pela diferença entre o número de genótipos e o número de alelos) e um nível de significância de 5% para um valor crítico de 3,84.

4. Resultados

4.1 Produtos de PCR

Na figura 11 é possível verificar a eletroforese em gel de agarose a 3% (p/v) de produtos de amplificação, correspondentes a quinze diferentes amostras de doentes com diagnóstico confirmado de DMT1. Estes resultados são representativos dos restantes obtidos ao longo do estudo, de todas as amostras (doentes e controlos), para pesquisa do polimorfismo A49G do gene CTLA4.

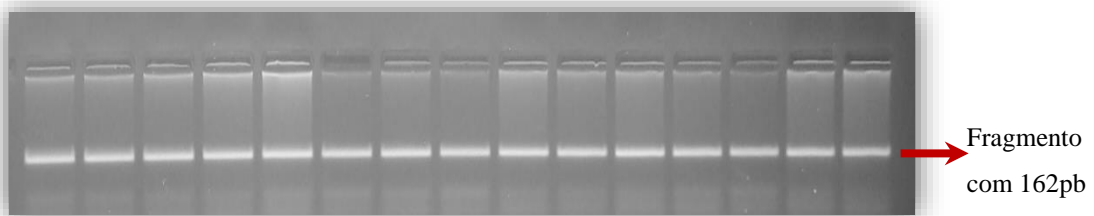


Figura 11. Eletroforese em gel de agarose a 3% (p/v) do produto de PCR de quinze amostras para o polimorfismo A49G CTLA4, que corresponde ao fragmento com 162pb assinalado na imagem.

No apuramento da metodologia para a pesquisa do polimorfismo C1858T do gene PTPN22, a desenvolver futuramente no LGH-UMa, obtiveram-se com sucesso produtos de PCR para várias amostras, as quais foram sujeitas a eletroforese em gel de agarose a 3% (p/v) para separação dos fragmentos de acordo com o seu peso molecular. Na figura 12 são apresentadas quatro amostras diferentes de doentes com DMT1, resultados representativos dos restantes obtidos nesta abordagem à metodologia para a caracterização do polimorfismo C1858T do gene PTPN22.

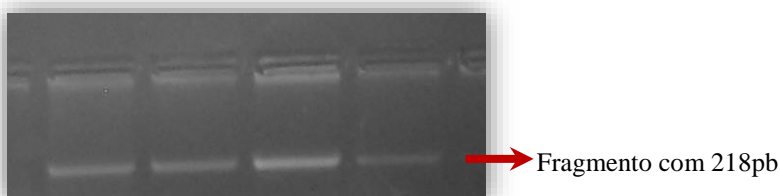


Figura 12. Eletroforese em gel de agarose a 3% (p/v) do produto de PCR de quatro amostras para o polimorfismo C1858T PTPN22, correspondente ao fragmento com 218pb assinalado na imagem.

4.2 Produto das digestões enzimáticas

A figura 13 apresenta uma eletroforese em gel de agarose a 3% (p/v), dos produtos de digestão com a enzima *Lsp1109I* para os produtos de PCR correspondentes ao polimorfismo A49G CTLA4, representativo do obtido para todas as amostras.

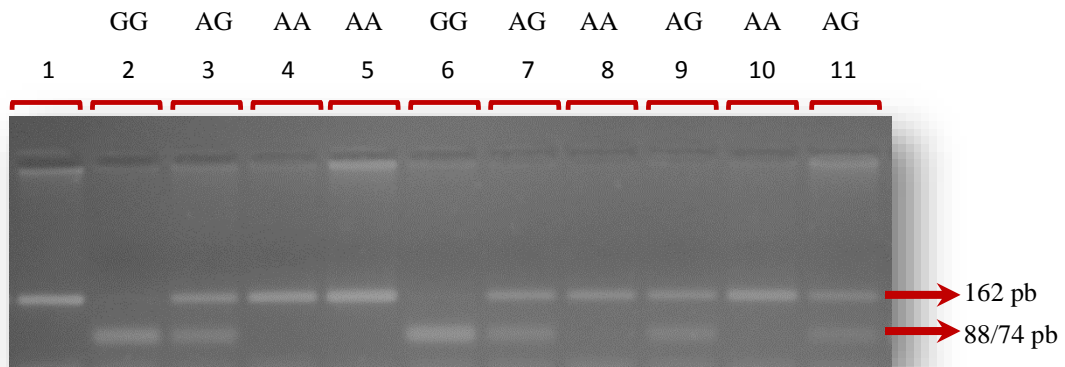


Figura 13. Eletroforese em gel de agarose a 3% representativa dos produtos de digestão com a enzima de restrição *Lps1109I* para o polimorfismo A49G CTLA4. Corresponde a dez amostras de doentes com DMT1, sendo a amostra 1 o produto de amplificação não digerido, com 162pb, utilizada como referência, as amostras 4, 5, 8 e 10 homocigóticos *wild-type* (AA), com fragmento de 162pb, as amostras 3, 7, 9 e 11 heterocigóticos (AG), com fragmentos de 162 e 88/74 pb e, finalmente, as amostras 2 e 6 homocigóticos mutados (GG), com fragmentos de 88/74 pb.

A figura 14 apresenta uma eletroforese em gel de agarose a 3% (p/v) dos produtos de digestão com a enzima *RsaI* para os produtos de PCR correspondentes ao polimorfismo C1858T PTPN22, representativo do obtido nesta abordagem à metodologia para a caracterização do polimorfismo C1858T do gene PTPN22.

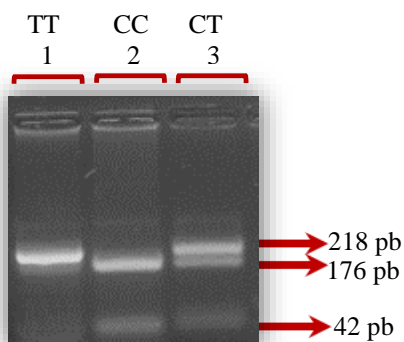


Figura 14. Eletroforese em gel de agarose a 3% (p/v) representativa dos produtos de digestão com a enzima de restrição *RsaI* para o SNP C1858T PTPN22. Corresponde a três amostras de doentes com DMT1, sendo a amostra 1 homocigótico mutado (TT), com fragmento de 218pb, a amostra 2 homocigótico *wild-type* (CC), com fragmento com 176 e 42pb e a amostra 3 heterocigótica (CT), com fragmento com 218, 176 e 42pb.

4.3 Equilíbrio de *Hardy-Weinberg*

Com a aplicação do modelo de HWE verificou-se que a frequência do alelo A foi de 66,3% e do alelo G de 33,7%, com um *p-value* de 0,62, não se rejeitando, portanto, a hipótese nula de que os valores observados e esperados não são significativamente diferentes. Desta forma concluiu-se que a distribuição genotípica referente aos casos controlo encontra-se em Equilíbrio de *Hardy-Weinberg*. Assim, concluiu-se que a população de controlo selecionada é representativa.

4.4 Frequências alélicas e genotípicas do polimorfismo A49G CTLA4

A distribuição alélica e genotípica do polimorfismo A49G do gene CTLA4 em doentes e controlos encontra-se representada na tabela 2. Os resultados correspondentes a cada uma das amostras em estudo podem ser consultados no anexo 5 (resultados das amostras de doentes com DMT1) e no anexo 6 (resultados das amostras dos casos controlo).

Como podemos constatar na tabela 2 não existem diferenças significativas entre a amostra de doentes e a população controlo, quer nas frequências genotípicas quer nas frequências alélicas, sendo o genótipo heterozigótico AG o mais prevalente, tanto na população controlo (46,9%) como na amostra de doentes com DMT1 (45,7%). O alelo A é o mais frequente tanto na população controlo (66,3%) como na amostra de doentes com DMT1 (64,8%). Em linha com a ausência de diferenças significativas entre doentes e casos controlo, os valores de OR aproximam-se todos de 1 e, como tal, da neutralidade em relação ao desenvolvimento da doença.

Tabela 2. Distribuição genotípica e alélica correspondente ao SNP A49G do gene CTLA4 em doentes com DMT1 e casos controlo. Teste χ^2 . DMT1 – Diabetes Mellitus tipo 1; OR – *Odds Ratio*; IC – Intervalo de Confiança.

Genótipos/alelos	DMT1 (n=81)	Controlo (n=98)	<i>p-value</i>	OR	IC	<i>p-value</i>
AA	42,0%	42,9%	0,45224	0,965	0,532 – 1,750	0,9645
AG	45,7%	46,9%	0,43644	0,951	0,527 – 1,715	0,8664
GG	12,3%	10,2%	0,32997	1,239	0,489 – 3,143	0,6512
A	64,8%	66,3%	0,38209	0,9352	0,604 – 1,449	0,7644
G	35,2%	33,7%		1,0693	0,6901 – 1,657	0,7644

4.2.2 Distribuição dos haplotipos HLA de risco em casos de doentes com DMT1 e casos controlo

Os haplotipos HLA de risco para o desenvolvimento da DMT1 identificados na amostra de doentes e na população controlo podem ser consultados na tabela 3, assim como as respetivas prevalências, valores de OR, IC e significâncias. Os haplotipos HLA RE①, RE② e RE④ são significativamente mais prevalentes nos doentes com DMT1 que na população controlo ($p < 0,05$), apresentando também valores de OR elevados e significativos, o que confirma a sua associação ao aumento do risco de desenvolver a DMT1 também na população madeirense. Os haplotipos HLA RE③ e RM② apesar de não apresentarem diferenças significativas entre doentes e controlos, possuem valores de p muito próximos de 0,05 e apresentam valores de OR superiores a 2, embora sem significância. O único haplotipo HLA que revela claramente a inexistência de diferenças entre doentes e controlos é o RM① ($p = 0,448$), com OR muito próximo de 1.

Para melhor visualização, o gráfico 1 reproduz as frequências dos haplotipos HLA de risco elevado (RE①, RE②, RE③ e RE④) e respetivas significâncias para as amostras de doentes com DMT1 e população controlo. No gráfico podemos observar que o haplotipo RE④ apresenta as prevalências mais elevadas e a maior significância.

Interessa ainda referir que, de entre todas as amostras de doentes, apenas 21% não possuíam qualquer haplotipo HLA considerado de risco para o desenvolvimento da DMT1, enquanto que para a população controlo esse valor atinge 64,3% (*data not shown*).

Tabela 3. Distribuição dos haplotipos de risco dos genes HLA-DQA1, HLA-DQB1 e HLA-DRB1 em doentes com DMT1 e casos controlo. Teste X^2 . DMT1 – Diabetes Mellitus tipo 1; OR – *Odds Ratio*; IC – Intervalo de Confiança.

Haplotipos	DMT1 (n=162)	Controlo (n=196)	<i>p-value</i>	OR	IC	<i>p-value</i>
DQA1*03:01-DQB1*03:02-DRB1*04:01 - RE ①	9,26%	1,02%	0,00013	9,898	2,229 – 43,957	0,0026
DQA1*03:01-DQB1*03:02-DRB1*04:02 - RE ②	5,56%	1,02%	0,00657	5,706	1,215 – 26,796	0,0273
DQA1*03:01-DQB1*03:02-DRB1*04:05 - RE ③	2,47%	0,51%	0,05821	4,9367	0,546 – 44,615	0,1551
DQA1*05:01-DQB1*02:01-DRB1*03:01 - RE ④	32,1%	12,76%	0,00	3,233	1,896 – 5,514	<0,0001
DQA1*04:01-DQB1*04:02-DRB1*08:01 - RM ①	1,85%	2,04%	0,44828	0,906	0,200 – 4,106	0,8978
DQA1*01:01-DQB1*05:01-DRB1*01:01 - RM ②	6,17%	3,06%	0,0778	2,083	0,741 – 5,861	0,1643

Nota: a distribuição dos haplotipos HLA considerados de risco para o desenvolvimento da DMT1 na população madeirense surge em 79% dos doentes e em apenas 36% dos controlos ($p=0$).

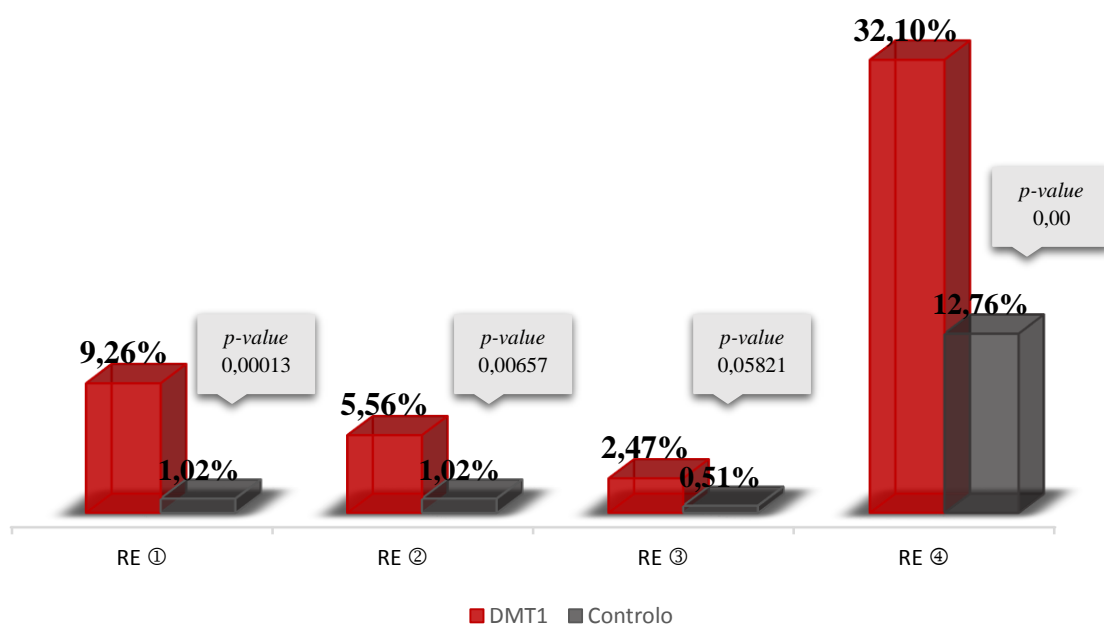


Gráfico 1. Distribuição dos haplotipos de risco dos genes HLA-DQA1, HLA-DQB1 e HLA-DRB1, em doentes com DMT1 (Diabetes Mellitus tipo 1) e casos controlo. DQA1*03:01-DQB1*03:02-DRB1*04:01 – RE ①; DQA1*03:01-DQB1*03:02-DRB1*04:02 - RE ②; DQA1*03:01-DQB1*03:02-DRB1*04:05 – RE ③; DQA1*05:01-DQB1*02:01-DRB1*03:01 – RE ④

4.2.3 Distribuição dos haplotipos HLA de proteção em casos de doentes com DMT1 e casos controlo

Os haplotipos HLA de proteção contra o desenvolvimento da DMT1 identificados na amostra de doentes e na população controlo podem ser consultados na tabela 4, assim como as respetivas prevalências, valores de OR, IC e significâncias.

Os haplotipos HLA PE ① e PE ③ são significativamente mais prevalentes na população controlo do que nos doentes com DMT1 ($p < 0.05$), apresentando também valores de OR menores do que 1. O haplotipo PE ① apresenta um valor de OR (0,0316) com significância ($p = 0,0163$), confirmando a sua associação à proteção contra o desenvolvimento de DMT1 também na população madeirense. O haplotipo PE ③, apesar de apresentar um valor de OR (0,6025) sem significância (0,6802), também revela a possibilidade de ser um fator de proteção contra a doença. Nenhum dos três haplotipos HLA de proteção moderada (PM ①, PM ② e PM ③) apresenta diferenças significativas entre doentes e controlos, nem significância ao nível dos valores de OR. No entanto os haplotipos HLA PM ① e PM ③ mostram valores de OR inferiores a 0,5, em consonância com a sua classificação como de proteção. De referir que o haplotipo

HLA DQA1*01:01-DQB1*05:03-DRB1*14:01, considerado de proteção elevada contra o desenvolvimento da DMT1, não foi encontrado no presente estudo, tanto na amostra de doentes como da população controlo.

Tabela 4. Distribuição dos haplotipos de proteção dos genes HLA-DQA1, HLA-DQB1 e HLA-DRB1 em doentes com DMT1 e casos controlo. Teste X^2 . DMT1 – Diabetes Mellitus tipo 1; OR – *Odds Ratio*; IC – Intervalo de Confiança.

Haplotipos	DMT1 (2n=162)	Controlo (2n=196)	<i>p-value</i>	OR	IC	<i>p-value</i>
DQA1*03:01-DQB1*03:02-DRB1*04:03 - PM ①	0%	0,51%	0,18141	0,4010	0,0162 – 9,9115	0,5766
DQA1*02:01-DQB1*02:01-DRB1*07:01 – PM ②	3,09%	1,53%	0,16109	2,0488	0,4821 – 8,7065	0,3312
DQA1*05:01-DQB1*03:01-DRB1*11:01 – PM ③	0%	0,51%	0,18141	0,4010	0,0162 – 9,9115	0,5766
DQA1*01:02-DQB1*06:02-DRB1*15:01 – PE ①	0%	8,67%	0,00006	0,0316	0,0019 – 0,5290	0,0163
DQA1*02:01-DQB1*03:03-DRB1*07:01 – PE ③	0,62%	1,02%	0,00336	0,6025	0,0541 – 6,7052	0,6802

4.2.4 Distribuição genotípica e alélica do SNP A49G CTLA4 em associação com os haplotipos HLA de risco

A distribuição genotípica e alélica do SNP A49G CTLA4 em associação com os haplotipos HLA de risco para os doentes com DMT1 e a população controlo podem ser consultados nas tabelas 5, 6 e 7, assim como os respetivos valores de OR, IC e significâncias.

Os haplotipos HLA RE^① e RE^④ apresentam diferenças significativas na sua associação com o genótipo AA do SNP A49G CTLA4, embora o primeiro com maior prevalência para a população controlo e o segundo para os doentes com DMT1. Os valores de OR referentes a estes dois casos, embora sem significância, são antagónicos, indiciando que a associação entre o haplotipo HLA RE^① ao genótipo AA possa conferir proteção, enquanto que a associação com o haplotipo HLA RE^④ signifique um aumento do risco de desenvolvimento da doença (tabelas 5 e 6). Os haplotipos HLA RE^③ e RM^① apresentam diferenças próximas da significância ($p=0,085$ e $p=0,073$, respetivamente). Novamente, embora sem significância, os valores de OR deste dois casos são também distintos, sendo a associação do haplotipo RE^③ com o genótipo AA indicativo de um aumento na suscetibilidade ao desenvolvimento de DMT1 (OR=7), contrariamente à associação do haplotipo RM^① que apresenta tendência para se constituir como um fator de proteção (OR=0,14) (tabelas 6 e 7). Já os haplotipos HLA RE^② e RM^② não apresentam quaisquer sinais de diferenças significativas entre doentes e controlos na sua associação com o genótipo AA, situação corroborada com os valores de OR, embora sem significância, muito próximos de 1 (tabelas 5 e 7).

Relativamente à associação entre os haplotipos HLA de risco e o genótipo GG do SNP A49G CTLA4 nenhum apresenta diferenças significativas entre doentes e controlos. No entanto, embora sem significância, os valores de OR nesta associação não apresentam uma tendência comum, sendo que para os haplotipos HLA RE^① e RE^② são inferiores a 1 e para os haplotipos HLA RE^③, RE^④ e RM^② tendem para a indicação de suscetibilidade no desenvolvimento da DMT1. Já para a associação entre o genótipo GG e o haplotipo HLA RM^① não foram encontradas nenhuma amostras positivas, nem em doentes nem em controlos (tabelas 5, 6 e 7).

No que diz respeito à associação do genótipo heterozigótico do SNP A49G CTLA4 aos haplotipos HLA de risco apenas os RE^③ ($p=0,01255$) e RE^④ ($p=0,00317$)

apresentam diferenças significativas entre doentes com DMT1 e controlos, sendo que apenas o segundo possui valor de OR (0,2477) com significância, embora o primeiro também possua um OR (0,037) indicador de proteção (tabela 6). Apesar de não apresentar significância nas diferenças entre doentes e controlos ($p=0,07353$) nem tao pouco no valor de OR ($p=0,268$), a associação entre o haplotipo HLA RM^① e o genótipo AG apresenta um valor de suscetibilidade ao desenvolvimento de DMT1 de 7 (tabela 7). Quanto à associação do haplotipo HLA RM^② com este genótipo a inexistência de diferenças significativas entre doentes e controlos é clara ($p=0,25785$), embora o seu OR, sem significância, tenda para a indicação de proteção (tabela 7).

Relativamente à associação entre os haplotipos HLA de risco e os alelos A e G do SNP A49G CTLA4, não foram encontradas quaisquer diferenças significativas entre a amostra de doentes com DMT1 e a população controlo. No entanto, embora sem significância, os valores de OR tendem a ser inferiores a 1 para a associação dos haplotipos HLA de risco com o alelo A e superiores a esse valor para a associação com o alelo G, sendo as únicas exceções nos casos dos haplotipos HLA RE^③ e RE^④ (tabelas 5, 6 e 7).

Tabela 5. Distribuição genotípica e alélica correspondente ao SNP A49G do gene CTLA4 em associação com os haplotipos de risco elevado DQA1*03:01-DQB1*03:02-DRB1*04:01 e DQA1*03:01-DQB1*03:02-DRB1*04:02, em doentes com DMT1 e casos controlo. Teste χ^2 . DMT1 – Diabetes Mellitus tipo 1; OR – Odds Ratio; IC – Intervalo de Confiança.

Haplotipo DQA1*03:01-DQB1*03:02-DRB1*04:01 - RE ①						
Genótipo / alelo	DMT1 (n=15)	Controlo (n=2)	<i>p-value</i>	OR	IC	<i>p-value</i>
AA	13,3%	50,0%	0,00587	0,1538	0,0066 – 3,5771	0,2436
AG	80,0%	50,0%	0,17361	4,000	0,1900 – 84,2036	0,3725
GG	6,7%	0,0%	0,35197	0,5172	0,0161 – 16,6343	0,7097
A	53,3%	75,0%	0,20611	0,3810	0,0355 – 4,0922	0,4256
G	46,7%	25,0%	0,20611	2,6250	0,2444 – 28,1977	0,4256
Haplotipo DQA1*03:01-DQB1*03:02-DRB1*04:02 - RE ②						
Genótipo / alelo	DMT1 (n=9)	Controlo (n=2)	<i>p-value</i>	OR	IC	<i>p-value</i>
AA	44,4%	50,0%	0,44433	0,8000	0,0372 – 17,1971	0,8866
AG	44,4%	50,0%	0,44433	0,8000	0,0372 – 11,1971	0,8866
GG	11,2%	0,0%	0,62101	0,8824	0,0267 – 29,1480	0,9441
A	66,7%	75,0%	0,37448	0,6667	0,0566 – 7,8524	0,7473
G	33,3%	25,0%	0,37448	1,5000	0,1274 – 17,668	0,7473

Tabela 6. Distribuição genotípica e alélica correspondente ao SNP A49G do gene CTLA4 em associação com os haplotipos de risco elevado DQA1*03:01-DQB1*03:02-DRB1*04:05 e DQA1*05:01-DQB1*02:01-DRB1*03:01, em doentes com DMT1 e casos controlo. Teste χ^2 . DMT1 – Diabetes Mellitus tipo 1; OR – *Odds Ratio*; IC – Intervalo de Confiança.

Haplotipo DQA1*03:01-DQB1*03:02-DRB1*04:05 – RE ③						
Genótipo / alelo	DMT1 (n=4)	Controlo (n=1)	<i>p-value</i>	OR	IC	<i>p-value</i>
AA	75,0%	0,0%	0,08534	7,000	0,1682 – 291-3642	0,3064
AG	0,0%	100,0%	0,01255	0,0370	0,0005 – 2,8232	0,1361
GG	25,00%	0,0%	0,28774	1,2857	0,0309 – 53,5159	0,8949
A	85,7%	50,0%	0,14231	6,000	0,1834 – 196,292	0,3140
G	14,3%	50,0%	0,14231	0,1667	0,0051 – 5,4526	0,3140
Haplotipo DQA1*05:01-DQB1*02:01-DRB1*03:01 – RE ④						
Genótipo / alelo	DMT1 (n=52)	Controlo (n=25)	<i>p-value</i>	OR	IC	<i>p-value</i>
AA	61,5%	40,0%	0,03836	2,4000	0,9044 – 6,3686	0,0787
AG	21,2%	52,0%	0,00317	0,2477	0,0885 – 0,6929	0,0078
GG	17,3%	8,0%	0,13786	2,4070	0,4794 – 12,0862	0,2860
A	72,1%	66,0%	0,22065	1,3323	0,6451 – 2,7517	0,4382
G	27,9%	34,0%	0,22065	0,7506	0,3634 – 1,5502	0,4382

Tabela 7. Distribuição genotípica e alélica correspondente ao SNP A49G do gene CTLA4 em associação com os haplotipos de risco moderado DQA1*04:01-DQB1*04:02-DRB1*08:01 e DQA1*01:01-DQB1*05:01-DRB1*01:01, em doentes com DMT1 e casos controlo. Teste X^2 . DMT1 – Diabetes Mellitus tipo 1; OR – *Odds Ratio*; IC – Intervalo de Confiança.

Haplotipo DQA1*04:01-DQB1*04:02-DRB1*08:01 – RM ①						
Genótipo / alelo	DMT1 (n=3)	Controlo (n=4)	<i>p-value</i>	OR	IC	<i>p-value</i>
AA	0,0%	50,0%	0,07353	0,1429	0,0046 – 4,4696	0,2680
AG	100,0%	50,0%	0,07353	7,000	0,2238 – 218,959	0,2680
GG	0,0%	0,0%	-	-	-	-
A	50,0%	75,0%	0,16602	0,3333	0,0347 – 3,2046	0,3414
G	50,0%	25,0%	0,16602	3,000	0,3120 – 28,8418	0,3414
Haplotipo DQA1*01:01-DQB1*05:01-DRB1*01:01 – RM ②						
Genótipo / alelo	DMT1 (n=10)	Controlo (n=6)	<i>p-value</i>	OR	IC	<i>p-value</i>
AA	30,0%	33,3%	0,44433	0,8571	0,0978 – 7,5099	0,8893
AG	50,0%	66,6%	0,25785	0,5000	0,0611 – 4,0907	0,5180
GG	20,0%	0,0%	0,121	3,8235	0,1553 – 94,1355	0,4119
A	55,0%	66,7%	0,25785	0,6111	0,1379 – 2,7084	0,5168
G	45,0%	33,3%	0,25785	1,6364	0,3692 – 7,2524	0,5168

5. Discussão

Possuindo os fatores genéticos uma influência preponderante no desenvolvimento da diabetes, e sendo esta variável entre diferentes populações e grupos étnicos, apesar de vários polimorfismos já estarem identificados como conferindo suscetibilidade ou proteção ao desenvolvimento da doença, interessa avaliar o comportamento desses mesmos polimorfismos em determinadas populações específicas. Embora alguns destes estudos tenham sido desenvolvidos para a população portuguesa (Lemos *et al.*, 2009), a população madeirense, a qual possui características genéticas específicas, carece de uma abordagem própria.

O desenvolvimento do presente trabalho teve, assim, o objetivo de contribuir para a clarificação da influência na população madeirense de fatores genéticos já anteriormente estudados em outras populações. Um dos primeiros desafios que se colocou neste estudo foi a adaptação das metodologias descritas na bibliografia para a caracterização dos polimorfismos A49G CTLA4 e C1858T PTPN22, uma vez que não haviam antes sido utilizadas no Laboratório de Genética Humana da Universidade da Madeira. Nesse sentido, todo o processo para a amplificação por PCR, digestão enzimática e análise dos perfis para estes polimorfismos revelou uma oportunidade para um domínio mais profundo das técnicas de biologia molecular inerentes por parte do investigador. Esse processo implicou ajustamentos vários não só na fase prévia ao início dos trabalhos de caracterização genética como também ao longo de todo o tempo devido à necessidade de ultrapassar alguns constrangimentos que foram surgindo. Exemplo de alguns dos problemas que exigiram esses ajustamentos para que fossem ultrapassados foram algumas amostras em particular que apresentaram maiores dificuldades na obtenção de produtos de PCR, devido à menor qualidade do DNA. Também a interpretação dos perfis resultantes das digestões enzimáticas obrigou da parte do investigador ao apuramento da sua capacidade de perceção na análise de géis de agarose. Por outro lado, o facto da disponibilização dos recursos, em particular os reagentes, ter-se atrasado por efeito do processo burocrático associado à sua aquisição, originou um início tardio da fase de caracterização genética dos polimorfismos. Esta situação impediu que se tivesse conseguido juntar ao estudo do SNP A49G CTLA4 também o SNP C1858T PTPN22, que apenas foi trabalhado ao nível da aplicação da sua metodologia mas que será incluído na continuação do estudo por parte do LGH-UMa.

Assim, o presente estudo de associação do SNP A49G CTLA4 à DMT1 na população madeirense constitui um contributo para o conhecimento da relação entre os fatores genéticos e o desenvolvimento da doença nesta população em particular que deverá ser continuado noutras condições que permitam o seu aprofundamento. Neste estudo as amostras utilizadas, quer dos doentes quer como referência, foram as disponíveis até ao momento no LGH-UMa, sendo que, no futuro, poderá ser possível reforçar este trabalho com um maior número de amostras à medida que venham a ser diagnosticados novos casos no Serviço de Endocrinologia do Hospital Dr. Nélio Mendonça (Centro Hospitalar do Funchal). Qualquer das formas, a amostra utilizada como referência, além de ser constituída por indivíduos aparentemente saudáveis, revelou estar em Equilíbrio de *Hardy-Weinberg* e, como tal, ser representativa da população, o que a torna adequada para os objetivos do presente estudo.

A caracterização alélica e genotípica do polimorfismo A49G CTLA4 não permitiu confirmar a existência de associação ao desenvolvimento da DMT1, uma vez que as diferenças entre doentes e controlos não foram significativas e os valores de OR apresentaram-se muito próximos de 1. No entanto, ressalva-se que a dimensão da amostra utilizada neste estudo poderá ter dificultado a constatação de alguma influência, ainda que menor, que possa existir na população madeirense, em linha com o já encontrado em diversas populações (Kavvoural e Ioannidis, 2005). Ainda assim, refira-se que este resultado coincide com o obtido para uma população de crianças portuguesas, do território continental, em que a associação do efeito do polimorfismo A49G do gene CTLA4 à suscetibilidade de desenvolvimento da DMT1 também não foi comprovada (Lemos *et al.*, 2009). Refira-se ainda que as frequências alélicas do SNP A49G CTLA4 encontradas para a população madeirense enquadram-se dentro dos limites do amplo intervalo de valores encontrados em diversas populações europeias, posicionando-se nos limites inferiores desse intervalo de prevalência do alelo G e nos limites superiores para o alelo A, situação que pode estar relacionada com a influência genética africana já identificada nesta população (Kavvoural e Ioannidis, 2005) (Spínola *et al.* 2006).

A utilização de dados não publicados, previamente obtidos pelo LGH-UMa, ao nível da caracterização dos genes HLA-DQA1, HLA-DQB1 e HLA-DRB1 permitiram estender o presente trabalho, não apenas pela avaliação da sua associação à DMT1 isoladamente, como também em conjunto com o polimorfismo A49G CTLA4. A análise dos haplotipos HLA identificados em diversos estudos como conferindo risco

para o desenvolvimento da DMT1 (Redondo *et al.*, 2001) permitiu identificar quais os que também o são para a população madeirense. Assim, constata-se que nesta população os haplotipos DQA1*03:01-DQB1*03:02-DRB1*04:01 (RE①), DQA1*03:01-DQB1*03:02-DRB1*04:02 (RE②) e DQA1*05:01-DQB1*02:01-DRB1*03:01 (RE④) confirmam-se como estando fortemente associados ao risco de desenvolvimento da DMT1. Em particular o haplotipo RE① apresenta valores elevados e significativos de OR (9,9), similares aos encontrados em outros estudos (Noble e Erlich, 2012), destacando-se como um fator genético a ter em conta no acompanhamento clínico de crianças de risco, nomeadamente filhos de diabéticos. Embora com uma associação menos forte do que o haplotipo HLA RE①, os RE② e RE④ apresentam valores de OR (5,7 e 3,2, respetivamente) que revelam a sua influência no aumento do risco para o desenvolvimento da doença, afirmando-se também como fatores genéticos de grande importância no acompanhamento clínico no âmbito da população madeirense. Ao contrário do que sucede para estes dois haplotipos HLA na população madeirense, outros estudos apresentam um valor igual de OR para ambos os haplotipos (3,6) (Noble e Erlich, 2012). Apesar da estatística não confirmar a associação entre os haplotipos HLA RE③ e RM② ao risco de desenvolvimento da doença, os valores obtidos na análise ($p=0,058$ e $p=0,078$, respetivamente) indiciam que essa situação pode resultar da amostra utilizada não ser suficientemente grande. Corroborando esta ideia está o facto de os valores de OR para estes dois haplotipos serem, embora sem significância, relativamente elevados (4,9 e 2,1 respetivamente), muito menor do que o encontrado em outras populações para o RE③ (11,37) e maior do que o encontrado anteriormente para o RM② (0,71) (Noble e Erlich, 2012). Por outro lado, como dado não menos importante, o presente estudo exclui o haplotipo HLA RM①, identificado em outras populações como sendo de risco moderado, de estar associado ao desenvolvimento da DMT1 na população madeirense. Ressalva-se no entanto, dado que este haplotipo foi considerado apenas de risco moderado, que alguma associação a existir na população em estudo possa ser revelada com uma ampliação substancial da amostra. Qualquer das formas, numa análise mais abrangente, a distribuição revelada pelo conjunto dos haplotipos HLA considerados de risco para o desenvolvimento deste estudo é indicativa da sua importância para o desenvolvimento da DMT1 na população madeirense uma vez que surgem em 79% dos doentes e em apenas 36% dos controlos ($p=0$).

A análise dos haplotipos HLA identificados em diversos estudos como conferindo proteção contra o desenvolvimento da DMT1 (Redondo *et al.*, 2001) permitiu avaliar a sua reprodutibilidade para a população madeirense. Assim, constata-se também que nesta população os haplotipos DQA1*01:02-DQB1*06:02-DRB1*15:01 (PE^①) e DQA1*02:01-DQB1*03:03-DRB1*07:01 (PE^③) confirmam-se como sendo de proteção elevada. No entanto, apesar de ambos possuírem uma prevalência significativamente mais baixa nos doentes, ao contrário do haplotipo PE^①, que apresenta um valor de OR significativo (OR=0,03, $p=0,016$), em todo igual ao encontrado em outros estudos, o haplotipo PE^③ não obtém significância para o seu valor de OR, não tão baixo quanto o encontrado em outros estudos, o que, mais uma vez, poderá estar dependente da dimensão da amostra (Noble e Erlich, 2012). Aliás, tendo em conta que, como seria de esperar, o número de amostras de doentes possuindo haplotipos HLA protetores é escasso, essa poderá ser a razão para que os restantes haplotipos identificados como reduzindo a suscetibilidade ao desenvolvimento da DMT1 não tenham revelado significância na sua associação à doença na população madeirense. São os casos dos três haplotipos HLA associados a uma proteção moderada (PM^①, PM^② e PM^③), embora o haplotipo HLA PM^② surja, sem significância, com um valor de OR (2,05) que indicaria risco em vez de proteção, em contraste com o valor encontrado noutro estudo (0,32) (Noble e Erlich, 2012). O esclarecimento sobre o papel destes três haplotipos na DMT1 no âmbito da população madeirense requer a extensão do presente estudo para uma amostra com maior dimensão, sendo que, para já, constata-se que para os haplotipos HLA PM^① e PM^③ os valores de OR estão em linha com os encontrados anteriormente (0,27 e 0,18, respetivamente) embora ligeiramente superiores.

Na avaliação da associação entre o SNP A49G CTLA4 e os haplotipos HLA de risco para o desenvolvimento da DMT1 na população da ilha da Madeira os resultados obtidos são, para alguns aspeto, inconclusivos, carecendo de um aprofundamento do estudo para a sua clarificação. A associação entre os haplotipos HLA de risco e os alelos A e G do SNP A49G CTLA4 não revelam, por ausência de significância estatística, suscetibilidade ou proteção ao desenvolvimento de DMT1, embora pelos valores de OR a presença do alelo A tenda a atenuar o fator de risco conferido pelos haplotipos HLA e a presença do alelo G a aumentá-lo. No entanto, esta tendência carece de suporte estatístico e só poderá ser esclarecida através de um aumento substancial da amostra que permita reunir um número suficiente de casos para

cada um dos haplotipos HLA de risco considerados, pois na presente análise esse número foi manifestamente escasso. Apesar destes resultados obtidos para os alelos A e G do SNP CTLA4, a associação entre os seus genótipos (AA, AG e GG) e os haplotipos HLA que conferem suscetibilidade para o desenvolvimento de DMT1 revelaram uma dinâmica ligeiramente diferente. Efetivamente neste caso surgem algumas diferenças significativas entre doentes e controlos, revelando a existência de algumas associações ao desenvolvimento da doença. A situação mais evidente é a associação do haplotipo HLA RE^④ com o genótipo AG como fator de proteção contra o desenvolvimento de DMT1 (OR=0,25), sendo que a análise estatística particularmente sólida neste caso não é independente do facto de ser este haplotipo HLA para o qual há neste estudo um maior número de amostras, substancialmente superior aos restantes casos analisados. O SNP A49G CTLA4 em heterozigotia surge ainda como fator de proteção quando associado ao haplotipo HLA RE^③, apresentando um valor de OR muito baixo (0,037) embora sem significância. Tendo em conta que estes dois haplotipos HLA (RE^④ e RE^③) estão identificados como conferindo risco para o desenvolvimento de DMT1 (Redondo *et al.*, 2001), e mesmo no presente estudo estão fortemente indiciados no mesmo sentido, a associação protetiva com o genótipo AG agora descrita poderá representar um dado importante para uma correta avaliação do risco conferido por estes haplotipos HLA em específico. Por outro lado, esta associação revela mais uma vez que a definição do grau de suscetibilidade inata ao desenvolvimento da DMT1 está dependente de interações génicas, as quais continuam a carecer de estudos que avaliem em conjunto vários fatores genéticos, situação possível apenas com amostragens de grande dimensão. Revelando a complexidade da genética subjacente à DMT1 está o comportamento inverso, embora sem significância estatística, deste mesmo genótipo AG com o haplotipo HLA RM^①, associação que tende a conferir suscetibilidade ao desenvolvimento da doença, com um OR=7.

A associação entre os haplotipos HLA de risco e os genótipos em homozigotia para o SNP A49G CTLA4 (AA e GG) não apresentam neste estudo resultados estatisticamente válidos que confirmam suscetibilidade ou proteção para a DMT1, contrariando os resultados anteriores para a população libanesa onde o genótipo GG, em conjunto com os alelos HLA-DQB1*02:01 e HLA-DQB1*03:02, presentes nos haplotipos RE^④, e RE^① e RE^②, respetivamente, revelou conferir suscetibilidade ao desenvolvimento da doença. (Zalloua *et al.*, 2004). É, no entanto, de salientar que tanto o genótipo AA como o GG tendem a apresentar comportamentos consonantes nas suas

associações com cada um dos haplotipos HLA considerados e que, por outro lado, são diametralmente opostos aos revelados pelas associações com o genótipo heterozigótico (AG). Por exemplo, o haplotipo HLA RE^④, que com o genótipo AG confere proteção contra o desenvolvimento de DMT1, quando em associação com o genótipo AA ou GG tende a ter um efeito de risco, o mesmo sucedendo relativamente ao haplotipo HLA RE^③.

A avaliação das associações entre os alelos e genótipos do SNP A49G CTLA4 e os haplotipos HLA de risco indicia uma influência no desenvolvimento da DMT1 mais associada aos genótipos, em especial em heterozigotia, e menos a cada um dos alelos em particular. No entanto, esta tendência extraída dos resultados obtidos constitui apenas uma base para ser desenvolvida em futuros estudos que continuem esta avaliação da relação entre os haplotipos HLA e o SNP A49G CTLA4. É ainda importante referir que o presente estudo, para além das limitações já referidas relativamente à dimensão da amostra e que se exacerbam quando se analisam em simultâneo, como foi feito, mais do que um fator genético, deixou de fora da análise os haplotipos HLA não referenciados como estando associados à DMT1, e entre os quais se poderão encontrar algumas especificidades relativas ao desenvolvimento da doença na população madeirense. No mesmo sentido, a não utilização das frequências alélicas dos genes HLA na análise aqui desenvolvida impossibilitou a identificação de associações que possam existir a esse nível com os alelos ou genótipos do SNP A49G CTLA4 e que poderiam revelar algo mais sobre a relação destes dois fatores genéticos no desenvolvimento da DMT1. No entanto, como o estudo dos genes HLA no desenvolvimento da DMT1 na população madeirense está a ser desenvolvido pelo LGH-UMa no âmbito de um outro projeto de investigação, não nos foi possível fazer um uso mais abrangente desses dados, sendo que essa análise aqui em falta será efetuada no âmbito do referido projeto.

Em suma, é de salientar que, embora a dimensão da amostra tenha prejudicado para algumas componentes da análise a robustez estatística apresentada, os resultados obtidos, no que à influência isolada do SNP A49G CTLA4 no desenvolvimento da DMT1 diz respeito, vão de encontro a vários estudos anteriores, inclusive referentes a Portugal, em que não foram encontradas associações ao desenvolvimento da doença (Lemos *et al.*, 2009). No entanto, já para a influência combinada entre os haplotipos HLA de risco e os genótipos A49G CTLA4 o presente estudo revela associações claras ao desenvolvimento da DMT1 para alguns polimorfismos em particular,

nomeadamente conferindo proteção, sendo que outros carecem da expansão do número de amostras utilizadas para a sua confirmação. As aparentes discrepâncias entre os resultados apresentados por diferentes estudos poderão ser explicadas tendo em conta a heterogeneidade genética entre as populações estudadas ou ainda pela influência dos fatores ambientais envolvidos na patogénese da DMT1 (Wafai *et al.*, 2011) (Katahira, 2011). Além disso, e como referido por Lemos *et al.* (2009), o SNP A49G do gene CTLA4 pode não ser uma verdadeira variante associada à suscetibilidade para a DMT1, mas sim um marcador em desequilíbrio de ligação com a variante causal, e os achados discrepantes podem refletir forças variáveis de desequilíbrio de ligação em diferentes populações, embora, ainda assim, este tenha sido o polimorfismo CTLA4 mais amplamente analisado para a DMT1 em diversas populações étnicas. Acresce que o gene CTLA4 (IDDM12) fica situado perto de outras regiões que apresentam genes de suscetibilidade à DMT1, pelo que essa proximidade pode explicar a fraqueza ou ausência de associação do gene CTLA4 com a DMT1 em algumas populações, tal como aos diferentes mecanismos que podem levar ao desencadear da doença a que são expostas as diferentes populações (Wafai *et al.*, 2011). O mapeamento genético de variantes causais de genes de suscetibilidade para doenças complexas como o caso da DMT1 permanece complicado, como verificado, pelo que vários aspetos podem ser responsáveis por esta complexidade e estar por detrás do desencadear do processo da doença (Saleh *et al.*, 2013).

6. Conclusão

Apesar de muitos esforços terem sido direcionados para a descoberta da base molecular da doença, em grande parte permanece desconhecida. Ao longo das últimas três décadas o estudo da DMT1 levou à identificação de genes de suscetibilidade ao desenvolvimento desta doença poligénica. Além dos HLAs, que têm sido exaustivamente investigados e que demonstram uma associação que pode representar cerca de 50% da predisposição, vários genes têm sido estudados, como o CTLA4, por presumivelmente também contribuírem para o desenvolvimento de DMT1 (Pugliese, 2010) (Steck e Rewers, 2011) (Katahira, 2011). O efeito do polimorfismo A49G do gene CTLA4 tem sido amplamente estudado na sua relação à predisposição genética e na patogénese para a DMT1. No entanto, muitos resultados têm sido contraditórios entre os vários autores, em particular em estudos para diferentes populações (Nisticò *et al.*, 2000) (Donner *et al.*, 1997) (Pérez *et al.*, 2009) (Rani *et al.*, 2014) (Saleh *et al.*, 2013) (Lemos *et al.*, 2009) (Zalloua, *et al.*, 2004)

O presente estudo não permitiu confirmar a existência de uma associação entre o SNP A49G CTLA4 e o desenvolvimento da DMT1 nas análises efetuadas apenas com este polimorfismo mas revelou a sua influência quando em associação a determinados haplotipos HLA. As associações deste tipo confirmadas neste trabalho e os indícios de que a sua existência possa ser ainda mais abrangente, sublinham a importância dos estudos envolvendo vários marcadores genéticos para a compreensão da sua influência no desenvolvimento de doenças multifatoriais, em particular a DMT1 onde o peso dos fatores genéticos e ambientais, e a sua relação, são ainda, em grande medida, desconhecidos. Nesse sentido, a identificação da influência do genótipo AG na redução do risco conferido pelos haplotipos HLA DQA1*05:01-DQB1*02:01-DRB1*03:01 (RE[Ⓞ]) e DQA1*03:01-DQB1*03:02-DRB1*04:05 (RE[Ⓝ]) para o desenvolvimento da DMT1 na população madeirense é já, embora devendo ser confirmado em novos trabalhos, um contributo relevante dado pelo presente estudo para o acompanhamento clínico de crianças de risco para o desenvolvimento de DMT1. Por outro lado, os indícios deixados pelo presente estudo de que existirão outras associações semelhantes entre este conjunto de genes requerem a continuação desta avaliação com uma amostra de maiores dimensões. Além disso, o estudo do SNP C1858T PTPN22, já abordado metodologicamente no presente trabalho, e em particular a análise da sua associação com os polimorfismos HLA e A49G CTLA4,

constitui um outro passo importante na contribuição para a clarificação das interações génicas subjacentes ao desenvolvimento da DMT1. Nesse sentido, é essencial que o Laboratório de Genética Humana da Universidade da Madeira e o Serviço de Endocrinologia do Hospital Dr. Nélio Mendonça (Centro Hospitalar do Funchal) continuem a reunir novas amostras de doentes diagnosticados com DMT1 de modo a que os estudos a desenvolver possam beneficiar de um maior suporte estatístico.

7. Referências Bibliográficas

- Achenbach, P., Bonifacio, E., Koczwara, K., e Ziegler, A.G. (2005) "Natural History of Type 1 Diabetes", *Diabetes*, **54**(2), 25–31.
- ADJ (2015) “História do Diabetes” Associação de Diabetes Juvenil do Brasil. Última atualização em 15. [Consultado em 14.01.2015] Disponível em <http://www.adj.org.br>.
- Afonso, F. (2014) "Introdução ao SPSS", Unidade Curricular de Seminários II, Mestrado em Biologia Molecular em Saúde, Escola Superior Egas Moniz, Lisboa.
- Ahmed, A. (2002) “History of Diabetes Mellitus”, *Saudi Med J.*, **23**(4):373-8.
- Almeida, R. (2014) “Genética Clínica e Molecular”, Unidade Curricular do Mestrado em Biologia Molecular em Saúde, Escola Superior de Saúde Egas Moniz, Lisboa.
- Alves, C., Meyer, I., Vieira, N., Toralles, M.B.P., e LeMaire, D. (2006) "Distribuição e frequência de alelos e haplotipos HLA em brasileiros com diabetes melito tipo 1", *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*, **50**(3).
- American Diabetes Association (2004) "Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus", *Diabetes Care*, **27**(1), 224-102.
- American Diabetes Association (2014) "Diagnosis and classification of diabetes mellitus", *Diabetes Care*, **37**(1), S81–90.
- Andrade, E. (2013) "Desequilíbrio de ligação e blocos de Haplótipos determinados pela Análise de 250K SNPs em Três", Dissertação de Doutorado em Ciências, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil.
- Andrews, C. (2010) “The Hardy-Weinberg Principle”, *Nature Education Knowledge*, **3**(10):65.
- Andriolo, A., Martins, A.R., Chacra, A. R., Filho, F.F., Oliveira, J.E., e Mendes, M. E. (2004) "A importância da Hemoglobina Glicada (A1c) para a avaliação do controle glicêmico em pacientes com Diabetes Mellitus: Aspectos clínicos e laboratoriais", São Paulo, pp. 1–29.
- Atkinson, M.A. (2012) "The pathogenesis and natural history of type 1 diabetes", *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, **2**:1–18.

Barnett, A.H. (2011) "Diabetes-science, serendipity and common sense", *Diabetic Medicine : A Journal of the British Diabetic Association*, 28:1289–99.

Bedin, M.R. (2013) "Associação dos polimorfismos -318C/T, CT60 e A49G do gene CTLA4, R620W do gene PTPN22 e A946T do gene IFIH1 em pacientes pediátricos com doença autoimune tireoidiana e diabetes mellitus tipo 1", Dissertação de Mestrado em Medicina, Universidade de São Paulo, Brasil.

Borch-Johnsen, K., Joner, G., Mandrup-Poulsen, T., Christy, M., Zachau-Christiansen, B., Kastrup, K., & Nerup, J. (1984) "Relation between breast-feeding and incidence rates of insulin-dependent diabetes mellitus. A hypothesis", *Lancet*, 2(8411):1083-6.

Bottini, N., Musumeci, L., Alonso, A., Rahmouni, S., Nika, K., Rostamkhani, M., Mustelin, T. (2004) "A functional variant of lymphoid tyrosine phosphatase is associated with type I diabetes", *Nature Genetics*, 36(4), 337–338.

Brorsson, C., Hansen, N. T., Bergholdt, R., Brunak, S., e Pociot, F. (2010) "The type 1 diabetes - HLA susceptibility interactome - Identification of HLA genotype-specific disease genes for type 1 diabetes", *PLoS ONE*, 5(3).

Bryan, C. P. (1930) "The Papyrus Ebers", The Papyrus Ebers. The Garden City Press, Londres, RU.

Burn, G. L., Svensson, L., Sanchez-Blanco, C., Saini, M., e Cope, A. P. (2011) "Why is PTPN22 a good candidate susceptibility gene for autoimmune disease?", *FEBS Letters*, 585(23), pp.3689–3698.

Câmara, F.G., e Silva, D.O. (2001) "Estatística Não Paramétrica, Testes de Hipóteses e Medidas de Associação", *Estatística Não Paramétrica*, última atualização em 2001. [Consultado em 03.03.2015]. Disponível em <http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle: Estatística+Não+Paramétrica#1>

Carniello, R. S., Ilva, R. F., e Fiorini, A. (2008) "Descontaminação de resíduos de brometo de etídio gerados em procedimentos de biologia molecular", IV Mostra Interna de Trabalhos de Iniciação Científica do Cesumar. [Consultado em 03.02.2015]. Disponível em [http:// WWW.cesumar.br/prppge/pesquisa/mostras/qua_mostras/Renan_Savieri_Carniello.pdf](http://WWW.cesumar.br/prppge/pesquisa/mostras/qua_mostras/Renan_Savieri_Carniello.pdf)

Carpenter, S., Perez, L., Rigaud, M., Barile, M., Priest, T. J., e Ferguson, J. B. (1998) "An interlinear Transliteration and English Translation of Portions of The Ebers

Papyrus Possibly Having to Do With Diabetes Mellitus", Bard College, Annandale-on-Hudson, Nova Iorque, EUA.

Correia, L. G. (2014) "Relatório anual do Observatório Nacional da Diabetes", pp. 1 – 46.

Court, M. H. (2008) "Tufts University. Court Lab", última atualização em 2012. [Consultado em 01.04.2015]. Disponível em <https://view.officeapps.live.com/op/view.aspx?src=http%3A%2F%2Fwww.tufts.edu%2F~mcourt01%2FDocuments%2FCourt%2520lab%2520%2520HW%2520calculator.xls>

Cox, M.M., Doudna, J.A., e O'Donnell, M. (2011) "Molecular Biology, principles and practice", W. H. Freeman, Nova Iorque, EUA.

Das, A. K., e Shah, S. (2011) "History of diabetes: From ants to analogs", *Journal of Association of Physicians of India*, **59**:6–7.

Direção-Geral da Saúde (DGS) (2008) "Programa Nacional de Prevenção e Controlo da Diabetes", última atualização em 2015. [Consultado em 09.01.2015]. Disponível em <http://www.dgs.pt/programa-nacional-para-a-diabetes.aspx>

Direção-Geral da Saúde (DGS) (2011) "Diagnóstico e Classificação da Diabetes Mellitus", Norma da DGS, pp. 1 – 13.

Donadi, E.A. (2000) "Como entender a nomenclatura e os Mecanismos de Associação entre os Antígenos e os Alelos", *Revista Da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto e do Hospital Das Clínicas da FMRP*, 33:7 – 18.

Donner, H., Rau, H., Walfish, P.G., Braun, J., Siegmund, T., Finke, R., Badenhoop, K. (1997) "CTLA4 alanine-17 confers genetic susceptibility to Graves' disease and to type 1 diabetes mellitus", *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, **82**(1):143–146.

Dorman, J.S., e Bunker, C.H. (2000) "HLA-DQ locus of the human leukocyte antigen complex and type 1 diabetes mellitus: a HuGE review", *Epidemiologic Reviews*, **22**(2), 218–227.

Fernández-Ponce, C., Hernández-Martínez, J. D., e Silvera-Redondo, C. (2006) "Ctla-4, una molécula que inhibe la activación de los linfocitos T", *Salud Uninorte*, **22**(2), 168–181.

- Feudtner, C. (2008) "The Discovery of Insulin", *The New England Journal of Medicine*, **358**(9).
- Garcia, E.S., e Chamas, C.I. (1996) "Genética molecular: avanços e problemas", *Cadernos de Saúde Pública*, **12**(1), 103–107.
- Gattás, G.F., Segre, M., e Filho, V.W. (2002) "Genética, biologia molecular e ética : as relações trabalho e saúde", *Ciência E Saude Coletiva*, **7**(1), 159–167.
- Gillespie, K. M. (2011) "The Genetics of Type 1 Diabetes. Type 1 Diabetes - Pathogenesis, Genetics and Immunotherapy". [Consultado em 03.03.2015]. Publicado online em 25.11.2011, Disponível em <http://www.intechopen.com/books/>: ISBN.
- Giza, S., Goulas, A., Gbandi, E., Effraimidou, S., Papadopoulou-Alataki, E., Eboriadou, M., e Galli-Tsinopoulou, A. (2013) "The role of PTPN22 C1858T gene polymorphism in diabetes mellitus type 1: First evaluation in greek children and adolescents", *BioMed Research International*. v.2013.
- Gross, J.L., Silveiro, S.P., Camargo, J.L., Reichelt, A.J., e Azevedo, M.J. (2002) "Diabetes Melito: Diagnóstico, Classificação e avaliação do controlo glicémico", *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*, **46**(1), 16–26.
- Guelho, D., Paiva, I., e Carvalheiro, M. (2013) "Diabetes mellitus - um <continuum> fisiopatológico", *Revista Portuguesa de Endocrinologia, Diabetes E Metabolismo*, **8**(1), 44–49.
- Guyton, A. C., e Hall, J. E. (2006) "Textbook of Medical Physiology", Elsevier Saunders, Philadelphia, EUA.
- Hora, A. S. (2014) "HLA - A matter of Frequencies between different populations", *Revista Saúde e Desenvolvimento*, 116–137.
- IDF (2014) "IDF Diabetes Atlas", International Diabetes Federation, 6ª edição. Disponível em <http://idf.org/diabetesatlas>
- IMS Health. (2014) "IMS Health Diabetes Mellitus Overview 2014 - Portugal 2014", última atualização em 2014. [Consultado em 02.02.2015]. Disponível em <http://www.imshealth.com/portugal>.
- Instituto de Higiene e Medicina Social Faculdade de Medicina de Coimbra (2009). "Estudo da Prevalência da Diabetes em Portugal", *Diabetes*, pp. 1–54. [Consultado em

09.12.2014]. Disponível em www.min-saude.pt/NR7rdonlyres/219DAD78-CD13-43CE-9221-42744B24176C/0/EstudoprevalenciaDiabetesemPortugal.pdf

Ionescu-Tirgoviste, C. (1996) "Insulin, the molecule of the century", *Arch Physiol Biochem*, **104**(7): 807-13.

Jin, Y., e She, J.-X. (2012) "Novel biomarkers in type 1 diabetes", *The Review of Diabetic Studies*, **9**:224–35.

Karumuthil-Melethil, S., Perez, N., Li, R., Prabhakar, B.S., Holterman, M.J., e Vasu, C. (2010) "Dendritic cell-directed CTLA-4 engagement during pancreatic beta cell antigen presentation delays type 1 diabetes", *The Journal of Immunology*, 184:6695–6708.

Karvonen, M., Viik-Kajander, M., Moltchanova, E., Libman, I., LaPorte, R., e Tuomilehto, J. (2000) "Incidence of childhood type 1 diabetes worldwide", *Diabetes Care*, **23**(10), 1516–1526.

Katahira, M. (2011) "Relationship of Type 1 Diabetes with Human Leukocyte Antigen (HLA) Class II Antigens Except for DR3 and DR4", *InTech*. Disponível na publicação online de 25.11.2011, em www.intechopen.com.

Kavvoural, F.K., e Ioannidis, J.P. (2005) "CTLA4 Gene Polymorphisms and Susceptibility to Type 1 Diabetes Mellitus: A Huge Review and Meta-Analysis", *AM J Epidemiol*, 162:3-16.

Kumar, V. A. (2004). "Robbins and Cotran pathologic basis of disease", 7ª edição. Elsevier Saunders, Philadelphia, EUA.

Larsen, J. L. (2004) "Pancreas Transplantation: Indications and consequences", *Endocr Rev.*, **25**(6): 919-46.

Lee, K.M., Chuang, E., Griffin, M., Khattri, R., Hong, D.K., Zhang, W., Bluestone, J. A. (1998) "Molecular basis of T cell inactivation by CTLA-4", *Science*, 282:2263–2266.

Lemos, M.C., Coutinho, E., Gomes, L., Bastos, M., Fagulha, A., Barros, L., Carvalheiro, M. (2009) "The CTLA4 +49 A/G polymorphism is not associated with susceptibility to type 1 diabetes mellitus in the Portuguese population", *International Journal of Immunogenetics*, 36:193–195.

- Li, G., Shi, F., Liu, J., e Li, Y. (2014) "The effect of CTLA-4 A49G polymorphism on rheumatoid arthritis risk: a meta-analysis", *Diagnostic Pathology*, **9**(157).
- Ma, R. C. e Chan, J. C. (2009) "Incidence of Childhood Type 1 Diabetes: a Worrying Trend", *Nat Rev Endocrinol*. [Consultado em 02.03.15]. Disponível em Medscape.
- Marsh, S. (2015) "HLA Alleles", WHO Nomenclature Committee for fatores of HLA System, última atualização em 14.01.2015. [Consultado em 08.03.2015]. Disponível em <http://hla.alleles.org/>
- Mayfield, J. (1998) "Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus: New Criteria", *American Family Physician*, **58**(6): 1355-1362.
- McCulloch, D. K. (2014). Clinical presentation and diagnosis of diabetes mellitus in adults. [Consultado em 28.10.2015]. Disponível no repositório www.uptodate.com
- Mimbacas, A., e Javiel, G. (2010) "Diabetes Type 1 and 2: What is Behind a Classification?", *InTech*, 287 – 304. Disponível na publicação *online* de 21.11.2011, em www.intechopen.com.
- NEWCO (2013) "História", NEWCO, última atualização em 2013. [Consultado em 11.03.2015]. Disponível em <http://www.newco.pro/pt/historia-madeira>.
- Nisticò, L., Cascino, I., e Buzzetti, R. (2000) "CTLA-4 in Type 1 Diabetes Mellitus", *Madame Curie Bioscience Database (Internet)* [Consultado em 09.04.2015]. Disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK5997/?report=reader>.
- Noble, J.A., e Erlich, H.A. (2012) "Genetics of type 1 diabetes", *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, **2**:1–15.
- Oliveira, M.; Regitano, L.; Roesse, A.; Anthonisen, D.; Parma, M.; Scagliusi, S.; Timoteo, W.; Belicuas, S. (2007) "Fundamentos teórico-práticos e protocolos de extração e amplificação de DNA por meio de técnica de reação em cadeia da polimerase". Empresa brasileira de pesquisa agropecuária, última atualização em 2008. [Consultado em 15.11.2013]. Disponível em <http://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/handle/doc/48295>
- Pace, A.E., Foss, M.C., Donadi, E.A., Fernandes, A.M., e Zanetti, M.L. (2005) "Fatores imunogenéticos associados ao Diabetes Mellitus do tipo 1", *Revista Latino-Americana de Enfermagem*, **13**(5), 743–749.

- Paiva, C. (2001) "Novos critérios de diagnóstico e classificação da diabetes mellitus", *Medicina Interna*, **7**(4), 234–238.
- Pérez, F., Codner, E., Angel, B., Balic, I., & Carrasco, E. (2009) "Polimorfismo + 49 A / G del gen del Asociación con el perfil de anticuerpos y citoquinas", *Rev Méd Chile*, **137**:321 – 328.
- Polonsky, K. S. (2012) "The past 200 years in diabetes", *The New England Journal of Medicine*, **367**(14), 1332–40.
- Portal Diabetes (sd) Portal Diabetes, última atualização em 2014. [Consultado em 17.11.2014]. Disponível em <http://www.portaldiabetes.com.br/diabetes/tratamento/>
- PubMed (2014) "Polymerase Chain Reaction", NCBI, última atualização em 2014. [Consultado em 12.12.2013]. Disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/probe/doc/TechPCR.shtml>.
- Pugliese, A. (2010) "Pathogenesis of type 1 diabetes: genetics", *International Diabetes Monitor*, **22**(3), 101–111.
- Purohit, S., e She, J.X. (2008) "Biomarkers for type 1 diabetes", *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*, **1**:98–116.
- Rani, R., Israni, N., Kumar, A., Vasudevan, S., e Singh, J. (2014) "Association of Protein Tyrosine Phosphatase Non-receptor, Type 22 (PTPN22) C1858T Polymorphism with Type 1 Diabetes in North India : A Replication Study", *J Diabetes Metab*, **5**(3), 1–6.
- Redondo, M., Fain, P., & Eisenbarth, G. (2001) "Genetics of type 1A diabetes", *Recent Prog Horm Res*, **56**:69-89.
- Regateiro, F. (2003) "Manual de Genética Médica", 1ª edição, Imprensa da Universidade de Coimbra, Coimbra.
- Roep, B. O., & Peakman, M. (2010) "The main immune components involved in the multi-step process that leads to beta-cell destruction in type 1 diabetes", *Nature Reviews Immunology*, **10**:145-152.
- Rumel, D. (1986) "'Odds Ratio': Algumas Considerações", *Rev Saúde Pública*, **20**(3), 253–258.

- Salas, F., Santos, J.L., e Pérez, F. (2013) "Genética de la Diabetes mellitus tipo 1", *Revista Chilena de Endocrinología Y Diabetes*, **6**(1), 15–22.
- Saldanha, N., Spínola, C., Santos, M., Simões, J., Bruges-Armas, J., Brehm, A., e Spínola, H. (2009) "HLA polymorphisms in Forros and Angolares from São Tomé Island (West Africa): Evidence for the Population Origin", *Journal of Genetic Genealogy*, **5**(2), 76–85.
- Saleh, H.M., Koeleman, B., Szénási, G., Rosivall, L., e Hamar, P. (2013) "Diabetes e Metabolism Association of CTLA-4 Polymorphisms with Type 1 Diabetes in the Egyptian Population", *J. Diabetes Metab*, **4**(7).
- Santiago, J. L., Martínez, A., de la Calle, H., Fernández-Arquero, M., Figueredo, M. A., de la Concha, E. G., e Urcelay, E. (2007) "Susceptibility to type 1 diabetes conferred by the PTPN22 C1858T polymorphism in the Spanish population", *BMC Medical Genetics*, 8:54.
- Secretaria Regional dos Assuntos Sociais da Região Autónoma da Madeira (2003). "Plano Regional de Saúde". [Consultado em 08.03.2015]. Disponível em pns.dgs.pt/files/2010/02/PRSM MADEIRA.pdf
- Sedgwick, P., e Marston, L. (2010) "Odds ratios", *British Medical Journal*, 341:407.
- Seino, Y., Nanjo, K., Tajima, N., Kadowaki, T., Kashiwagi, A., Araki, E., Ueki, K. (2010) "Report of the Committee on the classification and diagnostic criteria of diabetes mellitus: The Committee of the Japan Diabetes Society on the diagnostic criteria of diabetes mellitus", *Diabetology International*, 1:2–20.
- Sesterheim, P., Saitovitch, D., e Staub, H.L. (2007) "Type 1 diabetes mellitus: multifactors that confer susceptibility to the autoimmune pathogenesis", *Scientia Medica*, **17**(4):212–217.
- Silva, J. L. (2007) "Gentes do Arquipélago da Madeira: origem geográfica", última atualização em 2007. [Consultado em 11.03.2015]. Disponível em <http://madeira-gentes-lugares.blogspot.pt/2007/10/gentes-do-arquipelago-origens.html>
- Silva, M.R. da, Mory, D, e Davini, E. (2008) "Marcadores Genéticos e Auto-Imunes do Diabetes Melito Tipo 1: da Teoria para a Prática", *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*, **52**(2), 166–180.

- Simoni, R., Hill, R., e Vaughan, M. (2002) "The discovery of insulin: the work of Frederick Banting and Charles Best", *Journal of Biological Chemistry*, **277**(26), 1–3.
- Spínola, H. (2005) "Diversidade Genética do Sistema HLA em Portugal, Cabo Verde e Guiné-Bissau", Dissertação de Doutoramento em Ciências Biológicas, especialidade de Citogenética e Biologia Molecular, Universidade da Madeira, Funchal.
- Spínola, H., Bruges-Armas, J., Middleton, D., e Brehm, A. (2005) "HLA polymorphisms in Cabo Verde and Guiné-Bissau inferred from sequence-based typing" *Human Immunology*, **66**:1082–1092.
- Steck, A. K., Pugliese, A., & Eisenbarth, G. S. (2010) "Type 1 Diabetes Mellitus of Man: Genetic susceptibility and Resistance", última atualização em 2010. [Consultado em 16.11.2014]. Disponível em <http://som.ucdenver.edu/bdc/book-Type1Diabetes/Chapter7/Chapter7.htm>
- Steck, A.K., e Rewers, M.J. (2011) "Genetics of type 1 diabetes", *Clinical Chemistry*, **57**(2), 176–85.
- Terwilliger, J.D., e Weiss, K.M. (1998) "Linkage disequilibrium mapping of complex disease: fantasy or reality?", *Current Opinion in Biotechnology*, **9**:578–594.
- Todd, J. A., Bell, J. I., & Devitt, H. O. (1987) "HLA-DQ beta gene contributes to susceptibility and resistance to insulin-dependent diabetes mellitus", *Nature*, **329**(6140):599-604.
- University of Pennsylvania (2009) "African Genetics Study Revealing Origins, Migration and "Startling Diversity" of African Peoples", última atualização em 2015. [Consultado em 11.03.2015]. Disponível em www.sciencedaily.com/releases/2009/04/090430144524.htm
- Vieira, A. (2003) "História e autonomia da Madeira", Madeira-edu, última atualização em 2015. [Consultado em 11.03.2015]. Disponível em <http://www.madeira-edu.pt/Portals/31/CEHA/bdigital/avieira/2003-av-manualhistoria.pdf>
- Vieira, A. (2010) "Minorias Étnicas na Madeira, Escravos e Libertos", última atualização 2015. [Consultado em 11.03.2015]. Disponível http://www.academia.edu/7867839/minorias_etnicas-Madeira-_escravos_e_libertos.
- Vincze, T., Posfai, J., e Roberts, R. J. (2003) "NEBcutter: a program to cleave DNA with restriction enzymes", *Nucleic Acids Res.*, **31**:3688-3691.

- Wafai, R.J., Chmaisse, H., Makki, R.F., e Fakhoury, H. (2011) "Association of HLA Class II Alleles and CTLA-4 Polymorphism with Type 1 Diabetes", *Saudi Journal of Kidney Diseases and Transplantation*, **27**(2), 36–48.
- Wagner, D. (2011) "Type 1 Diabetes. Pathogenesis, genetics and immunotherapy", *InTech*, Denver, EUA.
- Waldrigues, C.N. (1981) "O sistema HLA", *Semina*, **8**(2):pp.219–225.
- Wang, Y., Shaked, I., Stanford, S., Zhou, W., Curtsinger, J., Mikulski, Z., Peterson, E. (2013) "The Autoimmunity-Associated Gene PTPN22 Potentiates Toll-like Receptor-Driven, Type 1 Interferon-Dependent Immunity", *Immunity*, **39**(1), 111–122.
- Whiting, D.R., Guariguata, L., Weil, C., e Shaw, J. (2011) "IDF Diabetes Atlas: Global estimates of the prevalence of diabetes for 2011 and 2030", *Diabetes Research and Clinical Practice*, **94**(3), 311–321.
- Wisse, B. (2014) "Type 1 Diabetes", Medline Plus, última atualização em 2015. [Consultado em 14.08.2014]. Disponível em <http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/diabetestype1.html>
- World Health Organization (WHO) (1999) "Definition, Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus and its Complications Part 1 : Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus", Department of Noncommunicable Disease Surveillance, Geneva, pp. 1–33.
- World Health Organization (WHO) (2014) "Diabetes - Fact sheet", última atualização em 2015. [Consultado em 16.01.2015]. Disponível em <http://www.who.int/media/centre/factsheets/fs312/en>
- Zalloua, P. A., Abchee, A., Shbaklo, H., Zreik, T. G., Terwedow, H., Halaby, G., e Azar, S. T. (2004) "Patients with early onset of type 1 diabetes have significantly higher GG genotype at position 49 of the CTLA4 gene", *Hum. Immun.*, **65**:719-724.
- Zheng, W., e She, J.X. (2005) "Genetic Association Between a Lymphoid Tyrosine Phosphatase (PTPN22) and Type 1 Diabetes", *Diabetes*, **54**:906–908.
- Zhernakova, A., Eerligh, P., Wijmenga, C., Barrera, P., Roep, B.O., e Koeleman, B. C. (2005) "Differential association of the PTPN22 coding variant with autoimmune diseases in a Dutch population", *Genes and Immunity*, **6**:459–461.

Zikherman, J., & Weiss, A. (2009) "Antigen receptor signaling in the rheumatic diseases", *Arthritis Research & Therapy*, 11:202.

8. Anexos

Anexo 1. Protocolo de extração de DNA genómico de amostras de saliva

1. Incubar as amostras contidas no *kit*, ainda no contentor da colheita, a 50°C em banho-maria por duas horas, de forma a garantir que o DNA separa-se e que as nucleases são permanentemente inativadas;
2. Transferir 500 µl da mistura (amostra de saliva + preservante *Oragene*) para um *eppendorf* de 1,5 mL;
3. Adicionar 20 µl de *Oragene Purifier* e agitar no vórtex durante alguns segundos;
4. Incubar os tubos em gelo por 10 minutos;
5. Centrifugar, a temperatura ambiente, a 13000 rpm durante 15 minutos;
6. Cuidadosamente transferir o sobrenadante, com uma pipeta, para um novo *eppendorf*, descartando o pellet;
7. Adicionar 500 µl de etanol a 100%, a temperatura ambiente. Agitar cuidadosamente, invertendo 10 vezes;
8. Deixar a amostra repousar a temperatura ambiente por 10 minutos, de forma a permitir que o DNA precipite na totalidade;
9. Centrifugar, a temperatura ambiente, a 13000 rpm por 2 minutos, tendo atenção à orientação do tubo;
10. Cuidadosamente remover o sobrenadante com uma pipeta, descartando-o na totalidade, tendo atenção em não tocar no *pellet* de DNA;
11. Adicionar 100 µl de TE 1mM para dissolver o *pellet*. Agitar no vórtex por 5 segundos;
12. Incubar a temperatura ambiente durante 1-2 dias para garantir a hidratação total do DNA;
13. Preservar as alíquotas correspondentes às amostras a 4°C (durante um período máximo de 2 meses), ou a -20°C por um período mais longo.

Anexo 2. Protocolo *Salting out* de extração de DNA genómico de amostras de sangue periférico

1. Colocar 500 µl de sangue (já com coagulante EDTA (ácido etilenodiaminotetracético)) num tubo de 1,5 mL e adicionar 500 µl de água;
2. Centrifugar a 13000 rpm durante 5 minutos e eliminar o sobrenadante (plasma) com uma pipeta de 1 mL;
3. Juntar 1 mL de RCLB – Triton (a -20°C) e agitar no vórtex;
4. Repetir o passo 3 até que o sobrenadante a eliminar fique limpo;
5. Juntar 1 mL de água destilada para lavar os eritrócitos e de seguida congelar os tubos a -80°C, durante 2 horas;
6. Congelar os tubos em água, centrifugar a 13000 rpm durante 3 minutos e eliminar o sobrenadante;
7. Adicionar ao pellet 244 µl de água destilada, 80 µl de tampão proteinase K, 40 µl de SDS a 10% e 10 µl de proteinase K (50 mg/mL) e agitar no vórtex;
8. Incubar a 56°C durante 30 minutos, agitando no vórtex 2-3 vezes durante a incubação;
9. Adicionar 120 µl de NaCl 6M, agitar vigorosamente no vórtex e colocar em gelo durante 10 minutos, voltando a agitar no vórtex até ficar com um aspeto leitoso;
10. Centrifugar durante 5 minutos a 13000 rpm e transferir o sobrenadante para um novo tubo de 1,5 mL;
11. Adicionar 1 mL de etanol absolutos a -20°C, homogeneizar por inversão, agitar no vórtex e centrifugar a 8000 rpm durante 3 minutos;
12. Descartar por completo mas cuidadosamente o etanol do tubo, tendo o cuidado de preservar a ocorrência de DNA nas paredes do mesmo. Deixar secar possíveis resíduos de etanol;
13. Ressuspender o DNA em 150 µl de água destilada;
14. Preservar as alíquotas correspondentes às amostras a -20°C.

Anexo 3. Sequências de *primers* utilizados para amplificação da região alvo

Primers utilizados para amplificação de uma região correspondente a 162pb, localizada no codão 17 do exão 1, do gene CTLA4, localizado no cromossoma 2:

		<i>Temperatura de melting</i>	<i>Conteúdo G/C</i>
<i>Primer forward</i>	5'-GCTCTACTTCCTGAAGACCT-3'	57,3°C	50%
<i>Primer reverse</i>	5'-AGTCTCACTCACCTTTGCAG-3'	57,3°C	50%

Primers utilizados para amplificação de uma região correspondente a 218pb, localizada no codão 620 do exão 14, do gene PTPN22, localizado no cromossoma 1:

		<i>Temperatura de melting</i>	<i>Conteúdo G/C</i>
<i>Primer forward</i>	5'-ACTGATAATGTTGCTTCAACGG-3'	56,5°C	40,9%
<i>Primer reverse</i>	5'-TCACCAGCTTCCTCAACCAC-3'	59,4°C	55%

Quando adquiridos todos os *primers* encontravam-se liofilizados, restituindo-os com diferentes volumes de água destilada ultrapura (sem a presença de DNases e RNases, da GIBCO®), indicados pelo fabricante.

Ambos os *primers* são comercializados a 100pmol/μl, pela *Eurofins Genomics*, e diluídos para uma concentração de 10x. De tal foram diluíram-se 10 μl de cada *primer* em 90 μl de água destilada ultrapura (GIBCO®).

Anexo 4. Protocolos de preparação dos reagentes utilizados para extração de DNA e controlo de eficácia de reação

- RCLB – Triton (*Red Cell Lysis Buffer*) – 100 mL

2,4 mL Tris-HCL 0,5 M, pH=7.5	12 mL
1 mL Triton X 100	5 mL
20 mL 25 mM MgCl₂	100 mL
32 mL de sacarose 1M	160 mL

Perfazer com água destilada até 100 mL de solução. Conservada a -20°C.

- Tris-HCL 0,5 M, pH=7.5 – 500 ML:

Pesar 30,275g Tris-base e perfazer com água destilada até 500 mL. Posteriormente acertar o pH recorrendo à utilização de HCl diluído.

- Sacarose 1 M – 100 mL

Pesar 34,23g de sacarose e perfazer com água destilada até 100 mL.

- NaCl 1M – 100 mL

Pesar 5,844g NaCl e perfazer com água destilada até 100 mL de solução.

- Tampão Proteínase K – 100 mL

37,5 mL NaCl 1M;

Adicionar 24 mL de EDTA 0,3 M pH=8,0;

Perfazer com água destilada até 100 mL de solução.

- EDTA 0,5 M pH=8,0 – 100 mL

Pesar 18,61g de EDTA e perfazer com água destilada até 100 mL de solução, acertando posteriormente o pH da solução com NaOH.

- SDS 10% - 20 mL

Pesar 2g de SDS e perfazer com água destilada até 20 mL de solução.

- Proteínase K 50 mg/mL – 1 mL

Pesar 50mg de proteínase K e perfazer com água destilada até 1 mL de solução.

- Vermelho de Cresol

Pesar 24g de sacarose;

Pesar 0,0152g de Vermelho de Cresol (AppliChem);

Perfazer ambos com água destilada até 40 mL.

- TAE 50x (Tris-acetate-EDTA)

Pesar 242g Tris-acetato e dissolver em 750 mL de água destilada;

Adicionar 57 mL de ácido acético glacial e 0,5 M de EDTA (pH 8.0);

Perfazer com água deslitada para uma solução de 1 L.

- TAE 1x

Preparado a partir da diluição de 40 mL de TAE 50x em 1960 mL de água destilada.

- Gel de agarose a 3%

Pesar 5g de agarose (Seakem);

Adicionar 100mL de tampão TBE 1x;

Colocar no microondas até a agarose estar completamente dissolvida;
Deixar arrefecer um pouco e posteriormente adicionar 7µl de brometo de etídeo
(Fisher Scientific);
Colocar a solução num molde com 1 pente correspondente a 20 poços e deixar
arrefecer até ocorrer a solidificação do gel.

➤ *GeneRuler™ 50pb DNA Ladder* (figura 15):

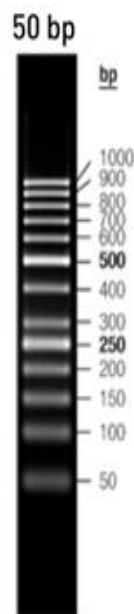


Figura 15. GeneRuler 50pb
DNA Ladder

Anexo 5. Tabela de resultados da caracterização das amostras de doentes com DMT1:

Amostra	Genótipo	Amostra	Genótipo	Amostra	Genótipo	Amostra	Genótipo
DMT1.1	AG	DMT1.24	AA	DMT1.47	AG	DMT1.70	AG
DMT1.2	AG	DMT1.25	GG	DMT1.48	AG	DMT1.71	AA
DMT1.3	AA	DMT1.26	GG	DMT1.49	AA	DMT1.72	AA
DMT1.4	AG	DMT1.27	AG	DMT1.50	AA	DMT1.73	AA
DMT1.5	GG	DMT1.28	AA	DMT1.51	AA	DMT1.74	AG
DMT1.6	GG	DMT1.29	AA	DMT1.52	AA	DMT1.75	AG
DMT1.7	GG	DMT1.30	AG	DMT1.53	AG	DMT1.76	AA
DMT1.8	AG	DMT1.31	AG	DMT1.54	AG	DMT1.77	AA
DMT1.9	AG	DMT1.32	GG	DMT1.55	AA	DMT1.78	GG
DMT1.10	AA	DMT1.33	AG	DMT1.56	AG	DMT1.79	AG
DMT1.11	AA	DMT1.34	AA	DMT1.57	AG	DMT1.80	AG
DMT1.12	AA	DMT1.35	AG	DMT1.58	AA	DMT1.81	AG
DMT1.13	AG	DMT1.36	AA	DMT1.59	AG		
DMT1.14	AG	DMT1.37	AG	DMT1.60	AA		
DMT1.15	AA	DMT1.38	AG	DMT1.61	AG		
DMT1.16	AA	DMT1.39	AG	DMT1.62	AG		
DMT1.17	AG	DMT1.40	AA	DMT1.63	AG		
DMT1.18	GG	DMT1.41	AA	DMT1.64	GG		
DMT1.19	AA	DMT1.42	AG	DMT1.65	AG		
DMT1.20	AA	DMT1.43	AA	DMT1.66	AG		
DMT1.21	AA	DMT1.44	AA	DMT1.67	AA		
DMT1.22	GG	DMT1.45	AG	DMT1.68	AA		
DMT1.23	AG	DMT1.46	AA	DMT1.69	AA		

Anexo 6. Tabela correspondente aos resultados da caracterização das amostras dos casos controlo:

Amostra	Genótipo	Amostra	Genótipo	Amostra	Genótipo	Amostra	Genótipo	Amostra	Genótipo
1	AG	24	GG	47	AG	70	AG	93	AA
2	AA	25	AA	48	AA	71	AA	94	AA
3	AG	26	AA	49	AA	72	AA	95	AG
4	AA	27	AG	50	AA	73	AA	96	AA
5	AA	28	GG	51	AG	74	AG	97	AA
6	AA	29	AA	52	AG	75	AG	98	AG
7	AG	30	AA	53	GG	76	AA		
8	AA	31	AG	54	AG	77	AA		
9	AA	32	AA	55	AG	78	GG		
10	AG	33	AG	56	AA	79	AG		
11	AG	34	AG	57	GG	80	AG		
12	AG	35	AG	58	AA	81	AG		
13	AA	36	AG	59	AG	82	GG		
14	AG	37	AG	60	AA	83	AG		
15	AA	38	AG	61	GG	84	AG		
16	AG	39	AA	62	GG	85	AA		
17	AA	40	AG	63	AG	86	AG		
18	AA	41	AA	64	AA	87	AA		
19	AA	42	AA	65	AA	88	AG		
20	AG	43	AA	66	AG	89	AG		
21	AG	44	GG	67	AA	90	AG		
22	AA	45	AG	68	AG	91	AG		
23	AG	46	AG	69	GG	92	AG		