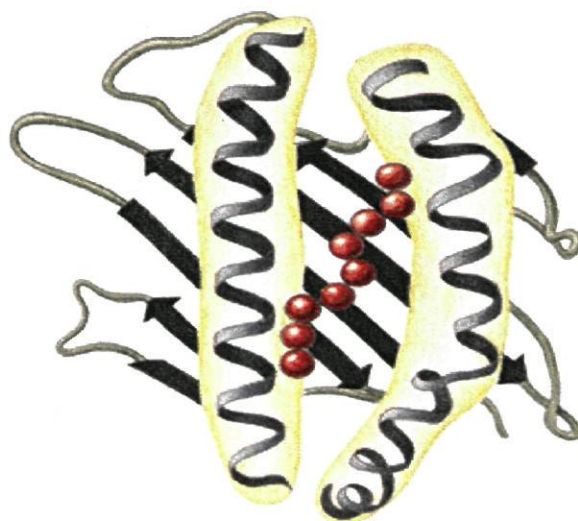




UNIVERSIDADE DO PORTO

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS DE ABEL SALAZAR

**ESTUDOS GENÉTICOS : HLA E TNFRII
NA PATOLOGIA DO SONO (NARCOLEPSIA E
HIPERSÓNIA IDIOPÁTICA)**



CÉLIA MARISA MOREIRA BESSA

LICENCIADA EM BIOLOGIA

ORIENTADORA: Prof.^a Dr.^a Maria Berta de Jesus Duarte da Silva

**PORTO
DEZEMBRO 2001**



UNIVERSIDADE DO PORTO

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS DE ABEL SALAZAR

**ESTUDOS GENÉTICOS : HLA E TNFRII
NA PATOLOGIA DO SONO (NARCOLEPSIA E
HIPERSÓNIA IDIOPÁTICA)**



CÉLIA MARISA MOREIRA BESSA

LICENCIADA EM BIOLOGIA

ORIENTADORA: Prof.^a Dr.^a Maria Berta de Jesus Duarte da Silva

**PORTO
DEZEMBRO 2001**

DISSERTAÇÃO PARA A
OBTENÇÃO DO GRAU DE
MESTRE (MESTRADO EM
MEDICINA LEGAL)

RESUMO

A narcolepsia é uma alteração do sono caracterizada por sonolência diurna excessiva, fragmentação do sono e sintomas de REM anormal (alucinações hipnagógicas, paralisias de sono e cataplexia). Pode começar em qualquer idade e manter-se pela vida fora. Atinge ambos os sexos e manifesta-se em todas as etnias.

A hipersónia idiopática difere da narcolepsia por uma maior duração do sono e uma sonolência mais ou menos permanente ao longo do dia. É mais rara que a narcolepsia e mantém-se durante toda a vida, embora possa melhorar com o tempo.

As patologias de sono, especificamente a narcolepsia, parece resultar da combinação de factores genéticos e ambientais. Assim, esta patologia tem sido associada a antígenos HLA classe II (DQ e DR). O haplótipo HLA-DRB1*1501-DQA1*0102-DQB1*0602 foi identificado em quase todos os doentes japoneses e 70% de caucasianos e afro-americanos. Actualmente, o alelo de susceptibilidade HLA-DQB1*0602 tem sido considerado melhor marcador para a narcolepsia com cataplexia do que o HLA-DRB1*1501.

A perda de hipocretina nos neurónios do hipótalamo, observada em narcolépticos, parece ser o resultado da destruição dessas células por um processo autoimune.

Recentemente, um estudo japonês sugere que o TNFR2 está associado com a susceptibilidade para a narcolepsia, dado o envolvimento deste factor nas patologias de foro autoimune.

Com este trabalho pretendeu-se identificar os alelos HLA Classe II-DQA1, DQB1 e DRB1 em pacientes, do Norte de Portugal, com narcolepsia (com e sem cataplexia) (NC e N), hipersónia idiopática (HIP) e outras patologias de sono (OPS). Outro objectivo foi a análise do polimorfismo de tamanho de fragmentos de restrição no gene TNFR2, em indivíduos com narcolepsia (NC e N) e hipersónia idiopática (HIP). As frequências fenotípicas e genotípicas foram contadas e comparadas com as de uma população controlo (Pop. Controlo).

Este trabalho permitiu observar que o haplótipo HLA-DRB1*1501-DQA1*0102-DQB1*0602 estava representado em 65,2% de indivíduos do grupo N total e 68,4% do grupo NC vs. 12,6% Pop. Controlo. Os alelos HLA-DQB1*0301 e

HLA-DRB1*03 foram os mais representativos no grupo HIP.

Observou-se ainda, um aumento do genótipo M/R nos doentes narcolépticos.

Deste estudo conclui-se que o haplótipo HLA-DRB1*1501-DQA1*0102-DQB1*0602 é importante para a distinção clínica entre NC e HIP. O aumento da frequência do genótipo M/R nos narcolépticos sugere uma possível associação deste genótipo à narcolepsia e não às outras patologias de sono.

RÉSUMÉ

La narcolepsie est une alteration du sommeil, caractérisée par une excessive somnolence diurne, fragmentation du sommeil et par des symptômes REM anormales (hallucinations hypnagogiques, paralysies du sommeil et cataplexie). Cette maladie peut se manifester sur tous les groupes ethniques et rester pour toute la vie. Elle se manifeste aussi sur toutes les ethnies et sur les deux sexes.

L'hypersomnie idiopathique se distingue de la narcolepsie, parce que sur la première il y a un période de sommeil plus long et une somnolence diurne qui peut être permanente. L'hypersomnie idiopathique est moins fréquente et réside pour toute la vie.

Les alterations du sommeil, surtout la narcolepsie, sont le résultat d'une combinaison de facteurs génétiques et environnementales. Cette maladie a été associée avec les locus HLA-DR et HLA-DQ de la classe II.

L'haplotype HLA-DRB1*1501-DQA1*0102-DQB1*0602 a été identifié chez presque tous les patients japonais et chez 70% des patients caucasiens et afro-américains. Aujourd'hui, l'allèle de susceptibilité HLA-DQB1*0602 est considéré un meilleur marqueur pour la narcolepsie avec cataplexie que l'allèle HLA-DRB1*1501.

La perte d'hipocrétine dans les neurones de l'hypothalamus, observée chez les narcoleptiques, résulte de la destruction de ces cellules par un processus auto-immune.

Récemment, une étude japonaise a suggéré que le gène TNFR2 est associé avec la susceptibilité à la narcolepsie, parce qu'on le trouve associé à beaucoup de pathologies auto-immunes.

Avec ce travail, on a voulu identifier les allèles HLA -DQA1-DQB1-DRB1 de la classe II chez des patients du nord de Portugal avec narcolepsie (avec et sans cataplexie) (NC et N), avec hypersomnie idiopathique (HIP) et d'autres pathologies du sommeil (OPS). Un autre objectif de ce travail a été l'analyse du polymorphisme de longueur des fragments de restriction du gène TNFR2, chez des patients avec narcolepsie et hypersomnie idiopathique. Les fréquences phénotypiques et génotypiques ont été déterminées et comparées avec celles d'une population de référence.

Ce travail nous a permis d'observer que l'haplotype HLA-DRB1*1501-DQA1*0102-DQB1*0602 est présent chez 65,2% des patients avec narcolepsie (avec et sans cataplexie) et chez 68,4% des patients avec narcolepsie /cataplexie vs. 12,6% de la

population de référence. Les allèles HLA DQB1*0301 et HLA-DRB1*03 ont été plus représentatifs dans le groupe HIP.

On a aussi observé une augmentation de la fréquence du génotype M/R chez des patients avec narcolepsie.

Avec ce travail, on a conclu que l'haplotype HLA-DRB1*1501-DQA1*0102-DQB1*0602 est important pour distinguer cliniquement la narcolepsie avec cataplexie des autres pathologies du sommeil. L'augmentation de la fréquence du génotype M/R sur les patients narcoleptiques suggère une association possible de ce génotype avec la narcolepsie et pas aux autres pathologies du sommeil.

SUMMARY

Narcolepsy is a sleep disorder characterized by excessive daytime sleepiness, sleep fragmentation and symptoms of abnormal REM sleep (hypnagogic hallucinations, sleep paralysis and cataplexy). This disease may appear at any age and continue to manifest through life. It's observed in both sexes and in all races.

Idiopathic hypersomnia is distinguished from narcolepsy by the longest duration of sleep and daytime sleepiness, more or less permanent. It is less frequent than narcolepsy and it stays for life.

Sleep disorders, specially narcolepsy, seem to result from combination of genetic and environmental factors. It has been associated with class II HLA-DR and DQ.

The HLA-DRB1*1501-DQA1*0102-DQB1*0602 haplotype was identified in almost every japanese patients and in 70% of caucasians and african-americans. Presently, the susceptibility allele HLA-DQB1*0602 is considered a best marker for narcolepsy-cataplexy than the HLA-DRB1*1501 allele.

The loss of hypocretin containing neurons in the hypothalamus, observed in narcoleptics, seems to be the result of cells destruction by an autoimmune process.

Recently, a japanese report suggest that TNFR2 is associated with narcolepsy susceptibility, since it is involved in autoimmune diseases.

With this study we intended to identify class II HLA-DQA1-DQB1-DRB1 alleles in patients of the north of Portugal with narcolepsy (with and without cataplexy) (NC and N), idiopathic hypersomnia (HIP) and other sleep disorders (OPS). The other objective of this study was the restriction fragment-length polymorphism analysis of TNFR2 gene, in patients with narcolepsy (NC and N) and idiopathic hypersomnia (HIP). The phenotypic and genotypic frequencies were determined and compared with those of a control population.

This study has allowed us to observe that HLA-DRB1*1501-DQA1*0102-DQB1*0602 haplotype was present in 65,2% of patients with narcolepsy (with and without cataplexy) and in 68,4% of narcoleptic-cataplectic patients vs. 12,6% in the control population. The HLA-DQB1*0301 and HLA-DRB1*03 alleles were the most representative in the HIP group. We still have observed an increase in the frequency of the M/R genotype in narcoleptic patients.

We have concluded from this study that the HLA-DRB1*1501-DQA1*0102-DQB1*0602 haplotype is important in the clinical distinction between NC and HIP. The increase in the frequency of M/R genotype in narcoleptic patients suggests a possible association of this genotype with narcolepsy, and not with other sleep disorders.

AGRADECIMENTOS

Para a realização deste trabalho, foi indispensável a colaboração de várias pessoas que, de diferentes formas contribuíram para a sua execução.

Em primeiro lugar desejo agradecer à Prof. Doutora Berta Martins, pela oportunidade que me deu para realizar este trabalho, pela disponibilidade demonstrada para a orientação desta tese, por todo auxílio, atenção e tempo dispensados durante a realização do estágio.

Ao Dr. António Martins do Serviço de Neurofisiologia, do Hospital Geral de Santo António, pelo fornecimento das amostras biológicas necessárias para o trabalho e pela disponibilidade, apoio e interesse sempre demonstrados para a elaboração da parte clínica deste projecto. Gostaria também de prestar os meus agradecimentos à Dra. Ana Martins, ao Dr. João Lopes, Dra. Helena Rodrigues e a todos aqueles que fazem parte da equipa do Serviço de Neurofisiologia e que me ajudaram.

Ao Prof. Doutor Pinto da Costa por todo o apoio e interesse facultados com o presente projecto, pelo espírito de abertura e entusiasmo sempre comunicado, manifesto os meus francos agradecimentos.

À Dra. Dalila Pinto e Dra. Clara Pereira, pelo apoio facultado, quer a nível de tarefas práticas, quer pelos conhecimentos e experiência fornecidos.

À Dra. Joana Cerqueira, Dra. Sónia Paupério, D. Sara e D. Elisa, com as quais tive a oportunidade de conviver na execução da parte prática deste estudo, quero agradecer a ajuda prestada.

Quero também agradecer ao Dr. Rui Claro, pelo auxílio fornecido, a nível informático, na execução do relatório.

Desejaria agradecer de forma especial ao meu colega e amigo, Dr. Rui Oliveira, pela sua pronta e entusiasta colaboração, pela disponibilidade e atenção sempre facultados durante a execução do trabalho, tanto a nível laboratorial, como na elaboração do relatório final. Mais importante que tudo, gostaria de agradecer a força transmitida em todos os momentos, o entusiasmo, a paciência e principalmente o companheirismo e a amizade a toda a hora demonstrados.

Um agradecimento também muito especial a toda a minha família, principalmente aos meus pais, avós e irmã, pela força e apoio que me deram, sem os quais não teria sido possível a realização deste trabalho.

Finalmente, uma última palavra de reconhecimento a todos os que, directa ou indirectamente, tornaram possível a concretização do presente estudo.

ÍNDICE

I-INTRODUÇÃO

1.1. Narcolepsia: síntese histórica	1
1.2. O sono e a narcolepsia	1
1.3. Narcolepsia: definição, caracterização e evolução	2
1.3.1. Definição	2
1.3.2. Caracterização	2
1.3.3. Evolução	4
1.4. Epidemiologia da narcolepsia	5
1.5. Hipersónia idiopática: definição, evolução e epidemiologia	5
1.5.1. Definição	5
1.5.2. Evolução	6
1.5.3. Epidemiologia	6
1.6. O sistema HLA e a patologia do sono	6
1.6.1. Definição, organização e função do HLA	6
1.6.2. O HLA e a narcolepsia / hipersónia idiopática	12
1.7. O sistema hipocretina / orexina	14
1.7.1. O que são as hipocretinas?	14
1.7.2. Onde se localizam?	14
1.7.3. Quais os efeitos celulares das hipocretinas?	15
1.7.4. O papel do sistema hipocretina/orexina na patofisiologia da narcolepsia	15
1.8. Associação do TNF-α e TNFRII com a narcolepsia humana	16
1.9 As consequências da narcolepsia	17
1.9.1. A nível sócio-profissional	17
1.9.2. Na condução de veículos	18
1.10. Modalidades de tratamento para a narcolepsia	18
1.11. O tratamento da hipersónia idiopática	20

II-OBJECTIVOS	22
III-MATERIAL E MÉTODOS	
<u>Material</u>	
3.1. População estudada	23
3.2. Amostras biológicas recolhidas	23
<u>Métodos</u>	
3.3. Caracterização clínica	24
3.4. Estudos genéticos	31
3.4.1. Extracção de DNA – Método clássico: “Salting Out”	31
3.4.2. Tipagem genética HLA classe II–DQA1, DQB1 e DRB1	32
3.4.2.1. Amplificação dos alelos dos <i>loci</i> HLA classe II- DQA1, DQB1 e DRB1 por PCR-SSP	32
3.4.2.2. Electroforese em gel de agarose	36
3.4.3. Tipagem do polimorfismo de tamanho de fragmentos de restrição no exão 6 do gene TNFR2 pela técnica de PCR-RFLP com enzima de restrição <i>Nla III</i>	37
3.4.3.1. Amplificação do DNA genómico pela técnica PCR-RFLP	37
3.4.3.2. Electroforese em gel de agarose a 1,5%	38
3.4.3.3. Digestão enzimática com <i>Nla III</i> e electroforese em gel de agarose a 4%	39
3.5. Análise estatística	39
IV-RESULTADOS E DISCUSSÃO	
4.1. Tipagem genética HLA classe II (DQA1, DQB1 e DRB1)	45
4.1.1. Exemplos da tipagem genética HLA classe II	45
4.1.1.1. <i>Locus</i> HLA-DQA1	45
4.1.1.2. <i>Locus</i> HLA-DQB1	47
4.1.1.2.1. Exemplo de tipagem genética HLA-DQB1*06 de alta resolução (subtipos HLA-DQB*06)	48
4.1.1.3. <i>Locus</i> HLA-DRB1	49
4.1.2. Frequências fenotípicas obtidas para cada <i>locus</i> HLA	50

4.1.2.1. <i>Locus</i> HLA-DQA1	50
4.1.2.1.1. Comparação da frequência fenotípica dos alelos do <i>locus</i> HLA-DQA1 entre doentes e população controlo	51
4.1.2.1.2. Comparação da frequência fenotípica dos alelos do <i>locus</i> HLA-DQA1 entre os vários grupos de doentes	52
4.1.2.2. <i>Locus</i> HLA-DQB1	54
4.1.2.2.1. Comparação da frequência fenotípica dos alelos do <i>locus</i> HLA-DQB1 entre doentes e população controlo	56
4.1.2.2.2. Comparação da frequência fenotípica dos alelos do <i>locus</i> HLA-DQB1 entre os vários grupos de doentes	57
4.1.2.3. <i>Locus</i> HLA-DRB1	58
4.1.2.3.1. Comparação da frequência fenotípica dos alelos do <i>locus</i> HLA-DRB1 entre doentes e população controlo	60
4.1.2.3.2. Comparação da frequência fenotípica dos alelos do <i>locus</i> HLA-DRB1 entre os vários grupos de doentes	61
4.1.2.4. Análise do haplótipo HLA-DR1501*-DQA1*0102-DQB1*0602	62
4.2. Análise do polimorfismo de tamanho de fragmentos de restrição no exão do gene TNFR2 pela técnica de PCR-RFLP com enzima de restrição <i>Nla III</i>	64
4.2.1. Análise dos resultados	65
4.2.1.1. Frequências fenotípicas	66
4.2.1.2. Frequências genotípicas	67
V- CONCLUSÕES	69
VI- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	71
VII- ANEXOS	78

I. INTRODUÇÃO

1.1. Narcolepsia: síntese histórica

A Narcolepsia foi descrita pela primeira vez em 1877, por C. Westphal, um neurologista alemão, que publicou a observação de um indivíduo que sofria de ataques de sono súbito e episódios de inibição motora e da linguagem. J. Gélineau, médico parisiense, descreve em 1880, a história de um comerciante de barris de vinho de trinta e seis anos, que adormecia involuntariamente durante o dia e apresentava quedas associadas com as emoções. Gélineau atribui a essa patologia o nome de “Narcolepsia” (que em grego é “semelhante a sono”), ainda conhecida por alguns como doença de Gélineau, e às quedas a denominação de “astasias”. Mais tarde, em 1916, Henneberg designa essas quedas por “cataplexia”. Em 1957, Yoss et Daly descrevem a “Tétrada Narcoléptica”, que se caracteriza por cataplexia, sonolência diurna excessiva, paralisias do sono e alucinações hipnagógicas. Três anos mais tarde, em 1960, demonstrou-se que os doentes narcolépticos adormecem em sono REM (“rapid eye movement”), enquanto os indivíduos normais adormecem em sono não-REM. As investigações prosseguem e descobre-se que os cães apresentavam uma doença semelhante ou próxima da narcolepsia humana. Finalmente, em 1983, Honda refere a associação dos antigénios HLA DR2 e DQ1 à narcolepsia^{1,2}.

Actualmente, a narcolepsia é uma entidade independente e de causa desconhecida, embora, no passado, tenha sido associada à epilepsia ou considerada uma patologia do foro psiquiátrico¹.

1.2. O sono e a narcolepsia

A narcolepsia está associada a uma interrupção dos mecanismos fisiológicos de controlo do sono³. O sono é um processo cíclico, vital para a restauração e equilíbrio fisiológico⁴. As suas duas fases: a fase REM (“rapid eye movement”) e a fase Não-REM têm características biológicas (hormonais e de actividade cerebral) distintas⁴. No período REM a actividade cerebral é intensa, o EEG é desincronizado, registando-se

nesse período grande actividade onírica (de sonhos), sem componente motora, dado que há uma atonia muscular completa, a partir dos músculos do mento ⁴. Na segunda fase a actividade electroencefalográfica é sincronizada, há relaxamento muscular parcial e os sonhos são menos frequentes ⁴. Ambas as fases são indispensáveis para a sobrevivência, sendo a privação total do sono e da fase REM letal nos animais de experiência ⁴. O adormecer ou ficar acordado, é regulado por processos homeostáticos e circadianos ⁴. Estes últimos, parecem ser primariamente gerados nos núcleos supraquiasmáticos do hipotálamo ⁴. Em individuos normais, o repouso nocturno inicia-se com a fase Não-REM, seguindo-se cerca de noventa minutos mais tarde a fase REM ³. Nos recém-nascidos de termo, o sono REM é o mais abundante, manifesta-se, frequentemente com agitação e pode ser o período pelo qual se inicia o sono ³. Fora de contextos fisiológicos e de uma escala normal de sono, o ciclo REM não é encontrado no inicio do sono dos adultos. No entanto, os individuos narcolépticos entram directamente na fase REM ³.

1.3. Narcolepsia: definição, caracterização e evolução

1.3.1. Definição

A narcolepsia é uma das doenças do sono, que afecta especificamente a produção e a organização do sono ⁴. Pode começar em qualquer idade e manter-se pela vida fora. A sintomatologia aparece em geral, na 1ª ou 2ª décadas de vida podendo, no entanto, surgir mais tarde ⁵. Atinge ambos os sexos e manifesta-se em todas as etnias ⁵. A sua causa é ainda desconhecida, no entanto, pensa-se que a combinação de factores ambientais e genéticos possam estar na origem desta doença nos humanos ⁶. A narcolepsia tem sido descrita também em cavalos, cães e gatos ⁵.

1.3.2. Caracterização

A doença caracteriza-se por sonolência diurna excessiva, fragmentação do sono e sintomas de sono REM anormal, como alucinações hipnagógicas, paralisias do sono e cataplexia ⁴. A cataplexia e a sonolência diurna excessiva são os sintomas principais da

doença, enquanto as alucinações hipnagógicas e as paralisias do sono são secundários^{1,2}. Outras perturbações como sonilóquia (falar durante o sono), apneias (colapso da faringe durante o sono, causando paragem dos movimentos respiratórios) e movimentos periódicos das pernas podem, por vezes, também ocorrer¹.

A cataplexia é a perda súbita do tónus muscular gerado por emoções fortes repentinas (riso ou tristeza)⁵. Esta perda do tónus muscular pode ser parcial, se afectar apenas alguns músculos, como os da nuca, levando à queda da cabeça para a frente, ou os da face, causando dificuldade em falar. Pode ser completa com flexão acentuada dos joelhos e queda progressiva^{1,2}. Os ataques catapléticos, duram em geral apenas alguns segundos, podendo nalguns casos prolongar-se por minutos⁵. A frequência dos ataques varia consoante os indivíduos, podendo ir de alguns ao longo da vida do paciente, até vários por dia^{1,2}. Durante estes ataques, a percepção interna é mantida, ao contrário do que ocorre nos ataques de sono⁵. A cataplexia surge em 70% dos indivíduos. Dados estatísticos revelam que 30% dos narcolépticos não têm cataplexia no início da doença e que 10 a 15% nunca chegarão a apresentá-la¹.

A sonolência diurna excessiva é quotidiana, mas não permanente^{1,2}. Manifesta-se por ataques de sono irresistíveis e comportamentos automáticos^{1,2}. Nos primeiros, o sono surge brusca e directamente numa fase REM, quando o indivíduo se encontra em actividade. O doente adormece repentinamente e acorda da mesma forma¹. Estes ataques de sono repetem-se diversas vezes ao dia, sucessivamente, e normalmente às mesmas horas em cada pessoa^{1,2}. A sonolência pode também ser responsável por automatismos, isto é, a actividade não é verdadeiramente interrompida quando o sono surge, mas continua a ser realizada de um modo automático e inadequado¹. São exemplos disso: as palavras fora de contexto, e a arrumação de objectos em lugares impróprios^{1,2}. A sonolência, mais que a cataplexia é o sintoma mais penoso na maioria dos narcolépticos⁵. Eles sentem ao longo da vida, aquilo que nós sentimos se passarmos 24 horas acordados⁵. Estes indivíduos acordam refrescados após uma sesta, mas em breve voltam a adormecer⁵. A sonolência diurna excessiva surge em 100% dos indivíduos, mas só em 80% dos casos é acompanhada de automatismos¹.

Nas paralisias do sono o indivíduo fica incapaz de mover a cabeça, os membros, de respirar normalmente, ou seja, fica paralisado, mas o seu cérebro está consciente^{1,2,7,8}. Estas paralisias, que podem durar alguns minutos, surgem durante o sono ou ao acordar e estão quase sempre associadas às alucinações hipnagógicas^{1,2,7,8}. Os

pacientes revelam uma sensação de luta interior para pôr fim e estes episódios ⁷. As paralisias atingem 25% dos indivíduos narcolépticos ¹.

As alucinações designam-se por hipnagógicas se aparecem ao adormecer ou hipnopômicas, quando surgem ao acordar ^{1,2,7,8}. Estas alucinações são normalmente auditivas, mas podem também ser visuais e vestibulares ^{2,7,8}. Elas são desagradáveis e perturbadoras provocando medo de dormir (ou ao acordar) ¹. O indivíduo tem a impressão de estar um personagem ameaçador, animal ou pessoa, no seu quarto ^{1,2,7}. As alucinações hipnagógicas aparecem em 30% dos casos ¹.

A ordem de aparecimento dos diversos sintomas varia consoante os indivíduos, mas na maior parte dos casos o primeiro sintoma a surgir é a sonolência anormal, sozinha ou acompanhada de cataplexia ². A “tetrada narcoléptica” aparece, apenas, em 20 a 30% dos doentes ¹.

1.3.3. Evolução

A narcolepsia é uma doença neurológica, crónica e debilitante ⁹. Consoante o seu grau de gravidade, ela pode ser mais ou menos incapacitante ². Alguns doentes dominam bem a sua sonolência, outros, pelo contrário, têm repercussões a nível pessoal, familiar e profissional ².

A evolução geral da doença é bastante difícil de sistematizar ². Normalmente, diz-se que ela tem tendência a melhorar após os setenta anos ¹. Esta melhoria relativa deve-se principalmente à reforma, que leva a uma mudança na vida do doente, tornando a sua sonolência diurna excessiva mais suportável ¹. É de salientar também o facto dos indivíduos reduzirem as suas actividades sociais e pessoais a partir dessa idade ². Assim, a sonolência diurna excessiva apesar de melhorar, mantêm-se durante toda a vida e a cataplexia pode desaparecer espontaneamente ou após o doente ter aprendido a controlar as suas emoções ². O sono de má qualidade mantêm-se enquanto as paralisias de sono e as alucinações hipnagógicas são transitórias ².

A narcolepsia permanece estável durante muitos anos na maioria dos indivíduos, noutros melhora e em casos menos frequentes piora ².

1.4. Epidemiologia da narcolepsia

A prevalência da doença (número de doentes por cada 100.000 habitantes) ainda não se encontra bem definida ². Estudos epidemiológicos mostram a prevalência de 0,02-0,18% de narcolépticos-catapléticos na Europa, Japão e EUA ^{10,11}. No entanto, a prevalência da narcolepsia sem cataplexia é desconhecida ¹⁰. Em França, estudos estimam que existam cerca de 15.000 a 40.000 narcolépticos ². A narcolepsia afecta mais homens do que mulheres (por exemplo, num estudo realizado por Roth, dos 360 narcolépticos, 68% eram homens e 32 % mulheres) ¹². Num trabalho realizado pela Unidade de Distúrbios do Sono e da Vigília do Centro Hospitalar de Montpellier, a sua idade de inicio é variável, desde a primeira infância até os cinquenta anos, com maior frequência entre os dez e os vinte ². No entanto, o período decorrente entre o aparecimento dos primeiros sintomas e o diagnóstico da doença (em média cerca de catorze anos após o seu inicio), mostra que a narcolepsia é ainda mal conhecida pelos médicos, sendo frequentes diagnósticos errados ².

1.5. Hipersónia idiopática: definição, evolução e epidemiologia

Por vezes é difícil distinguir, dado existir uma sobreposição clínica, entre narcolepsia sem cataplexia e outras patologias do sono, como por exemplo a hipersónia idiopática ⁸. Esta doença foi descrita recentemente em 1976, por Roth, em Praga ¹³.

1.5.1. Definição

A hipersónia idiopática é uma patologia de causa ainda desconhecida, daí o nome de hipersónia idiopática ¹. Esta difere da narcolepsia por uma maior duração do sono e uma sonolência mais ou menos permanente ao longo do dia ⁷. Ao contrário dos narcolépticos, em que um sono ligeiro (sesta) é restaurador, nesta doença a sesta não é revitalizante ⁷. Por outro lado, os sintomas secundários da narcolepsia não existem na hipersónia ¹.

1.5.2. Evolução

A evolução da doença é crónica, mantém-se durante toda a vida, embora possa melhorar com o tempo. A sua influência na vida profissional e privada do indivíduo é a mesma que para a narcolepsia ¹.

1.5.3. Epidemiologia

A hipersónia é mais rara que a narcolepsia, a sua incidência é de 0,010 a 0,015% (6.000 a 9.000 doentes em França) ¹.

1.6. O sistema HLA e a patologia do sono

1.6.1. Definição, organização e função do HLA

O Complexo Major de Histocompatibilidade (CMH), denominado no homem HLA (“Human Leukocyte Antigen”) é um conjunto de genes que codificam moléculas implicadas na apresentação de péptidos a linfócitos T ¹⁴. Este complexo situado no braço curto do cromossoma 6, ocupa um segmento de DNA com cerca de 3500 kb e está organizado em três classes: classe I (HLA-A, HLA-B, HLA-C); classe II (HLA-DP, HLA-DQ, HLA-DR) e classe III (genes do sistema complemento (C2, C4B, C4A, Factor B) e TNF) ¹⁴. Existem ainda, neste complexo, outras moléculas importantes na regulação da resposta imune (HSP-70, LT e LTβ) ¹⁴ (figura I-1). Actualmente um total de 224 genes estão identificados nesta região, 40% dos quais têm funções imunes ¹⁵.

As moléculas da classe I são compostas por uma glicoproteína transmembranar de 44KD, denominada de cadeia α ou cadeia pesada, que se encontra em ligação não covalente com um polipéptido não polimórfico de 12 KD (cadeia β ou β_2 microglobulina – cadeia leve), codificado no cromossoma 15. As moléculas HLA da classe II contêm duas cadeias polipeptídicas associadas não covalentemente: a cadeia α (32 a 34 KD) e a cadeia β (29 a 32 KD) ¹⁴.

Os principais genes HLA-classe I são aqueles que codificam para a cadeia pesada (α) de 6 isoformas classe I: HLA-A, -B, -C, -D, -E, -F e -G¹⁶. Para além destes, existem também os pseudogenes HLA-H, -J, -K e -L que por não serem expressos, não são funcionais¹⁶. O polimorfismo antigénico das moléculas HLA-A, -B, e -C deve-se a diferenças na sequência de aminoácidos da cadeia pesada da classe I¹⁶. Os genes da cadeia pesada (HLA-A, -B e -C) são extremamente polimórficos, enquanto os genes cadeia pesada HLA-E e -G têm um polimorfismo limitado, chamado oligomorfismo¹⁶. Actualmente, apenas um alelo para o *locus* HLA-F é reconhecido e o gene é considerado monomórfico¹⁶. Para o *locus* HLA-A estão descritos 235 alelos, para o *locus* B 477 e 123 para o *locus* C¹⁷. Os antigénios são designados pela sigla do *locus* onde se localizam os genes que os codificam, em função de um nº de ordem¹⁶. As moléculas codificadas pelo *locus* C são designadas Cw (CW1, CW2...CW10), para não se confundirem com as do complemento “C”¹⁶.

Na classe II do HLA existem os genes HLA-DM, -DO, -DP, -DQ e -DR. Para o HLA-DR a cadeia α é monomórfica e todos os polimorfismos derivam dos genes cadeia β . Para o DP e DQ ambas as cadeias contribuem para o polimorfismo e os genes correspondentes são altamente polimórficos¹⁶. Por outro lado, há um pequeno polimorfismo para o DM e DO¹⁶. Os genes que codificam para a cadeia α são designados como A (ex: DMA, DQA) e os genes que codificam para a cadeia β são designados como B (ex: DMB, DQB)¹⁶. Os genes que codificam as cadeias α e β do HLA-DQ são HLA-DQA1 e HLA-DQB1, respectivamente¹⁶. Para o *locus* HLA-DQA1 estão descritos 22 alelos e para o DQB1 47 alelos¹⁷. Há também um pseudogene HLA-DQA, denominado HLA-DQA2 e dois pseudogenes HLA-DQB: o HLA-DQB2 e o HLA-DQB3¹⁶. Os genes que codificam cadeias α e β do HLA-DP são HLA-DPA1 e HLA-DPB1, respectivamente¹⁶. Existe um pseudogene HLA-DPA, o qual é denominado HLA-DPA2 e um pseudogene HLA-DPB, que é o HLA-DPB2¹⁶.

A parte da região HLA classe II que codifica as moléculas HLA-DR é a mais complicada¹⁶. Os genes da família DR compreendem um gene DRA que codifica a cadeia DR α , que é constante (não polimórfica) e pelo menos 4 genes DRB (DRB1-4), que codificam cadeias DR β , que contêm sítios polimórficos¹⁶. Os diferentes arranjos dos genes cadeia β são chamados haplótipos DRB¹⁶. Em ambas as extremidades da sub-região DR estão genes que são comuns a todos os haplótipos: na extremidade 5' está o gene HLA-DRB1 cadeia β , na 3' o gene HLA-DRA cadeia α ¹⁶. Próximo do

HLA-DRA há um pseudogene HLA-DRB, denominado DRB9¹⁶. Entre os genes HLA-DRB1 e HLA-DRB9, existem genes adicionais HLA-DRB¹⁶. HLA-DRB3, B4 e B5 são genes expressos enquanto DRB2, B6, B7, B8 e B9 são pseudogenes¹⁶. Os antígenos DRB51, 52 e 53 são derivados dos produtos dos genes DRB5, B3 e B4, respectivamente¹⁶. O mais polimórfico dos genes HLA classe II é HLA-DRB1, para o qual são conhecidos 293 alelos¹⁷.

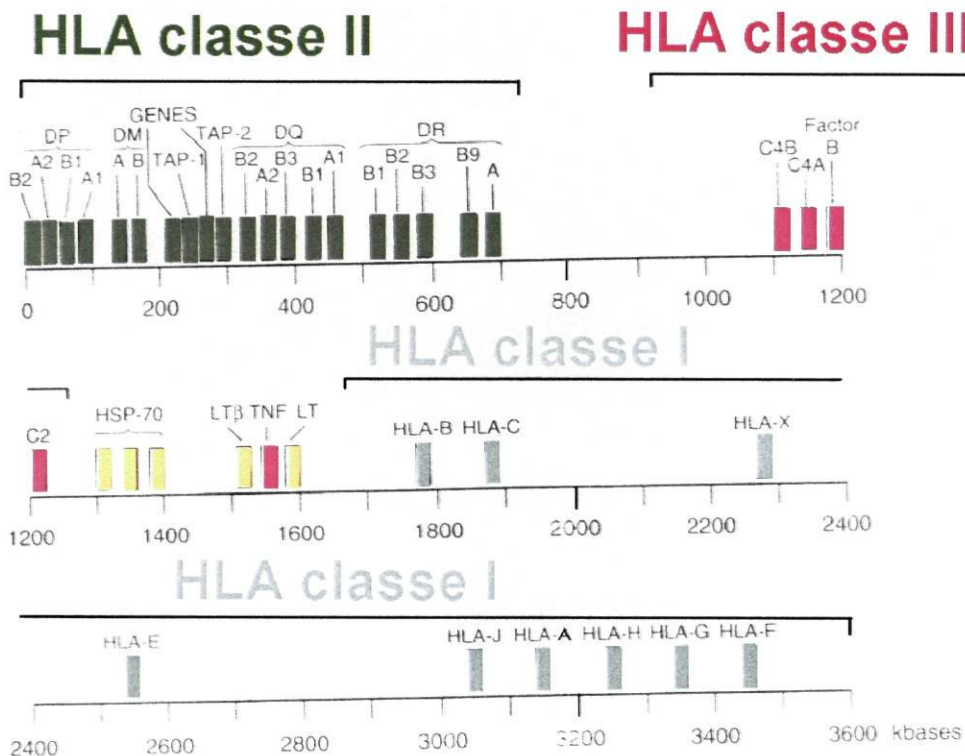


Figura I-1. Mapa genómico do HLA humano onde se podem observar as três principais regiões que o constituem. A azul os genes HLA classe I, a verde os genes HLA classe II e a rosa os genes HLA classe III. A amarelo estão representadas outras moléculas que existem ainda neste complexo. Adaptado de : (14).

Como já foi referido, as moléculas HLA são extremamente polimórficas, sendo as da classe I ubíquias em quase todas as células nucleadas do organismo, enquanto as moléculas da classe II apresentam uma expressão mais restrita (células dendríticas, células endoteliais, linfócitos B, macrófagos)¹⁴.

A estrutura tridimensional da molécula HLA classe I e II é idêntica e pode dividir-se em 4 domínios: domínio extracelular de ligação do péptido; domínio extracelular “imunoglobulin-like”; domínio transmembranar e o domínio citoplasmático (figura I-2). No primeiro domínio, existe a região que permite a ligação ao péptido, que nas moléculas classe I é formada pelos segmentos α_1 e α_2 da cadeia pesada. Nas moléculas HLA classe II a região análoga é formada pelos segmentos α_1 e β_1 das duas cadeias ¹⁴ (figura I-2 e I-3).

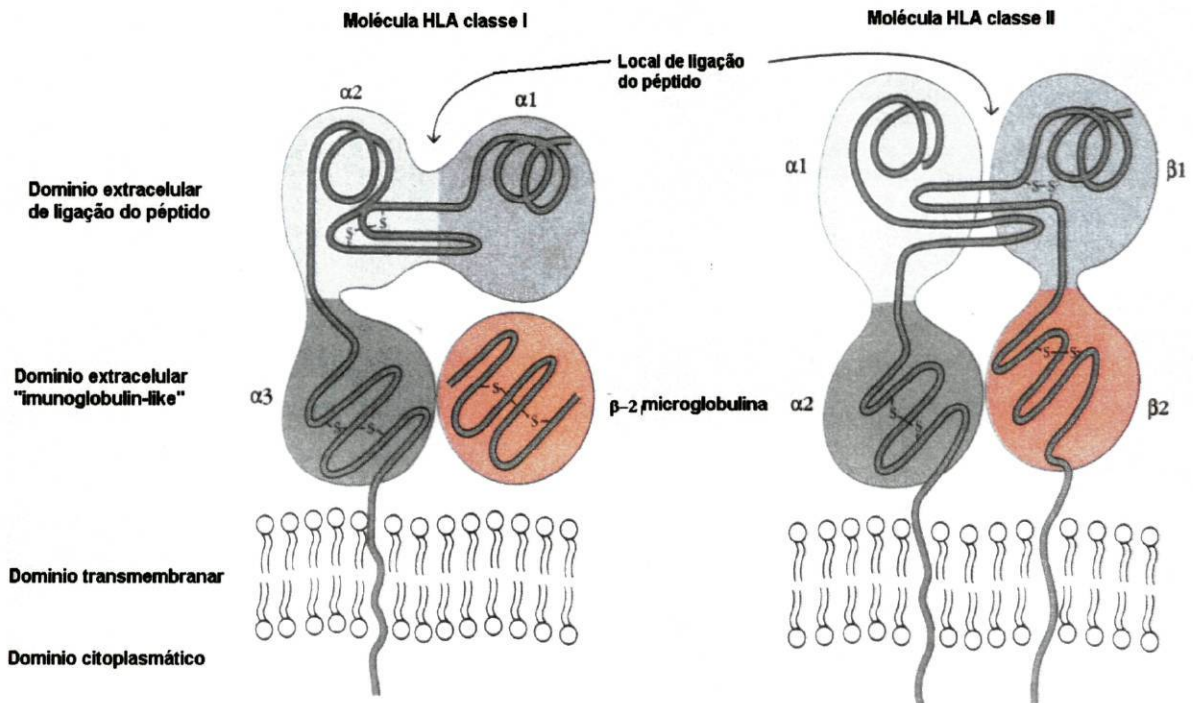


Figura I-2. Esquema ilustrativo da estrutura das moléculas HLA classe I e II, mostrando os domínios extracelulares, o domínio transmembranar e o domínio citoplasmático. Adaptado de: (18).

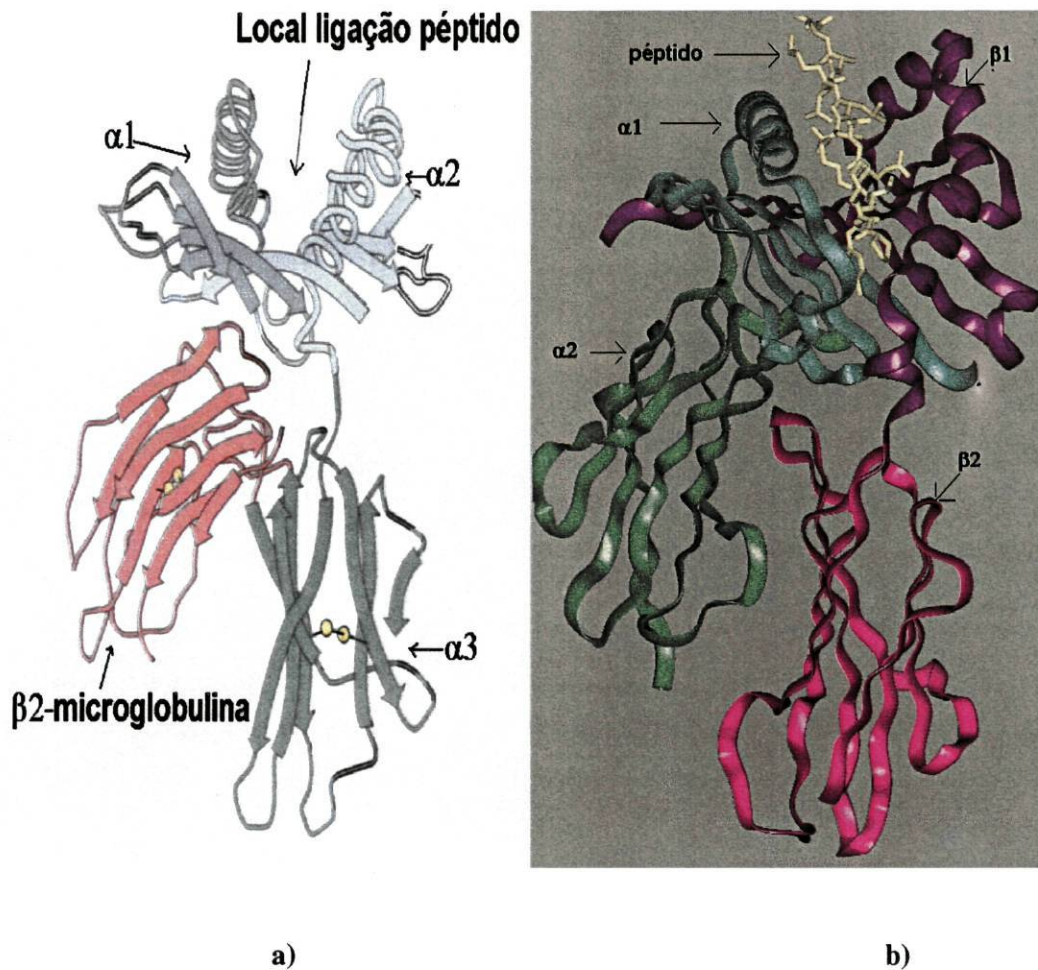


Figura I-3. Representação da estrutura tridimensional dos domínios de ligação ao péptido nas moléculas HLA classe I (a) e classe II (b). Adaptado de: (18) (a) e (19) (b).

A função das moléculas HLA é a apresentação de péptidos aos linfócitos T. Estes péptidos podem ser originados da degradação intracelular ou extracelular das proteínas. Os fragmentos peptídicos, resultantes da degradação intracelular das proteínas no proteossoma, são transportados pelos TAP (“transporter associated with antigen presentation”) para o retículo endoplasmático, onde se ligam a moléculas HLA classe I. Os dímeros daí resultantes atingem a superfície celular, através do aparelho de Golgi. Péptidos gerados a partir da degradação extracelular das proteínas (em endossomas ou lisossomas), ligam-se nas vesículas endossomiais a moléculas HLA classe II (figura I-4) ¹⁴.

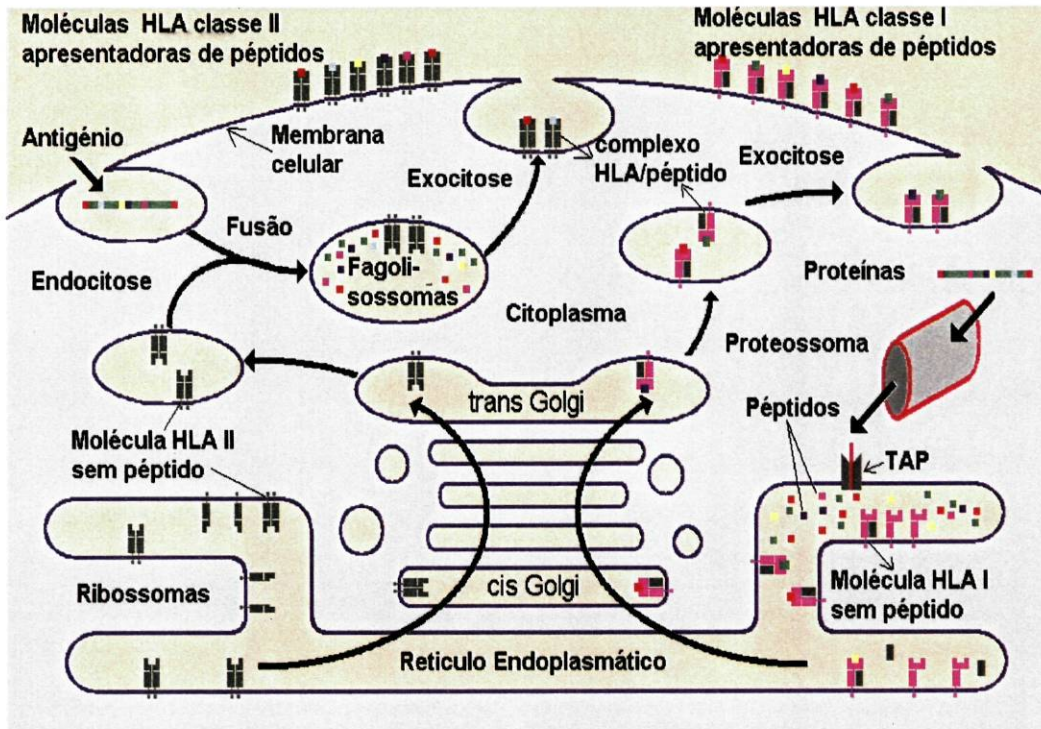


Figura I-4. Mecanismo de processamento e apresentação de peptídeos, resultantes da degradação intracelular ou extracelular das proteínas, pelas moléculas HLA classe I e II. Adaptado de: (20).

A cada molécula HLA classe I e II liga-se apenas um peptídeo de cada vez. Por outro lado, existem diferenças na natureza dos peptídeos que se ligam às moléculas da classe I e II. Deste modo, peptídeos com 9 a 11 resíduos de aminoácidos de comprimento ligam-se preferencialmente a moléculas da classe I, enquanto moléculas classe II conseguem albergar peptídeos com 10 a 30 resíduos ou mais. O complexo HLA classe I – peptídeo é reconhecido, preferencialmente, por células $TC8^+$ citotóxicas, enquanto que as células T Helper $CD4^+$ reconhecem, sobretudo, peptídeos apresentados por moléculas HLA classe II ¹⁴ (figura I-5).

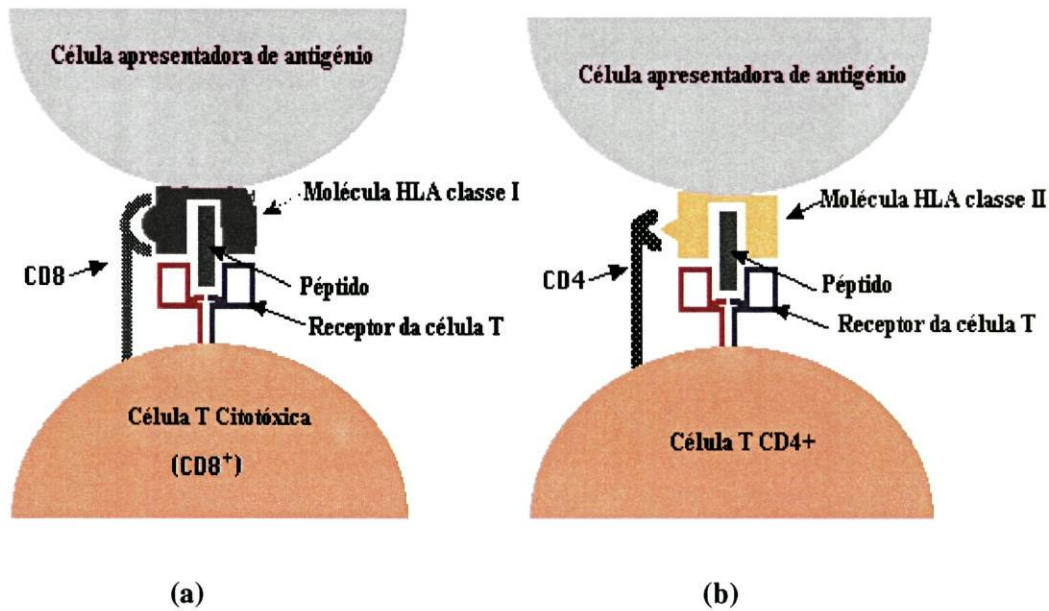


Figura I-5. Esquema que ilustra o reconhecimento dos complexos HLA classe I – péptido (a) e HLA classe II – péptido (b), por células TCD8⁺ citotóxicas e células T CD4⁺, respectivamente. Adaptado de: (21).

1.6.2. O HLA e a narcolepsia / hipersónia idiopática

Nos últimos 30 anos, a susceptibilidade ou a resistência a grande número de doenças (mais de 100) tem sido associada a polimorfismos do sistema HLA ^{10,22}. Estas patologias, são na generalidade do foro autoimune ou infecciosas ^{10,22}. A existência de factores de susceptibilidade, associados à narcolepsia-cataplexia tem sido descrita em todos os grupos étnicos ²³. Uma forte associação com os antígenos HLA-DR2 e DQ1, em serologia, foi inicialmente descrita por Honda e Juji em 1983 ⁸. Mais recentemente, com a ajuda de técnicas de biologia molecular verificou-se que a associação era com o haplótipo HLA-DRB1*1501 (HLA-DR2) e HLA-DQB1*0602 (HLA-DQ1) ^{22,24,25,26}. Posteriormente, utilizando marcadores genéticos adicionais na região HLA-DQ, foi estabelecido que HLA-DQB1*0602 e HLA-DQA1*0102 são actualmente os genes de susceptibilidade para a narcolepsia ^{10,27,28}. Estes foram identificados em quase todos os doentes japoneses, em 95% dos doentes caucasianos e em 70% dos afro-americanos ²⁹. Verificou-se também que o risco para a narcolepsia é duas a quatro vezes mais elevado nos pacientes caucasianos e afro-americanos homocigóticos para HLA-DQB1*0602 do

que nos heterozigóticos HLA-DQB1*0602²³. Esta observação leva a especular que outros alelos HLA-classe II não DQB1*0602 poderão ter efeitos adicionais na influência da susceptibilidade para o desenvolvimento da narcolepsia e de outras patologias do sono^{30,31}. Assim, a interacção dos alelos DQB1-DQA1-DRB1 poderá desempenhar um papel fundamental na predisposição para doenças relacionadas com a produção e organização do sono^{30,31}.

Em Portugal, estudos recentes, identificaram uma associação da narcolepsia-cataplexia com o haplótipo HLA-DRB1*1501(DR2)-DQA1*0102-DQB1*0602^{29,31,32,33,34}, tal como descrita noutras populações^{10,22,30,35}. Estudos preliminares, efectuados em doentes com hipersónia idiopática permitiram observar que os alelos HLA-DQB1*0301 e HLA-DRB1*03, eram mais frequentes nestes doentes do que nos narcolepticos-catapléticos e população controlo. A ausência do antigénio HLA-DQB1*0301 na narcolepsia-cataplexia, verificou-se nos estudos portugueses, mas não nos trabalhos efectuados por Mignot *et al.*²³, em que o alelo HLA-DQB1*0301 se encontra associado à narcolepsia. Os resultados anteriores salientam a importância da caracterização imunogenética para a distinção entre pacientes com narcolepsia e doentes com hipersónias, em populações geograficamente distintas^{29,32}.

A transmissão familiar da narcolepsia é rara, sendo na maioria dos casos de origem materna³⁶. Apenas 8-10% dos pacientes narcolépticos têm outro membro da família com narcolepsia-cataplexia¹⁰. Nestes casos o risco do 1º grau de parentesco é 10-40 vezes mais elevado que na população geral, levantando a hipótese da existência de factores de predisposição genética¹⁰.

Embora o haplótipo HLA-DQB1*0602 e DQA1*0102 esteja representado em 95% dos doentes caucasianos, não é necessário nem suficiente para o desenvolvimento da narcolepsia. Assim, um indivíduo que não possua o alelo HLA-DQB1*0602 pode manifestar a doença, e do mesmo modo, indivíduos com o alelo HLA-DQB1*0602 podem não ser doentes. Estes dados sugerem que factores genéticos não relacionados com o HLA e factores ambientais (como por exemplo a alimentação) poderão estar envolvidos na etiopatogénese desta doença. De facto, a importância dos factores genéticos é documentada por estudos realizados em gémeos monozigóticos, onde apenas 25-31% são concordantes para a narcolepsia. Deste modo, factores ambientais poderão também estar implicados na susceptibilidade para a narcolepsia¹⁰. Apesar de todos estes estudos o mecanismo patofisiológico da doença é ainda desconhecido²⁹.

1.7. O sistema hipocretina / orexina.

1.7.1. O que são as hipocretinas?

As hipocretinas são neurotransmissores identificados por De Lecea *et al.* (1998), segundo a técnica da subtração PCR tag direccional para o isolamento de transcriptos específicos hipotalâmicos. Estes autores isolaram a preprohipocretina mRNA como sendo o precursor de dois péptidos, a hipocretina-1 (orexina-A) e hipocretina-2 (orexina-B). Dois receptores foram encontrados ligados à hipocretina-1 e -2, com diferentes afinidades. O primeiro destes receptores, denominado receptor de hipocretina-1 (Hcrtr1), liga-se selectivamente à hipocretina -1, enquanto que Hcrtr 2 se liga a ambas as moléculas com a mesma afinidade ⁴.

1.7.2. Onde se localizam?

Estudos realizados em ratos permitiram verificar que as células que contêm hipocretina estão localizadas na região tuberal do hipotálamo, mais especificamente no núcleo hipotalâmico perifornical, núcleo hipotalâmico dorsomedial e áreas hipotalâmicas laterais e dorsais. As hipocretinas -1 (orexina-A) e -2 (orexina-B) são abundantes no núcleo seveal do hipotálamo e no tronco cerebral. Baixos níveis de Hcrtr-1 e Hcrtr-2 foram encontrados no córtex cerebral. Verificou-se, ainda, que o conteúdo em hipocretina-2 é duas a três vezes mais elevado do que em hipocretina-1, em todas as estruturas cerebrais estudadas. A Hcrtr-1 não foi detectada no tecido periferal ou nas glândulas pineal e pituitária, e a sua distribuição hipotalâmica é diferente nos machos e fêmeas ³⁷.

Elevados níveis de Hcrtr 1 foram observados no núcleo hipotalâmico ventromedial e *locus coeruleus*, enquanto Hcrtr 2 foi encontrado predominantemente no núcleo hipotalâmico paraventricular e na VI camada do córtex ³⁷.

Nos humanos, os neurónios que contêm hipocretina apresentam projecções para o tronco cerebral (por exemplo, para o *locus coeruleus*), cérebro anterior, regiões hipogênicas do cérebro anterior e amígdala ^{5,38}.

1.7.3. Quais os efeitos celulares das hipocretinas?

As hipocretinas têm sido descritas como tendo efeitos neuroexcitatórios. As investigações iniciais demonstraram este efeito na hipocretina-2. Estudos posteriores revelaram que em adição à ação excitatória, as hipocretina-1 e -2 tinham também efeitos neuromodeladores nos neurónios hipotalâmicos lateral e medial. Outra função destes péptidos parece ser o aumento dos níveis citoplasmáticos de cálcio nas células hipotalâmicas³⁷.

A activação dos neurónios do *locus coeruleus* sugere que o sistema hipocretina/orexina pode ter efeitos neuromodeladores em estados de excitação, deste modo, também tem sido feita referência ao papel destes neurónios na regulação da tonicidade muscular. Assim, um funcionamento deficiente do sistema hipocretina/orexina pode estar implicado na etiopatogénese da narcolepsia³⁷.

Tem sido, ainda, referido o provável envolvimento do sistema hipocretina/orexina, na regulação do apetite, no controlo gastrointestinal, cardiovascular e neuroendócrino e no balanço hídrico, o que pode ser devido às diversas e extensas projecções dos neurónios que possuem hipocretina^{37,39}.

1.7.4. O Papel do sistema hipocretina/orexina na patofisiologia da narcolepsia

Recentemente, foi descrita a importância do sistema hipocretina/orexina na regulação do sono e na narcolepsia⁴⁰. Tem sido levantada a hipótese de que a cataplexia e outros sintomas da narcolepsia se devem a uma diminuição da neurotransmissão de hipocretina⁶.

Estudos realizados em modelos animais permitiram verificar que ratos narcolépticos apresentavam uma mutação no gene preprohipocretina e que a narcolepsia canina resultava da ocorrência de uma mutação no receptor da hipocretina-2 (Hcrtr 2)^{40,41,42}, mutação esta que o tornava num péptido não funcional³⁷. Mutações nestes receptores, surgem devido à substituição de uma leucina por uma arginina, no núcleo HCRTR do péptido⁴³.

Contrariamente aos modelos animais, a narcolepsia humana não parece envolver mutações nos genes ou receptores do sistema hipocretina, mas antes a perda de

neurónios contendo hipocretina, no hipotálamo perifornical . Com base nestes dados, a hipótese mais provável é a de que a narcolepsia é uma doença autoimune ligada ao HLA, que destrói células contendo hipocretina. Assim, a diminuição da neurotransmissão de hipocretina e os níveis baixos de Hcr1 no líquido cefalorraquidiano (LCR), observados nos narcolépticos humanos, podem ser devidos a esse fenómeno ^{6,38,44,45,46}.

1.8. Associação do TNF- α e TNFRII com a narcolepsia humana

Um dos factores que pode estar implicado no processo de destruição dos neurónios que contêm hipocretina, referido anteriormente, é o TNF- α (“tumor necrose factor- α). Este é uma citocina, que contém 157 resíduos de aminoácidos ⁴⁷. O gene TNF- α encontra-se na região da classe III do HLA ⁴⁸, no cromossoma 6p21 ⁴⁹. É produzido por numerosos tipos de células incluindo monócitos, macrófagos, linfócitos T e B, células NK (“Natural killer”) e outros tipos de células estimuladas por endotoxinas ou outros produtos microbianos ⁴⁷. O TNF- α tem múltiplas funções na resposta imune, como por exemplo, a activação de macrófagos e apoptose ⁴⁸. Este gene também participa no sono, como substância sua promotora ⁴⁸.

As acções do TNF- α são mediadas por dois receptores: TNFR1 (“receptor tumor necrosis factor receptor 1”) de 55/60 KDa e TNFR2 (“receptor tumor necrosis factor receptor 2”) de 75 KDa. O TNFR2 localiza-se no cromossoma 1p36 e é expresso nos linfócitos T, estando envolvido na auto-regulação da apoptose de células TCD8⁺ ⁵⁰.

Conhecida a associação do TNF- α a várias doenças autoimunes e ligadas ao HLA (como o Lupus Eritematoso e a Esclerose Múltipla), tem sido sugerido que o TNF- α e/ou elementos que participam na via de tradução de sinal, possam estar implicados na narcolepsia ⁵¹.

1.9. As consequências da narcolepsia

1.9.1. A nível sócio-profissional

Sendo uma patologia crónica, a narcolepsia é um problema para toda a vida ⁵². Apesar de não ser uma doença mortal, os graus de invalidez e as suas consequências na vida pessoal, social e profissional são variáveis ¹. As repercussões a nível social dependem não só da gravidade da doença, mas também das características pessoais de cada indivíduo ². Os efeitos psicológicos e sociais são mais graves do que na epilepsia ⁵².

As consequências da narcolepsia podem dividir-se em dois grupos:

- Repercussões profissionais: são quase constantes. Os doentes apresentam diminuição das suas capacidades em 78% dos casos. Mais de 25% são vítimas de despedimento e 50% dos doentes têm receio de perder o emprego. São poucos os indivíduos (14%) que recebem pensões por incapacidade de trabalho. Na maioria das situações, as incapacidades profissionais estão ligadas directamente aos ataques de sono ^{1,53}.

- Consequências a nível pessoal e familiar: são consideráveis e levam muitas vezes à desintegração familiar ¹. Podem mesmo chegar a ocorrer divórcios, quando a doença não é bem compreendida pelo casal, já que a narcolepsia pode levar a uma diminuição do desejo sexual ^{53,54}. As alterações sócio-profissionais e familiares da doença agravam as alterações de personalidade, podendo surgir problemas psiquiátricos graves como neuroses e depressões ^{1,53,54}. As depressões estão estimadas em 30 a 52%, contra 8% da população geral ⁵². 81% dos narcolépticos têm dores de cabeça e 57% sofrem de enxaquecas ⁵². Nas crianças e adolescentes, esta doença é responsável por atrasos na aprendizagem ^{1,53}.

1.9.2. Na condução de veículos

A implicação da narcolepsia na condução de veículos é um assunto delicado de abordar ².

Em França, investigadores referiram que de 110 condutores implicados em acidentes de viação, 10% sofriam de narcolepsia ¹. Num estudo feito nos E.U.A, em 1997, verificou-se que os acidentes de viação ocorrem duas vezes mais em pessoas com sonolência diurna excessiva do que nos que não a apresentam ⁵². Neste país, morrem anualmente cerca de 50.000 pessoas por acidente de trânsito. Pensa-se que 13% desses acidentes são causados por adormecimento enquanto conduzem ¹. Nos E.U.A, em 36% dos acidentes de trânsito fatais e em 42 a 54% de todos os acidentes, o agente causal tem sido atribuído à sonolência excessiva ^{55,56,57}. Pelo que se julga, em Portugal, a sonolência é uma causa frequente de acidentes de viação e a primeira de acidentes mortais ². Cerca de 60 a 80% dos narcolépticos adormecem ao volante ⁵². Os ataques de cataplexia surgem em 29% dos casos, enquanto as paralisias ocorrem em 12% ¹.

O risco de acidentes de viação em doentes com narcolepsia é de 37% contra 5% da população geral ².

Convém referir que, quando a narcolepsia não foi ainda diagnosticada, o número de acidentes de viação causados por estes doentes é mais elevado do que na população em geral. Pelo contrário, nos narcolépticos-catapléticos que têm conhecimento da sua doença, o índice de acidentes mortais é inferior ao dos indivíduos não narcolépticos. Sob este ponto de vista, os narcolépticos ao volante são menos perigosos do que muitos outros condutores ¹.

1.10. Modalidades de tratamento para a narcolepsia

O tratamento da narcolepsia envolve, em simultâneo, intervenções farmacológicas e não farmacológicas ⁵⁸. Assim, podem considerar-se quatro modalidades de tratamento: o farmacológico, o comportamental, o ambiental e o psicológico ¹.

A terapêutica farmacológica tem como finalidade controlar os sintomas mais penosos da narcolepsia, ou seja, a sonolência diurna excessiva e a cataplexia ¹. Deste

modo, para a *redução da sonolência* usam-se estimulantes do sistema nervoso central que aumentam a vigilância, as capacidades para desempenhar certas tarefas e diminuem a fadiga ⁵⁸. Entre os estimulantes centrais ou não-analépticos estão as anfetaminas (dextroanfetamina e metanfetamina), outros não-analépticos aparentados às anfetaminas (pemolina, mazindol e metilfenidato) e estimulantes alfa-1-adrenérgicos (modafinil), entre outros ^{1,2,7,59}. No entanto, as anfetaminas podem provocar efeitos secundários de ordem neuro-psiquiátrica como, irritabilidade, hipertensão, ansiedade, cefaleias, mau humor, insónias e mais raramente dependência ^{2,7}. Por estes motivos foram retirados do mercado em França e só podem encontrar-se nas farmácias centrais dos hospitais e apenas em condições de prescrição muito restritas ^{2,7}. Nos E.U.A apenas o metilfenidato e a dextroanfetamina são aprovados para uso ⁵⁸. Actualmente, o modafinil é um novo agente que se tem mostrado eficaz na redução da sonolência diurna excessiva ^{1,30} em 60 a 70 % dos narcolépticos ². Ele provoca uma melhor organização do sono durante a noite do que as anfetaminas ⁷. O modafinil tem a vantagem de ser bem tolerado, tendo por vezes apenas como efeitos secundários hipertensão arterial, insónias e enervamento nos primeiros dias de tratamento ^{2,7}. O modafinil é, actualmente, utilizado como primeira escolha no tratamento da sonolência, da narcolepsia ^{2,7}. Em Portugal são utilizados como agentes terapêuticos, apenas o modafinil e o metilfenidato.

Para a *redução da cataplexia*, os anti-depressivos tricíclicos (clomipramina e imipramina) são os mais eficazes ^{1,2,7}. Estes medicamentos têm, no entanto, inconvenientes como secura da boca, obstipação, diminuição da libido, entre outros ². Quando o estado de cataplexia é grave é aconselhada a hospitalização do doente ¹. As *paralisias de sono e as alucinações hipnagógicas* são igualmente influenciadas pelos fármacos activos sobre a cataplexia ⁷.

Para a melhoria da qualidade do sono nocturno, podem também utilizar-se hipnóticos convencionais como benzodiazepínicos ou não-benzodiazepínicos ou o gama hidroxibutirato de sódio, que age como hipnótico ^{2,7}.

O efeito dos diversos fármacos atrás citados, tanto para o tratamento da sonolência diurna excessiva como da cataplexia, varia consoante os indivíduos. Assim, para se conseguir os resultados esperados é necessário ajustar as doses e horários de administração, a cada doente ¹.

O tratamento comportamental ensina o doente a alterar os seus hábitos e a ter uma boa higiene do sono. É aconselhado ao paciente fazer sestas (menos de 20 minutos)

repartidas ao longo do dia, principalmente após o almoço e ao fim da tarde, quando a sonolência é maior ^{1,7}.

O tratamento ambiental refere-se ao apoio que a entidade patronal, o sistema educativo (nos casos das crianças) e principalmente a família e a sociedade devem prestar ao doente, para que este não se sinta discriminado socialmente por ser narcoléptico. Actualmente, existem associações em diversos países que visam ajudar o paciente, informando-o e protegendo-o na sociedade. Nessas associações informam-se médicos, professores, familiares, ou seja, pessoas que convivem com estes doentes e o público em geral. Outra finalidade destas sociedades é informarem-se de todas as descobertas clínicas e científicas que se vão fazendo acerca da doença e pô-las ao serviço do doente ^{1,2}.

Por último, o aconselhamento psicológico do doente é essencial para aumentar a sua compreensão acerca da doença e aconselhá-lo nas suas decisões e estilo de vida ⁵⁸. Este apoio psicológico é também importante para que os doentes não desenvolvam uma atitude negativa face ao meio em que vivem ¹.

1.11. O tratamento da hipersónia idiopática

O tratamento da hipersónia idiopática é idêntico ao da narcolepsia, no entanto, a eficácia dos fármacos administrados é inferior ¹.

Nesta patologia existem também quatro tipos de tratamento: o farmacológico, o comportamental, o ambiental e o psicológico ¹.

No tratamento farmacológico encontram-se os estimulantes referidos para a narcolepsia. Também na hipersónia, o modafinil é o tratamento de primeira escolha e a sua eficácia é elevadíssima ¹.

A terapêutica comportamental e ambiental têm como finalidade aconselhar o doente a dormir o máximo possível, por exemplo, aos fins-de-semana ¹.

O acompanhamento psicológico fornece apoio e conselhos ao doente, ajudando a diminuir as consequências da doença na vida familiar e sócio - profissional ¹.

♦ *A narcolepsia–cataplexia, doença espectacular, é frequentemente menosprezada ¹, não é objecto de um reconhecimento oficial e a maioria dos médicos ignoram a sua existência e são incapazes de avaliar objectivamente as suas consequências ². É, assim, necessária uma informação adequada, acerca da doença, junto dos médicos, magistrados e outras entidades directa ou indirectamente relacionadas com a narcolepsia ².*

II. OBJECTIVOS

1. Contribuir para uma localização mais precisa na região 6p, dos genes HLA envolvidos na narcolepsia e hipersónia idiopática.
2. Analisar se certos genes envolvidos no processo patofisiológico poderão conferir susceptibilidade ou resistência à narcolepsia e hipersónia idiopática.
3. Identificar os alelos HLA classe II-DQA1, DQB1 e DRB1 em doentes com narcolepsia (com e sem cataplexia), hipersónia idiopática e outras patologias de sono, numa população do Norte de Portugal. Correlacionar o polimorfismo da classe II-DQA1, DQB1 e DRB1 com o diagnóstico diferencial das patologias do sono.
4. Analisar o polimorfismo no exão 6 do gene TNFR2, responsável pela substituição aminoacídica metionina-M/arginina-R, na posição 196 (alelo 196M/196R), em indivíduos com narcolepsia (com e sem cataplexia) e hipersónia idiopática, da região Norte do país.

III. MATERIAL E MÉTODOS

MATERIAL

3.1. População estudada

No presente trabalho foram estudados doentes seleccionados na Consulta de Sono do Serviço de Neurofisiologia do Hospital Geral de Santo António. No total, para a análise dos *loci* HLA classe II (DQA1, DQB1 e DRB1), foram investigados 52 pacientes: 19 com narcolepsia e cataplexia (NC) (14 H, 5 M); 4 com narcolepsia sem cataplexia (N) (1 H, 3 M); 9 com hipersónia idiopática (HIP) (2 H, 7 M) e 20 com outras patologias do sono (OPS) (11 H, 9 M).

A análise de um polimorfismo no exão 6 do TNFR2 foi efectuada em 32 doentes: 19 com narcolepsia e cataplexia (NC) (14H, 5 M); 4 com narcolepsia sem cataplexia (N) (1H, 3 M) e 9 com hipersónia idiopática (HIP) (2 H, 7 M).

Como população controlo, para o estudo dos alelos HLA, foi utilizado um conjunto de indivíduos saudáveis (216 para o *locus* HLA-DQA1, 220 para o *locus* HLA-DQB1 e 240 para o *locus* HLA-DRB1), da mesma etnia e provenientes da mesma região geográfica⁶⁰.

Para a análise do polimorfismo no exão 6 do TNFR2 foram estudados 44 indivíduos saudáveis, da mesma etnia e oriundos da região Norte de Portugal, que constituíram o grupo de referência.

3.2. Amostras biológicas recolhidas

Amostras biológicas de sangue periférico foram colhidas de indivíduos doentes e população controlo, por punção venosa, para tubos de colheita (*Vacutainer Kemergard K3 EDTA*), já preparados com um anti-coagulante - EDTA (Ácido etilenodiaminotetracético).

A colheita foi realizada no Laboratório de Patologia e Imunologia Molecular do Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar (I.C.B.A.S) e no Hospital Geral de Santo António (H.G.S.A).

A todos os doentes foi pedido consentimento informado, antes da colheita das amostras. O presente trabalho foi também submetido a um Parecer do Conselho de Ética.

METEDOLOGIA

3.3. Caracterização clínica

O diagnóstico de patologia do sono foi efectuado por clínicos do Serviço de Neurofisiologia do Hospital Geral de Santo António.

A caracterização : narcolepsia com ou sem cataplexia/hipersónia idiopática foi feita de acordo com os critérios da ASDA (“The American Sleep Disorders Association”) ⁶¹.

O diagnóstico da narcolepsia/hipersónia idiopática foi feito com base num questionário, exame clínico padrão e em exames complementares. O questionário teve como finalidade a pesquisa de antecedentes familiares de narcolepsia/hipersónia idiopática, o estabelecimento da história do doente e permitiu também avaliar a gravidade da doença e as suas consequências. Dado que o exame clínico pode não fornecer informação suficiente para o diagnóstico, realizaram-se exames complementares: Registo Poligráfico do Sono Nocturno, seguido de Teste de Latências Múltiplas do Sono (MSLT) e a Tipagem HLA ¹.

O **Registo Poligráfico do Sono (RPS)** é um registo simultâneo de vários parâmetros fisiológicos: actividade cerebral (EEG - electroencefalograma); movimentos oculares (EOG - electro-oculograma); tónus muscular (EMG - electromiograma); actividade cardíaca (ECG - electrocardiograma); ritmo respiratório (respiração diafragmática e nasal) e saturação do oxigénio (O₂ Sat), ocorridos durante o sono nocturno ^{13,62,63,64} (figura III-1).

EEG - electroencefalograma:

Os eléctrodos foram colocados em locais precisos do couro cabeludo, registando a actividade eléctrica (ondas cerebrais) correspondente aos campos eléctricos criados pela despolarização das sinapses. Os locais de colocação dos eléctrodos (figura III-3) obedecem a regras específicas: Frontais (F); Centrais (C); Temporais (T); Parietais (P) e Occipitais (O). Os que são colocados na linha média, antero-posteriores, designam-se por Z (F_Z, C_Z, P_Z e O_Z). Estas localizações foram definidas internacionalmente, sendo conhecidas como localizações dos eléctrodos segundo o Sistema 10-20. O que quer dizer que os eléctrodos são colocados a distâncias de 10 a 20%, das distâncias máximas entre os pontos antero-posteriores (Nasion e Inion da calote craneana) e transversais (unindo, pelo vértex craneano, as regiões pré-auricular direita e esquerda - zonas das articulações temporo-mandibulares). Com isso é possível localizar a actividade cerebral em sono, em ciclos de sono e mesmo em vigília. O traçado obtido traduz assim a nossa actividade cerebral, registada no escalpe. Quanto maior é a actividade cerebral, próxima da actividade ao acordar, mais as ondas cerebrais são de elevada frequência, fraca amplitude e irregulares. Diz-se que são desincronizadas. Ao contrário, quanto mais profundo é o sono, mais as ondas cerebrais se assemelham, têm baixa frequência, grande amplitude, são mais regulares e mais sincronizadas¹³.

EOG - electro-oculograma:

Os eléctrodos são colocados no ângulo externo dos olhos e registam os movimentos oculares. Distingue-se, assim, o sono acompanhado de movimentos oculares (REM), do sono sem movimentos oculares (Não-REM)¹³.

EMG - electromiograma:

Colocam-se os eléctrodos sobre o mento e registam-se as variações do tónus muscular. O tónus que corresponde ao estado de tensão do músculo em repouso não é constante, mas varia em função dos estados do sono¹³. Sabe-se que em sono REM os músculos do pescoço têm atonia (que se traduz por ausência de actividade muscular, no mento, em sono REM). São também colocados eléctrodos sobre o músculo tibial, para se observar se existem movimentos periódicos das pernas.

Outros:

Os outros parâmetros, referidos anteriormente, podem ser registados em simultâneo ¹³.

Todos estes Registos Poligráficos foram interpretados manualmente e com ajuda de um sistema informático ¹³. Deste modo, o RPS permite avaliar o adormecimento rápido à noite em sono REM ou Não-REM, os numerosos despertares nocturnos, uma instabilidade do sono ou eventual sonilóquia ¹. Este registo foi feito durante toda a noite, habitualmente, das 22-23 horas até às 7 horas da manhã e precede o Teste de Latências Múltiplas do Sono (MSLT) ¹.

O **Teste de Latências Múltiplas do Sono (MSLT)** foi designado por Carskadon e Dement, para avaliar a tendência fisiológica de adormecimento em certas condições ⁶⁵, ou seja, é uma medição bem validada da tendência para adormecer durante as horas em que se está normalmente acordado ⁶³. Avalia objectivamente a sonolência diurna excessiva e é o método tradicionalmente aceite para ajudar a confirmar o diagnóstico de narcolepsia, desde que haja entrada em sono REM ^{66,67}.

O teste consiste na colocação de eléctrodos de registo no couro cabeludo e na face do doente em condições semelhantes às do Registo Nocturno. De seguida, o indivíduo é convidado a deitar-se, de 2 em 2 horas, geralmente entre as 10 e as 18 horas, portanto 4 a 5 vezes durante o dia, dizendo-lhe para repousar com os olhos fechados e tentar adormecer, fazendo uma sesta de 15 a 20 minutos. Se em cada sesta a pessoa não adormecer até esses 20 minutos considera-se o ensaio negativo. Porém, o teste completo tem que continuar para o total de 4 a 5 ensaios. No intervalo entre cada ensaio do teste (MSLT) a luz permanece acesa e a pessoa em estudo não pode adormecer. Em cada sesta, o intervalo de adormecimento é medido a partir do início do registo, que coincide com o momento em que se apaga a luz até ao aparecimento de sono ^{1,63,64}. Mede-se assim o tempo médio de adormecimento (latência média do sono, calculada a partir dos resultados de todas as sestras) e os episódios de sono REM ¹ (figura III-2).

Convencionalmente, **confirma-se o diagnóstico de narcolepsia** mesmo na ausência de cataplexia, quando se verificam no Teste de Latências Múltiplas do Sono (MSLT) dois ou mais períodos de adormecimento em sono REM seguidos e uma latência média de sono curta ²² (igual ou inferior a 5 minutos ⁶³), situação que geralmente não se observa nas pessoas que não têm esta perturbação ⁶³, e desde que na

noite anterior, o sono tenha tido um padrão normal ou próximo do normal. Por este motivo, é que o diagnóstico e o MSLT devem ser feito no dia a seguir a uma noite de Registo Poligráfico do Sono. O MSLT é, sobretudo, valioso para fazer a distinção entre a sonolência verdadeira e a fadiga ou falta de energia ⁶³. Existem, contudo, MSLT falsos-negativos ⁶³. Por outro lado, a validade deste teste pode também ser questionada devido a confundir-se a sonolência diurna excessiva com a tendência para adormecer ⁶⁷. Assim, os resultados devem ser interpretados à luz dos sintomas clínicos dos doentes e dos resultados do Registo Poligráfico do Sono na noite anterior ⁶³. Neste registo, o adormecimento nocturno em sono REM é o sinal poligráfico mais característico da narcolepsia, para além de interrupções do sono ¹.

Na **hipersónia idiopática**, os resultados da poligrafia nocturna podem não ser definidores do diagnóstico e o registo não revelar qualquer particularidade, para além da duração anormalmente longa. Porém, o MSLT, realizado imediatamente a seguir, revela hipersónia objectiva sem a presença de sono REM durante as sesta e adormecimento em sono Não-REM ⁶³.

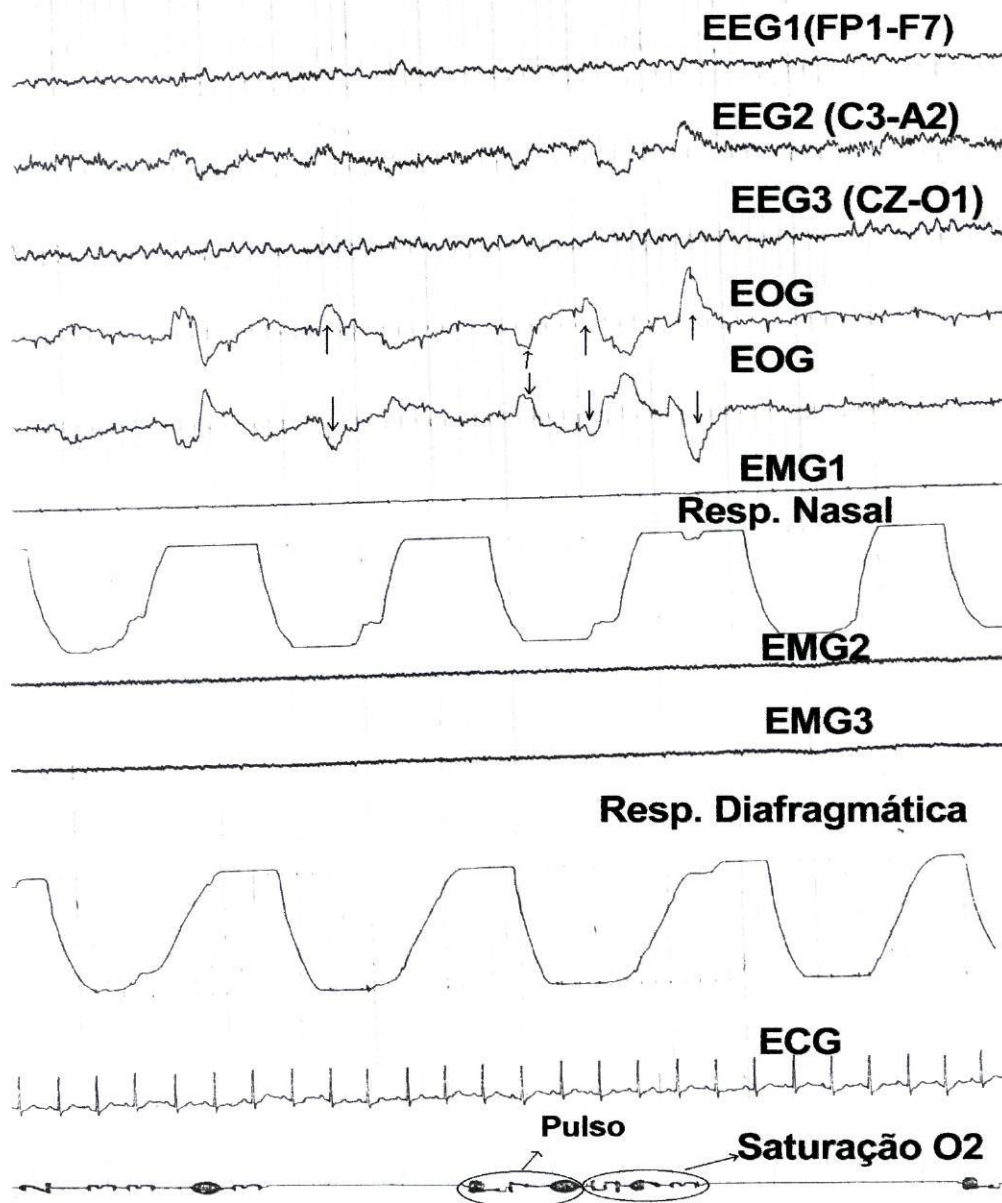
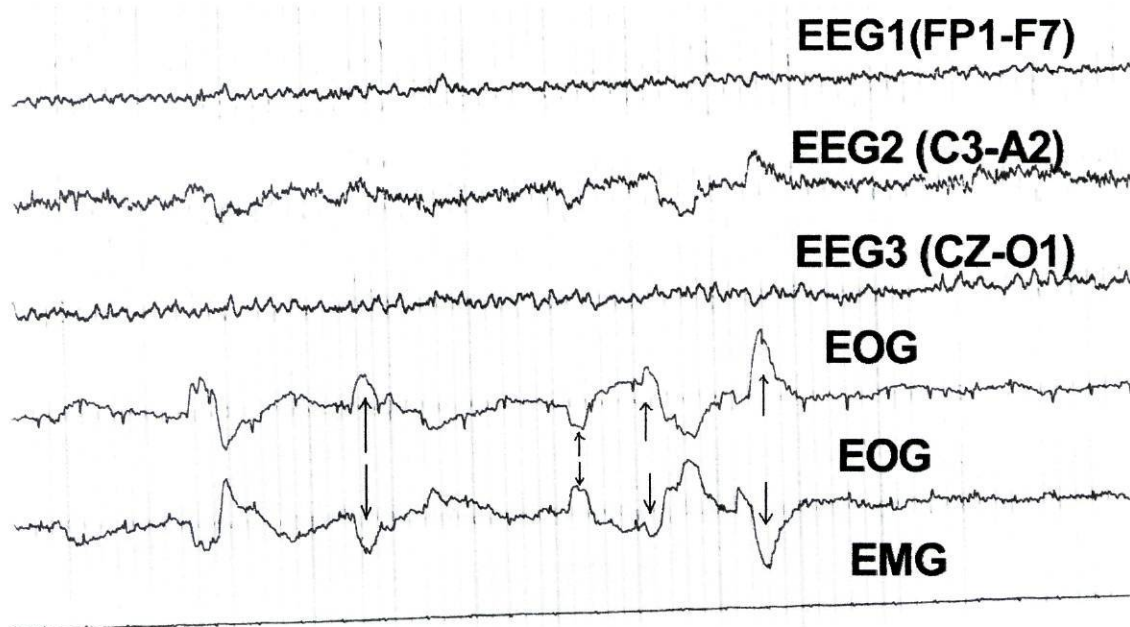


Figura III-1. Registo Poligráfico do Sono (RPS), onde se pode observar o registo simultâneo de vários parâmetros fisiológicos, durante a noite: **EEG1 (FP1-F7)**- electroencefalograma realizado com eléctrodos colocados na posição FP1-F7, da Classificação Internacional Sistema 10-20.; **EEG2 (C3-A2)**- electroencefalograma realizado com eléctrodos colocados na posição C3-A2; **EEG3 (CZ-O1)**- electroencefalograma realizado com eléctrodos colocados na posição CZ-O1; **EOG**- electro-oculograma (os movimentos oculares estão representados pelas deflexões positivas e negativas (ver setas)); **EMG1**- electromiograma realizado com eléctrodo colocado no mento; **EMG2**-electromiograma realizado com eléctrodo colocado no músculo tibial anterior direito; **EMG3**- electromiograma realizado com eléctrodo colocado no músculo tibial anterior esquerdo; **Resp. Nasal**- respiração nasal; **Resp. Diafragmática**- respiração diafragmática; **ECG**- electrocardiograma e **Saturação O₂**- canal que regista a saturação de O₂ (representado na figura por “S- deitado” e “93”) e o pulso (representado neste registo por “P- deitado” e “70”).



ECG



Figura III-2. Teste Latências Múltiplas do Sono (MSLT) efectuado para avaliar a tendência de adormecimento durante o dia: EEG1 (FP1-F7)- electroencefalograma realizado com eléctrodos localizados em FP1-F7.; EEG2 (C3-A2)- electroencefalograma realizado com eléctrodos localizados em C3-A2; EEG3 (CZ-O1)- electroencefalograma realizado com eléctrodos localizados em CZ-O1; EOG-electro-oculograma, para registo de movimentos oculares; EMG- electromiograma realizado com eléctrodo localizado no mento; ECG- electrocardiograma.

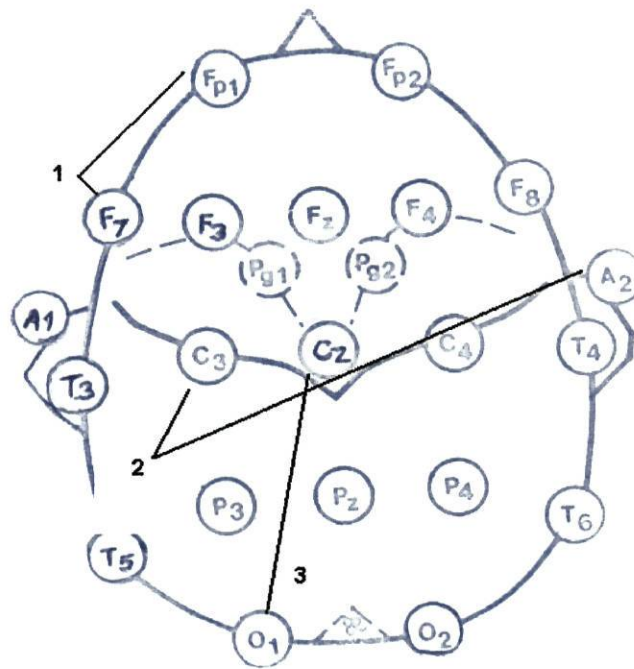


Figura III-3. Esquema representativo das localizações no escalpe, onde se colam os eléctrodos durante a realização do Registo Polográfico do Sono (RPS) e Teste de Latências Múltiplas de Sono (MSLT), de acordo com o Sistema Internacional 10-20: 1) **FP1-F7**- eléctrodos localizados em FP1 (Fronto Polar Esquerdo) e F7 (Fronto-Temporal ou Temporal Anterior Esquerdo); 2) **C3-A2**- eléctrodos localizados em C3 (Central Esquerdo) e A2 (Auricular Direito); 3) **CZ-O1**-eléctrodos localizados em CZ (Vértex) e O1 (Região Occipital Esquerda).

3.4. Estudos genéticos

3.4.1. Extração de DNA – Método Clássico: “Salting Out”

O DNA (Ácido Desoxirribonucleico) genómico foi isolado de leucócitos de sangue periférico, utilizando uma modificação do método clássico de “Salting Out”, descrito por Miller *et al.* ⁶⁸. Este método permite a extração de grandes quantidades de DNA, sendo preferencialmente usado quando o DNA extraído se destina a ser armazenado (congelado). Baseia-se no facto da solubilidade da maioria das proteínas se apresentar bastante diminuída na presença de elevadas concentrações de sais.

Numa primeira fase isolaram-se as células mononucleares (leucócitos), centrifugando (centrifuga: *Hettich zentrifugen Universal*) amostras de 10 mL de sangue a 2000 rpm, durante 10 minutos. Após a centrifugação obteve-se a fase celular (eritrócitos e *buffy coat* - anel de leucócitos) separada da fase líquida (soro). Depois retirou-se o plasma e o *buffy coat* (com alguns eritrócitos à mistura) para um tubo *Falcon* de 50 mL (*Greiner Labortechnik*). Adicionaram-se 50 mL de um tampão de lise de eritrócitos (RCLB “Red cell lysis buffer” – Concentração Final: 1M Tris-HCl pH 7.2; 5 M NaCl e 1 M MgCl₂.6H₂O), homogenizou-se e incubou-se 10 minutos à temperatura ambiente. O passo seguinte consistiu numa centrifugação a 2000 rpm (centrifuga: *Megafuge 1.0 R- Heraeus Sepatech*), 10 minutos a 4°C. Decantou-se o sobrenadante (glóbulos vermelhos e outros) e ficámos com o *pellet* de leucócitos que foi submetido a mais duas lavagens com RCLB e a novas centrifugações, até o sobrenadante ficar límpido. Nesta fase o *pellet* de leucócitos ou foi congelado a -20°C ou continuou-se o procedimento, adicionando 3,5mL do tampão TE-2 (Tris-EDTA - Concentração Final: 10mM Tris-HCl; 0,4 M NaCl; 2mM EDTA), 200 µL de 10% SDS (“Sodium Dodecyl Sulfate”) e 10 µL da enzima Proteinase K (50mg/mL) (*Sigma*). O SDS é um detergente que activa a enzima e juntamente com o TE-2 promove a lise membranar. A lise celular leva à libertação do DNA e das proteínas intracelulares. Após agitação no vortex (*VM 2 CAT, M. Zipperer GmbH D79219 Stanfer*), a amostra foi incubada durante uma noite em banho-maria (*GFL 1083*), a 42°C, de forma a promover a digestão das células lisadas. As amostras digeridas foram, de seguida, transferidas para um tubo cónico de 15 mL (*Greiner Labortechnik*) e adicionou-se 1 mL de NaCl 6M. Este é um tampão salino que precipita as proteínas, rebentando as membranas dos

leucócitos, deixando assim, o DNA livre no meio. Depois de ter sido agitado no vortex, a solução foi submetida a agitação lenta num agitador magnético (*Stuart Scientific-platform Shaker STR 6*) durante 10 minutos, até a mistura apresentar um aspecto leitoso, resultante da precipitação das proteínas. Uma centrifugação a 3000 rpm, cerca de 20 a 30 minutos, a 23°C, permitiu separar o sobrenadante, que contém o DNA, que foi transferido para um tubo *Falcon* 15 mL desprezando-se as proteínas. Finalmente, promoveu-se a precipitação do DNA com 20 mL de etanol absoluto (*Merck*) frio (-20°C), que desidrata a molécula de DNA obrigando-o a sair da solução. Por inversão do tubo várias vezes obteve-se o DNA concentrado num novelo. Este foi lavado com 5 mL de etanol a 70% frio e depois ressuspendido em tampão -TE *buffer* (Tris-EDTA - Concentração Final: 10 mM Tris-HCl PH 7.2; 1 mM EDTA). A quantidade de TE usada para diluir o DNA foi determinada pela observação empírica do tamanho do novelo, para uma concentração de DNA próxima dos 200 ng/μL. Deixou-se o DNA durante algumas horas num agitador rotativo (*Stuart Scientific*), para que este entrasse em solução.

3.4.2. Tipagem genética HLA classe II- DQA1, DQB1 e DRB1

3.4.2.1. Amplificação dos alelos dos loci HLA classe II-DQA1, DQB1 e DRB1 por PCR-SSP

A identificação dos alelos HLA classe II foi efectuada por amplificação do DNA genómico, utilizando a técnica de **PCR** (“Polymerase Chain Reaction”) - **SSP** (“Sequence Specific Primers”) ^{69,70,71,72}.

A técnica de PCR foi realizada pela primeira vez em 1985 por Kary Mullis constituindo actualmente uma ferramenta indispensável no campo da biologia molecular, nomeadamente, em biologia da evolução, diagnóstico de doenças genéticas humanas e ciências forenses. É um método simples, rápido, capaz de copiar e amplificar em minutos sequências de DNA específicas (acima de 1 kb de comprimento), tornando possível estudar material genético onde de outro modo seria difícil ou mesmo impossível. Permite analisar uma determinada sequência numa amostra exígua de DNA, qualquer que seja a quantidade e a qualidade do DNA, desde que tenha pelo menos uma cadeia de DNA intacta rodeando a região a ser amplificada. É necessário conhecer a

sequência de DNA que rodeia a região de interesse para ser possível a construção dos *primers* usados na amplificação. Conhecida a referida sequência é possível escolher os *primers* por forma a permitir a delimitação directa do local polimórfico. A técnica de PCR tornou-se um meio precioso para a análise de regiões polimórficas em amostras de DNA humano, permitindo com o uso do mesmo protocolo, parâmetros de PCR e reagentes, detectar um número elevado de especificidades alélicas, em vários *locus* ⁷³.

Este processo baseia-se na amplificação enzimática “in vitro” de um fragmento de DNA de interesse, flanqueado por dois *primers* que hibridam com as extremidades 3’ da dupla cadeia ⁷³. O processo consiste em três estágios, os quais são repetidos em 20 ou mais ciclos (figura III-4):

1. A primeira fase é a **desnaturação** da sequência de DNA que se pretende estudar: a dupla cadeia (ds DNA) é aquecida a 95°C para formar a cadeia simples de DNA (ss DNA) ⁷³.
2. O segundo estágio envolve um abaixamento da temperatura entre os 30 a 70°C, o qual permite o “**annealing**” ou hibridização/ emparelhamento dos dois *primers* oligonucleotídicos sintéticos, um para cada um dos modelos de cadeia simples (*primer 1* hibridiza com a extremidade 3’ da cadeia sem sentido e o *primer 2* com a extremidade 3’ da cadeia com sentido). Os *primers* são moléculas pequenas, de cadeia simples, as quais são complementares com o fim do segmento de DNA a ser amplificado ⁷³.
3. O terceiro estágio é constituído pela **extensão** dos *primers* ao longo do modelo de DNA de cadeia simples. Esta extensão é conduzida pela DNA polimerase termóstável (por exemplo: a *Taq* DNA polimerase), na presença de deoxinucleótidos trifosfatados (dNTPs: adenina - dATP, timina - dTTP, guanina - dGTP e citosina - dCTP) a 72°C. Deste modo, duas moléculas de DNA de cadeia simples são geradas a partir de uma molécula de DNA original ⁷³.

Cada ciclo permite uma duplicação teórica da sequência inicial (quantidade de DNA presente), correspondendo a um crescimento exponencial da referida sequência, ou seja, decorridos 20 ciclos o DNA em estudo delimitado pelos *primers*, cuja sequência de bases foi previamente seleccionada, estará amplificado cerca de 1 milhão de vezes ⁷³.

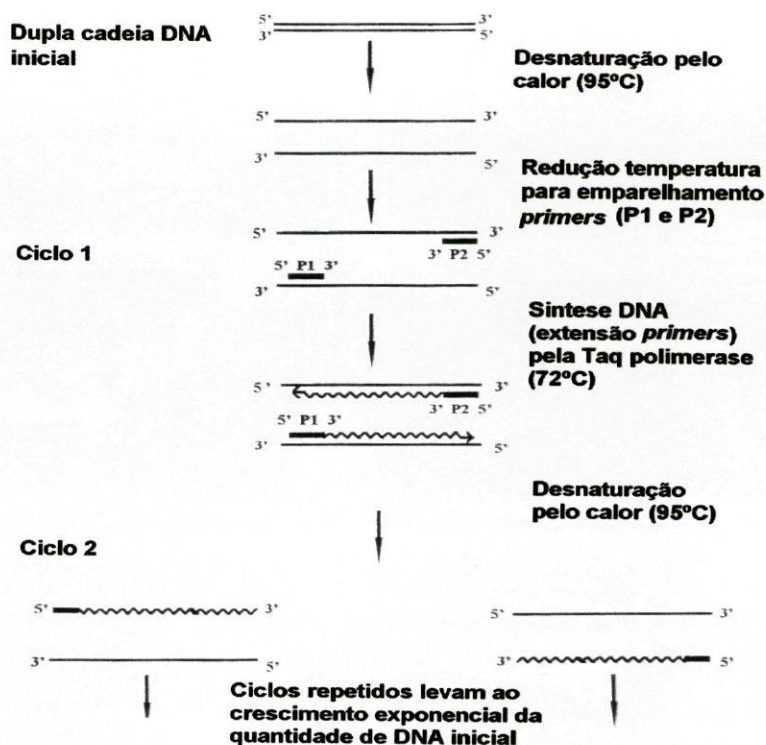


Figura III-4. Esquema representativo das fases da Reacção em Cadeia da Polimerase (PCR). Adaptado de: (73).

No presente trabalho, a técnica de PCR-SSP foi efectuada em duas fases: 1- amplificação genérica dos *loci* HLA-DQA1, DQB1 e DRB1 (baixa-resolução) utilizando *primers* previamente descritos^{69,70,71,72} e actualizados no 11º e 12º *Workshop* Internacional de Histocompatibilidade (tabelas III-6, III-7, III-9); e 2- amplificação subsequente com *primers* específicos para o alelo (alta-resolução)⁷⁴ (tabela III-8).

Assim, para a amplificação de baixa resolução dos alelos dos *loci* HLA-DQA1, DQB1 e DRB1, o primeiro passo consistiu na distribuição das misturas dos *primers* usados para a tipagem de cada alelo. Para a tipagem HLA-DQA1 e HLA-DRB1 distribuíram-se 5 µL de cada uma das misturas de *primers* (18 misturas de *primers* de um kit comercial *Dynal Classic SSP* para o HLA-DQA1 e 24 misturas de *primers* caseiros para o DRB1) (tabela III-6 e III-9), em tubos de PCR (*Robbins Scientific*). Como controlo interno de amplificação, na tipagem HLA-DRB1, foi também adicionado em cada reacção de PCR um par de *primers* (*Life Technologies*): *Primer*

Sense (P5') e *Primer* Anti-sense (P3'), cuja sequência encontra-se descrita na tabela III-1.

Tabela III-1. Sequência nucleotídica dos *primers* utilizados na reacção de amplificação por PCR dos alelos do *locus* HLA-DRB1.

<i>Primer</i>	Nome	Sequência
Sense (P5')	CAmp A	5' tgc caa gtg gag cac cca a
Anti-sense (P3')	CAmp B	5' gca tct tgc tct gtg cag at

Para a tipagem HLA-DQB1, não foi necessário realizar a distribuição das misturas de *primers*, uma vez que os kits de *primers* comerciais *Olerup SSPTM* já traziam distribuídas as 8 misturas de *primers* liofilizados (tabela III-7).

As misturas foram armazenadas a -20°C .

Para efectuar a reacção de PCR, preparou-se uma mistura de PCR, num tubo de *epENDORF* (*Sarstedt-Aktiengesellschaft*) de 0,5 mL, de acordo com a tabela III-2.

Tabela III-2. Volume dos diferentes reagentes utilizados para preparar a mistura de PCR para a amplificação de cada *locus* HLA.

<i>Locus</i>	Volume (μL)			
	Master-mix *	Água bidestilada e estéril	DNA (50 ng/ μL)	<i>Taq</i> DNA polimerase
HLA-DQA1*	60,0	19,5	19,5	1,6
HLA-DQB1*	30,0	59,2	10,0	0,8
HLA-DRB1*	84,0	24,0	29,0	2,2

A master-mix *, mistura-mãe previamente preparada, é uma solução composta pelos seguintes reagentes:

- 960 μL de água esterelizada;
- 1 mL de tampão ($10 \times \text{NH}_4^+ (\text{s/ Mg}^{2+})$) (*Bioline*);
- 360 μL de MgCl_2 ;
- 500 μL de glicerol (*Sigma*)
- 20 μL de dNTPs (*Amersham Pharmacia*);
- 100 μL de vermelho de cresol.

Cada um dos componentes referidos na tabela, foi agitado no vortex (*Retsch Mixer*) antes de adicionados à mistura de PCR. A enzima *Taq* DNA polimerase (*Bioline*) foi o última a juntar-se à mistura.

Depois de preparada a mistura de PCR e agitada no vortex, retiram-se as placas com as misturas de *primers* do frigorífico e adicionou-se, com uma pipeta de distribuição (*Eppendorf Multipette Plus*), 5 (no caso do DRB1 e DQA1) e 10 (no caso do DQB1) μL da mistura anterior por cada tubo de PCR. Para um volume final de 10 μL temos para o DRB1 e DQA1: 5 μL de mistura de *primers* + 5 μL de mistura de PCR e para o DQB1: 10 μL mistura de PCR + *primers* liofilizados.

De seguida, a reacção de PCR foi realizada num termociclador (*GeneAmp PCR System 2700 – Perkin-Elmer, Roche, USA*), de acordo com o programa de amplificação descrito na tabela III-4.

Para a subsequente amplificação do alelo HLA-DQB1*06, por PCR –SSP, com *primers* específicos para o alelo (alta resolução) foram usadas 16 misturas de *primers* (kits *Olerup SSPTM*) (tabela III-8). Os procedimentos seguidos foram os mesmos que para a amplificação a baixa resolução, variando apenas as quantidades dos reagentes que fazem parte da mistura de PCR.

A mistura de PCR continha 57,0 μL de *master-mix*; 19,0 μL de DNA; 112,5 μL de água e 1,5 μL de *Taq* DNA polimerase. Foram também distribuídos 10 μL de mistura de PCR por cada tubo de PCR, contendo as misturas de *primers* liofilizados, sendo depois colocados no termociclador, com o programa de amplificação referido anteriormente (tabela III-4).

3.4.2.2. Electroforese em gel de agarose

Os produtos amplificados por PCR foram resolvidos numa electroforese em gel de agarose (*Ultrapure agarose GibcoBRL*) a 1,5 %. O gel encontrava-se mergulhado em tampão TAE 1x (composto por Trizma Base, EDTA.Na₂ e Ácido Acético Glacial), numa tina de electroforese (*Pharmacia Biotech-hoefer Supersub*) ligada a uma fonte de alimentação (*Desaga Sarstedt-Gruppe desatronc 500/500*).

Os resultados foram visualizados num transiluminador U.V. (*Vilber Lourmat*) com a ajuda do Brometo de Etídio (*Sigma*), adicionado ao gel durante a sua preparação. O Brometo de etídio, quando ligado à dupla cadeia de DNA, produz fluorescência à luz Ultra-Violeta. Por último, o gel foi fotografado com *máquina Kodak digital science DC120 Zoom Mega Pixel S/N: EK B90400416*.

3.4.3. Tipagem do polimorfismo de tamanho de fragmentos de restrição no exão 6 do gene TNFR2 pela técnica de PCR-RFLP com enzima de restrição *Nla III*.

Os RFLPs (Restriction Fragments Lengths Polymorphisms), polimorfismos de tamanho de fragmentos de restrição, resultam da actuação de enzimas de restrição. A metodologia baseia-se no estudo do tamanho dos fragmentos produzidos pela digestão do DNA com enzimas de restrição, que são endonucleases que têm desempenhado um papel importante no estudo dos polimorfismos do DNA, pois reconhecem e cortam o DNA em fragmentos específicos, que são facilmente analisados - os RFLPs. O tamanho dos fragmentos de restrição é função do número de cópias presentes nos *loci* estudados. Estes fragmentos podem ser analisados por electroforese em gel de agarose⁷³.

O processo laboratorial desenrolou-se nas seguintes fases:

3.4.3.1. Amplificação do DNA genómico pela técnica PCR-RFLP

As amostras de DNA foram amplificadas pela técnica de PCR-RFLP de acordo com os procedimentos previamente descritos⁵⁰. Prepararam-se tubos de PCR aos quais foram adicionados 1 µL de DNA e 1 µL de água bidestilada estéril. Depois os tubos foram colocados no frigorífico a 4°C, enquanto se preparou a mistura de PCR, que continha (por exemplo para 14 tubos de PCR):

- a) dNTPS - 0,5 x 14 tubos = 7µL
- b) *Primer Sense* * - 0,625 x 14 = 8,75 µL
- c) *Primer Anti-sense* * - 0,625 x 14 = 8,75 µL
- d) Tampão (10 x NH₄⁺ (s/ Mg²⁺)) - 2,5 x 14 = 35 µL
- e) MgCl₂ (50 mM) - 0,75 x 14 = 10,5 µL

f) Água bidestilada estéril (ddH₂O)– 17,8 x 14 = 249,2 µL

g) *Taq* DNA polimerase – 0,2 x 14 = 2,8 µL

*As sequências dos *primers* usados na amplificação do fragmento de 242pb do exão 6 do TNFR_{II} encontram-se descritas na tabela III-3.

Tabela III-3. Sequência nucleotídica dos *primers* utilizados na reacção de amplificação do gene TNFR_{II}.

<i>Primer</i>	<i>Sequência</i>
Sense (P5')	5' act ctc cta tcc tgc ctg ct
Anti-sense (P3')	5' ttc tgg agt tgg ctg cgt gt

De seguida, colocaram-se 23 µL da mistura de PCR nos tubos de PCR que estavam no frio. Por último, estes foram levados para o termociclador (*GeneAmp PCR System 2700 – Perkin-Elmer, Roche, USA*) e a amplificação das amostras ocorreu nas condições do programa TNFR_{II} descrito na tabela III-5.

Em cada amplificação foi usado um controlo.

3.4.3.2. Electroforese em gel de agarose a 1,5%

Para verificar se a amplificação foi bem sucedida, os produtos do PCR foram corridos num gel de agarose a 1,5%. Para isso, retiraram-se 10 µL de cada amplificado para outros tubos e adicionaram-se 2 µL de um tampão de carregamento do gel, o *loading buffer* (20% de Ficoll 400, 0,1 M NaEDTA pH 8,0, 1% SDS, 0,25% de azul de bromofenol e 0,25% de xilenocianol). Depois carregaram-se as amostras no gel de agarose, usando pipetas *Jencons sealpette ER 77293* e *Eppendorf Research EQ 33734*. No início do gel foi aplicado também um marcador de pesos moleculares 100pb (*Gene Craft*).

3.4.3.3. Digestão enzimática com *Nla III* e electroforese em gel de agarose a 4%

Nos casos em que a amplificação funcionou, para a identificação dos alelos 196M (presença do local de restrição para a enzima *Nla III*) e 196R (ausência do local de restrição para a *Nla III*), fez-se a digestão dos produtos amplificados com 4 unidades de enzima de restrição *Nla III* (ATG → AGG) (*New England Biolabs*). Uma electroforese em gel de agarose a 4% permitiu separar os fragmentos de DNA cortados. A mobilidade electroferética de um fragmento é inversamente proporcional ao logaritmo do número de pares de bases, dentro de certos limites.

Os passos do procedimento foram os seguintes: colocaram-se em tubos de *ependorf* 5 µL de amplificado, 1µL de tampão (10 x NH₄⁺ (s/ Mg²⁺)), 1µL de BSA (albumina sérica bovina) (*New England Biolabs*) e 2 µL da enzima *Nla III*. De seguida adicionaram-se 10 µL de óleo mineral. Depois colocaram-se os tubos na estufa (*Memmert 854 Shwabach P 30760033*) a 37°C durante pelo menos 3 horas, podendo, no entanto, ficar toda a noite. Depois de retirar da estufa, adicionaram-se, a cada digerido, 2 µL de *loading buffer*. A um indivíduo amplificado, mas não digerido, que serviu como controlo, adicionou-se também o *loading buffer*. As amostras digeridas e o controlo foram submetidas a uma corrida electroforética em gel de agarose a 4%. Os resultados foram observados no transiluminador e fotografados.

3.5. Análise estatística

As frequências fenotípicas dos genes HLA classe II (HLA-DQA1, DQB1 e DRB1) e as frequências fenotípicas e genotípicas do polimorfismo 196M/196R no exão 6 do gene TNFR2 foram obtidas por contagem directa. Para analisar a existência de diferenças estatisticamente significativas nas frequências fenotípicas/genotípicas entre a população de doentes e população controlo, foi utilizado o Teste de χ^2 ou Teste Exacto de Fisher, usando o programa SPSS (Statistics Package for the Social Sciences, Versão 10.0). As diferenças encontradas foram consideradas estatisticamente significativas para valores de $p < 0,05$.

Para podermos averiguar se o facto de um indivíduo ser portador de um determinado alelo HLA constitui um risco acrescido para contrair a doença, será necessário comparar o risco de contrair a doença nos indivíduos que possuem o alelo e nos que não apresentam esse alelo. A razão entre a incidência da doença nos indivíduos com o alelo e nos indivíduos sem alelo, dá-nos o Risco Relativo (RR). Se existir associação do alelo à doença, o RR constitui uma medida de força desta associação. No presente trabalho realizou-se um estudo de indivíduos doentes *versus* população controlo, não sendo possível por isso determinar a incidência da doença nos indivíduos com e sem alelo. Deste modo, não se pode calcular o Risco Relativo directamente. O programa SPSS dá-nos o valor do *Odds Ratio* (OR), que constitui uma aproximação ao Risco Relativo, uma vez que quantifica directamente a probabilidade de uma pessoa que possui um determinado alelo HLA (factor de risco) tem de possuir a doença, comparando com aqueles indivíduos que não possuem esse alelo. O Risco Relativo (RR), é muitas vezes referido em estudos sobre HLA e doença.

Tabela III-4. Parâmetros do programa de amplificação para PCR-SSP do polimorfismo HLA-Classe II.

Passo	Temperatura (°C)	Tempo	Nº de ciclos
Desnaturação inicial	94	2'	1
Desnaturação	94	10''	10
Emparelhamento ("Annealing")/ Extensão	65	1'	
Desnaturação	94	10''	
Emparelhamento	61	50''	20
Extensão	72	30''	
Armazenamento(opcional)	4	indefinido	1

Tabela III-5. Parâmetros do programa de amplificação do fragmento do gene TNFR11.

Passo	Temperatura (°C)	Tempo	Nº de ciclos
Desnaturação	95	5'	1
Desnaturação	95	45''	
Emparelhamento ("Annealing")	58,5	45''	30
Extensão	72	2'	
Extensão	72	5'	1
Armazenamento(opcional)	4	indefinido	1

Tabela III-6. Especificidades e tamanhos dos produtos PCR das 18 misturas de *primers* utilizadas para a tipagem DQA1 (baixa resolução).

Nº Mistura de <i>Primer</i>	Tamanho aproximado do produto PCR específico (pb)	Especificidades Alélicas
1	150	DQA1*0101, 0104, 0105
2	175	DQA1*0101-01022, 0104-0106
3	100	DQA1*01021-0103, 0201
4	110	DQA1*0103
5	100	DQA1*0104
6	220	DQA1*0104, 0105
7	120	DQA1*0106
8	125	DQA1*0201
9	190	DQA1*03011-0303
10	205	DQA1*0302, 0303
11	220	DQA1*0302
12	205	DQA1*0401
13	200	DQA1*05011-0503, 0505
14	115	DQA1*0502
15	205	DQA1*0503
16	200	DQA1*0504
17	235	DQA1*0505
18	120	DQA1*06011, 06012

Tabela III-7. Especificidades e tamanhos dos produtos PCR das 8 misturas de *primers* utilizadas para a tipagem **DQB1** (baixa resolução).

Nº Mistura de Primer	Tamanho aproximado do produto PCR específico (pb)	Tamanho da banda controlo (pb)	Especificidades Alélicas
1	220	515	DQB1*05011-0504
2	220	430	DQB1*06011-0617
3	205	430	DQB1*0201-0203
4	130,145	430	DQB1*0201 0202, 0302, 0305, 0307, 0308
5	135	515	DQB1*03011-0310
6	125, 140	430	DQB1*0302, 03032, 03033, 0305, 0306-0308
7	125	515	DQB1*0203, 03011, 03012, 03032, 03033, 0306, 0309, 0310
8	195	430	DQB1*0401, 0402

Tabela III-8. Especificidades e tamanhos dos produtos PCR das 16 misturas de *primers* utilizadas para a tipagem **DQB1*06** (alta resolução).

Nº Mistura de Primer	Tamanho aproximado do produto PCR específico (pb)	Tamanho da banda controlo (pb)	Especificidades Alélicas
1	220	515	DQB1*06011-06013
2	210	430	DQB1*06011-06013, 0602, 06052, 0606, 0610, 06111, 06112, 0613, 0616
3	185	430	DQB1*0602, 0614, 0615, 0616
4	130	430	DQB1*0603, 0607, 06112, 0614
5	160	430	DQB1*0603, 06042, 0607, 0608, 06111, 06112
6	170	515	DQB1*0603, 0608, 06112, 0612, 0614
7	170, 210	515	DQB1*0603, 06041, 06042, 0607, 0608, 0614, 0617
8	170	430	DQB1*06041-0607, 0609
9	130	430	DQB1*06041, 06042, 06051, 0606, 0608, 0609, 0612, 0617
10	210	515	DQB1*06051, 06052, 0606
11	210	430	DQB1*06051, 06052, 0606, 0609, 0612, 0615
12	175	430	DQB1*0606, 0617
13	185	430	DQB1*0610
14	185	430	DQB1*0613
15	95	430	DQB1*0614
16	195	430	DQB1*0616

Tabela III-9. Pares de primers e especificidades dos produtos PCR das 24 misturas de primers utilizadas para a tipagem DRB1 (baixa resolução).

Nº Mistura de Primer	Primer Sense - P5'	Sequência P5'	Primer Anti-sense P3'	Sequência P3'	Controlo Interno		Tamanho produto PCR (pb)	Especificidades Alélicas
					Primer Sense	Primer Anti-sense		
1	501	ttg tgg cag ctt aag ttt gaa t	3047 3048	ctg cac tgt gaa gct ctc ac ctg cac tgt gaa gct ctc ca	Camp A Camp B	Camp B DRB1*01	255	DRB1*01
2	501	ttg tgg cag ctt aag ttt gaa t	315	ccg cct ctg ctc cag gag	Camp A	Camp B DRB1*0101/2/4	195	DRB1*0101/2/4
3	501	ttg tgg cag ctt aag ttt gaa t	310	ccc gct cgt ctt cca gga t	Camp A	Camp B DRB1*0103	196	DRB1*0103
4	502	tcg tgt ggc agc cta aga g	301	ccg cgc ctg ctc cag gat	Camp A	Camp B DRB1*1501-3,1505-7	197	DRB1*1501-3,1505-7
5	502	tcg tgt ggc agc cta aga g	302	agg tgt cca ccg cgg cg	Camp A	Camp B DRB1*1601,16021,1603,1605-8	213	DRB1*1601,16021,1603,1605-8
6	503	tac ttc cat aac cag gag gag a	303	tgc agt agt tgt cca ccc g	Camp A	Camp B DRB1*0301-3,0305-8,1608	151	DRB1*0301-3,0305-8,1608
7	506	gac gga ggc ggt ggc gta	3048	ctg cac tgt gaa gct ctc ca	Camp A	Camp B DRB1*0301/4/6/8	217	DRB1*0301/4/6/8
8	503	tac ttc cat aac cag gag gag a	3047	ctg cac tgt gaa gct ctc ac	Camp A	Camp B DRB1*0302/5,1109/20,1302/5/26,1402-3/9/13/19/24	189	DRB1*0302/5,1109/20,1302/5/26,1402-3/9/13/19/24
9	504	ggt tet tgg agc agg tta aac a	3047 3048	ctg cac tgt gaa gct ctc ac ctg cac tgt gaa gct ctc ca	Camp A Camp B	Camp B DRB1*04,1122,1410	260	DRB1*04,1122,1410
10	507	cct gfg gca ggg taa gta ta	3079	ccc gta gtt gfg tct gca cac	Camp A	Camp B DRB1*0701	232	DRB1*0701
11	508	agt act cta cgg gfg agt gtt	3045 318	tgt tcc agt act cgg cgc t gct gtt cca gta ctc ggc at	Camp A Camp B	Camp B DRB1*08,1317	161, 163	DRB1*08,1317
12	509	ggt tct tga agc agg ata agt tt	3079	ccc gta gtt gfg tct gca cac	Camp A	Camp B DRB1*0901	236	DRB1*0901
13	510	cgg ttg ctg gaa aga cgc g	3047	ctg cac tgt gaa gct ctc ac	Camp A	Camp B DRB1*1001	204	DRB1*1001
14	505	ggt tct tgg agt act cta cgt c	306	ctg gct gtt cca gta ctc ct	Camp A	Camp B DRB1*1101-4,1106-22	176	DRB1*1101-4,1106-22
15	508	agt act cta cgg gfg agt gtt	308	cac tgt gaa gct ctc cac ag	Camp A	Camp B DRB1*1201-2,1204	248	DRB1*1201-2,1204
16	503	tac ttc cat aac cag gag gag a	310	ccc gct cgt ctt cca gga t	Camp A	Camp B DRB1*1116/20,1301-2,1306,1309-10,1315-16,1327,1424	130	DRB1*1116/20,1301-2,1306,1309-10,1315-16,1327,1424
17	505	ggt tet tgg agt act cta cgt c	3045	tgt tcc agt act cgg cgc t	Camp A	Camp B DRB1*1303-4,1312,1321,1413	171	DRB1*1303-4,1312,1321,1413
18	503	tac ttc cat aac cag gag gag a	317	ccc gcc tgt ctt cca gga a	Camp A	Camp B DRB1*1305,1318,1326	130	DRB1*1305,1318,1326
19	505	ggt tct tgg agt act cta cgt c	311	tct gca ata ggt gtc cac ct	Camp A	Camp B DRB1*1117,1401,1404-5,1407-8,1411/14/18/23	224, 215	DRB1*1117,1401,1404-5,1407-8,1411/14/18/23
20	508	agt act cta cgg gfg agt gtt						
20	503	tac ttc cat aac cag gag gag a	312	tcc acc gcg gcc cgc c	Camp A	Camp B DRB1*1109,1305/6/26,1402/6/9/13/17	140	DRB1*1109,1305/6/26,1402/6/9/13/17
21	504	ggt tct tgg agc agg tta aac a	319	ctg ttc cag tgc tcc gca g	Camp A	Camp B DRB1*1410	172	DRB1*1410

22	551	gtt tct tgc agc agg ata agt a	301	ccg egc ctg ctc cag gat	Camp A	Camp B	200, 207	DRB5 (2-15,16)
			316	ccg egg cgc gcc tgt ct				
23	552,1	ttt ctt gga gct gcg taa gtc	313	ctg ttc cag gac tog gcg a	Camp A	Camp B	171, 173	DRB3 (3-17,18 ; 5-11,12; 6-13,14)
	552,2	gtt tct tgg agc tgc tta agt c	314	gct gtt cca gta ctc ggc at				
24	553	gag cga gfg tgg aac ctg a	3048	ctg cac tgt gaa gct ctc ca	Camp A	Camp B	213	DRB4 (4,7,9)

IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Tipagem Genética HLA Classe II (DQA1, DQB1 e DRB1)

Para a análise dos *loci* HLA classe II- DQA1, DQB1 e DRB1, foram investigados 52 pacientes: 19 com narcolepsia e nataplexia (NC) ; 4 com narcolepsia sem cataplexia (N); 9 com hipersónia idiopática (HIP) e 20 com outras patologias de sono (OPS). Neste último grupo incluíram-se indivíduos sem critérios conclusivos de narcolepsia ou hipersónia idiopática.

Como população controlo, para o estudo dos alelos HLA, foi utilizado um conjunto de indivíduos saudáveis (216 para o HLA-DQA1, 220 para o HLA-DQB1 e 240 para o HLA-DRB1) ⁶⁰.

4.1.1. Exemplos da tipagem genética HLA Classe II

Para todos os indivíduos estudados, a identificação dos alelos HLA classe II (DQA1, DQB1 e DRB1) foi efectuada por amplificação do DNA genómico por PCR-SSP. Os exemplos de genotipagem que irão ser apresentados a seguir são as fotografias dos géis tiradas após a corrida electroforética.

4.1.1.1. Locus HLA-DQA1

Na figura IV-1 encontra-se representada uma fotografia de um gel de agarose corado com brometo de etídio como o resultado da amplificação por PCR-SSP, para um dos doentes (nº registo:01 175). A genotipagem deste indivíduo foi realizada com o auxílio da tabela III-6 referida no capítulo “Material e Métodos”.

Consideraram-se amplificações específicas, na interpretação dos géis, somente aquelas que apresentaram bandas de peso molecular correspondentes ao produto amplificado específico, para além da banda controlo interno (ci).

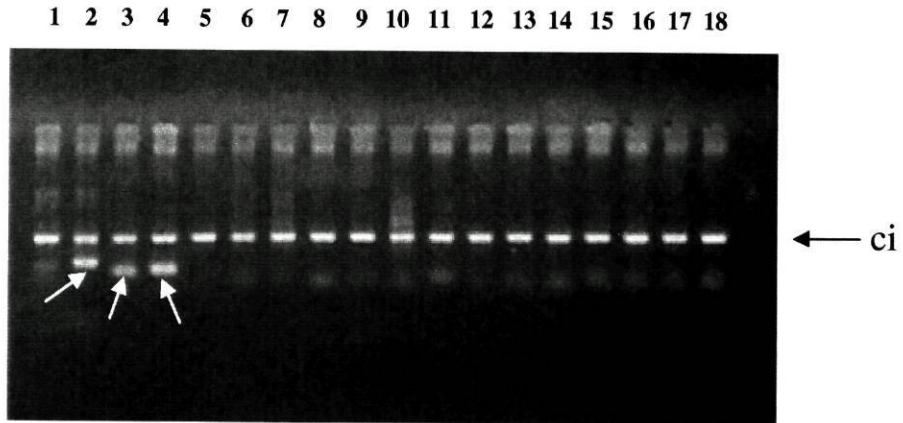


Figura IV-1. Exemplo da tipagem genética para o *locus* HLA-DQA1 por PCR-SSP. A direcção de migração electroforética é de cima para baixa. As misturas, numeradas de 1 a 18 (tabela III-6) foram colocadas no gel por essa ordem. A banda controlo interno (ci) possui 492 pb. As setas indicam bandas específicas.

A figura IV-1 representa um gel contendo os produtos de amplificação do *locus* HLA-DQA1. Como se pode confirmar na tabela III-6 (página 41 “Material e Métodos”) a amplificação das misturas 2, 3 e 4 originam, respectivamente, bandas de 175 pb, 100 pb e 110 pb. A mistura 2 permite a amplificação dos alelos HLA-DQA1*0101-01022, 0104-0106. A mistura 3 é específica para os alelos HLA-DQA1*01021-0103, 0201. A amplificação específica da mistura de *primers* 4, indica a presença do alelo HLA-DQA1*0103. Como na mistura 1 (banda de 150 pb e específica para os alelos 0101, 0104 e 0105) apenas foi visualizada a banda controlo interno (ci), os alelos 0101 e 0104 presentes na mistura 2 foram excluídos. A mistura 7 (120 pb) também contém apenas a banda ci podendo, assim, discriminar-se o alelo 0106. Deste modo, um dos alelos identificado neste indivíduo é o 0102, confirmado pela presença deste alelo também na mistura 3. Na mistura 8 (125 pb) também não ocorreu amplificação do produto PCR específico, o que leva a excluir o alelo 0201 da mistura 3. O outro alelo é definido pela banda de 110 pb da mistura 4 que é específica para o alelo 0103. A amplificação da mistura 3 permite confirmar também este alelo. Assim, neste *locus*, o genótipo para o doente 01 175 é HLA-DQA1*0102, 0103.

4.1.1.2. Locus HLA-DQB1

A figura IV-2 ilustra a tipagem do *locus* HLA-DQB1 para um dos doentes estudados (nº registo 01 175). A identificação dos alelos foi realizada recorrendo à tabela III-7 (pág. 42 “Material e Métodos”).

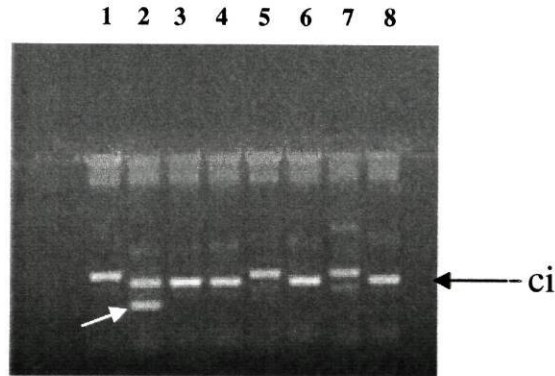


Figura IV-2. Exemplo da tipagem genética para o *locus* HLA-DQB1 por PCR-SSP. A direcção de migração electroforética é de cima para baixa. As misturas, numeradas de 1 a 8 (tabela III-7) foram colocadas no gel por essa ordem. A banda controlo interno (ci) é de 430 pb para as misturas de *primers* 2, 3, 4, 6 e 8 e 515 pb para as misturas 1,5 e 7. A seta indica uma banda específica.

A observação da figura IV-2 permite visualizar uma única banda específica na mistura 2, que contém o produto de amplificação de 220 pb específico dos alelos HLA-DQB1*06011-0617. Deste modo, o doente 01 175 expressa apenas um alelo para o *locus* DQB1, o alelo HLA-DQB1*06.

A identificação de apenas um alelo na tipagem genética HLA por PCR-SSP pode dever-se às seguintes situações:

- o indivíduo é homozigótico para o único alelo encontrado;
- O conjunto de *primers* utilizado não discrimina o alelo presente no indivíduo que se está a estudar;
- O indivíduo possui um alelo que ainda não foi descrito;
- O indivíduo apresenta um alelo nulo.

De todas estas hipóteses referidas anteriormente, a mais provável é a homozigotia, contudo, como não é possível confirmá-lo pela ausência de estudos em

famílias, teremos de assumir todas as possibilidades. Deste modo, a tipagem genética a considerar para este indivíduo (01 175) é HLA-DQB1*06,X.

4.1.1.2.1. Exemplo de tipagem genética HLA-DQB1*06 de alta resolução (subtipos HLA-DQB1*06)

Quando um indivíduo possui um alelo HLA-DQB1*06, é sempre necessário identificar os subtipos do grupo HLA-DQB1*06, já que são conhecidos, para este gene, subtipos que se sabe estarem associados à patologia de sono. Deste modo, a genotipagem HLA-DQB1*06 foi realizada para o doente 01 175 (figura IV-3), assim como para todos os doentes HLA-DQB1*06 positivos.

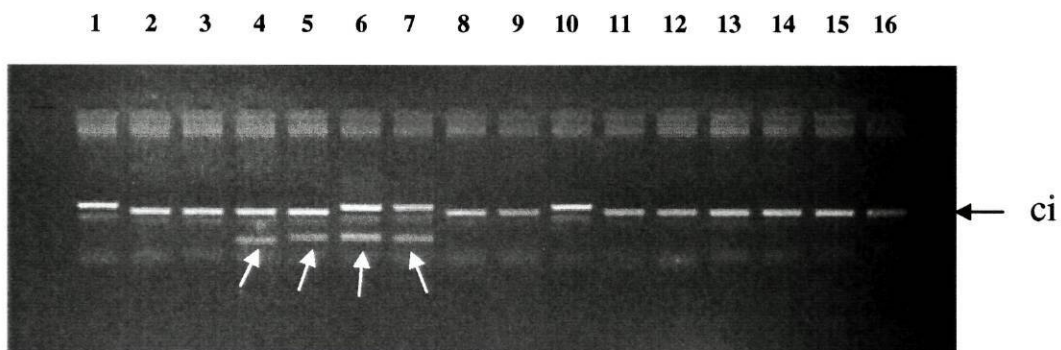


Figura IV-3. Exemplo da tipagem genética para o *locus* HLA-DQB1*06 de alta-resolução e por PCR-SSP. A direcção de migração electroforética é de cima para baixa. As misturas, numeradas de 1 a 16 (tabela III-8) foram colocadas no gel por essa ordem. A banda controlo interno (ci) possui 430 pb para as misturas de *primers* 2, 3, 4, 5 8, 9, 11, 12-16 e 515 pb para as misturas 1, 6, 7 e 10. As setas indicam bandas específicas.

Por análise da figura IV-3 visualiza-se a amplificação das misturas 4,5,6 e 7 (bandas de 130, 160, 170 e 170/210 pb, respectivamente) (tabela III-8). A mistura 4 amplifica os alelos HLA-DQB1*0603, 0607, 06112 e 0614. A mistura 5 é específica para os alelos 0603, 06042, 0607, 0608, 061111 e 06112. A mistura 6 possui produtos de amplificação comuns aos alelos 0603, 0608, 06112, 0612 e 0614. A mistura 7 amplifica especificamente os alelos 0603, 06041, 06042, 0607, 0608, 0614 e 0617. Os alelos 0607 (mistura 8); 0608, 06041, 06042 e 0612 (mistura 9); 06111 e 06112 (mistura 2); 0614 (mistura 15) e 0617 (mistura 9,12), foram excluídos devido a estas

misturas terem apresentado apenas a banda ci. Depois desta análise, conclui-se que o alelo identificado é o HLA-DQB1*0603. Assim, o subtipo HLA-DQB1*06 presente neste doente (01 175) é HLA-DQB1*0603 e a genotipagem para o *locus* B é HLA-DQB1*0603,X.

4.1.1.3. Locus HLA-DRB1

A figura IV-4 representa um gel contendo os produtos de amplificação do *locus* HLA-DRB1, para um dos indivíduos tipados (01 115)

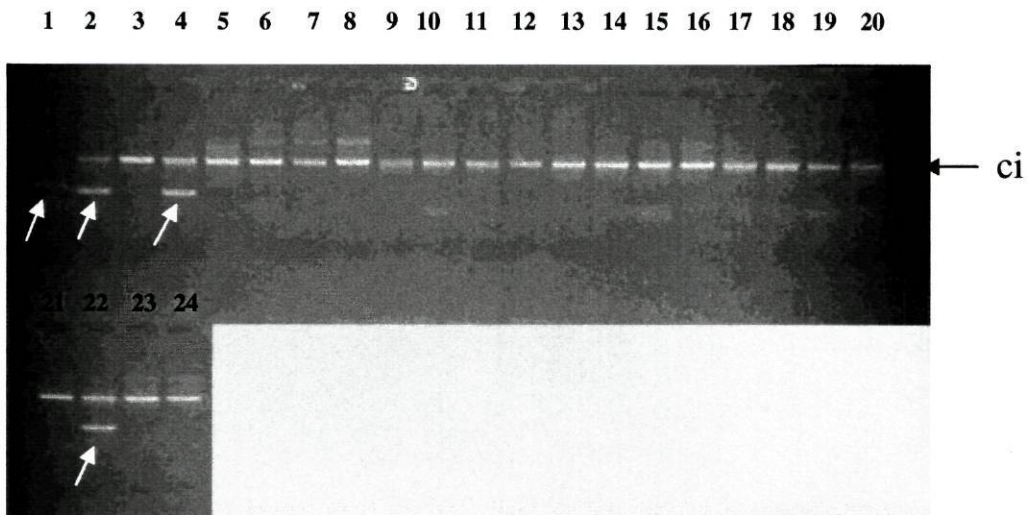


Figura IV-4. Exemplo da tipagem genética para o *locus* HLA-DRB1 por PCR-SSP. A direcção de migração electroforética é de cima para baixo. As misturas, numeradas de 1 a 24 (tabela III-9) foram colocadas no gel por essa ordem. A banda controlo interno (ci) possui 796 pb. As setas indicam bandas específicas.

A tabela III-9 (página 43 “Material e Métodos”) permite confirmar que a amplificação da mistura 1, originando a banda de 255 pb (figura IV-4), indica a presença do alelo HLA-DRB1*01. Do mesmo modo, a mistura 2 (banda de 195 pb), que também amplificou, identifica os alelos 0101/2/4. A resolução dada por este conjunto de *primers* não permitiu a discriminação do alelo 01. O outro alelo é definido pela banda de 197 pb da mistura 4 que apresenta especificidade para os alelos 1501-3, 1505-7. A amplificação do gene DRB5 (mistura 22, banda de ~200 pb) permitiu

confirmar a presença do alelo 15. Neste caso a genotipagem do doente será HLA-DRB1*01,15.

No tratamento dos resultados o alelo HLA-DRB1*15 foi considerado como HLA-DRB1*1501, uma vez que este alelo foi identificado pelo grupo do Prof. *E. Mignot* de Stanford University, Center for Narcolepsy, Department of Psychiatry and Behavioral Sciences, Palo Alto, CA, USA.

4.1.2. Frequências Fenotípicas obtidas para cada *locus* HLA

4.1.2.1. *Locus HLA-DQA1*

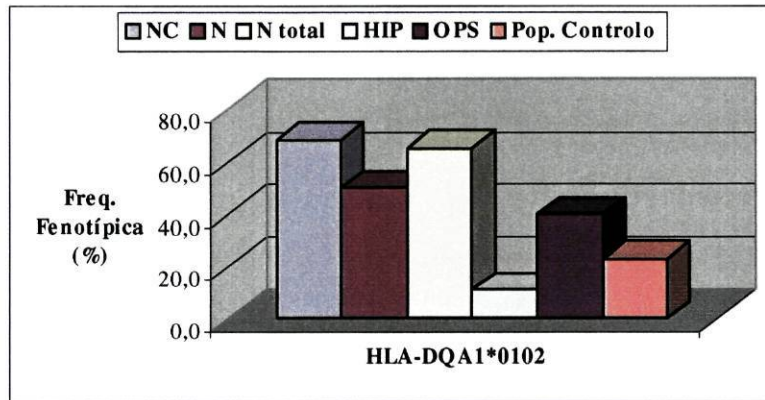
As frequências fenotípicas obtidas para os grupos de doentes e população controle para o *locus* HLA-DQA1 encontram-se descritas na tabela IV-1.

Tabela IV-1. Frequências fenotípicas obtidas para o *locus* DQA1 nos grupos de doentes e população controle.

Alelo	NC (N=19)		N (N=4)		N total (N=23)		HIP (N=9)		OPS (N=20)		Pop. Controle (N= 216)	
	N	Freq. (%)	N	Freq. (%)	N	Freq. (%)	N	Freq. (%)	N	Freq. (%)	N	Freq. (%)
HLA-DQA1*01	15	78,9	2	50,0	17	73,9	4	44,4	16	80,0	160	74,1
HLA-DQA1*0101	4	21,1	0	0,0	4	17,4	2	22,2	3	15,0	69	31,9
HLA-DQA1*0102	13	68,4	2	50,0	15	65,2	1	11,1	8	40,0	50	23,1
HLA-DQA1*0103	0	0,0	0	0,0	0	0,0	1	11,1	5	25,0	41	19,0
HLA-DQA1*0104	1	5,3	0	0,0	1	4,3	2	22,2	2	10,0	0	0,0
HLA-DQA1*0105	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	2	10,0	0	0,0
HLA-DQA1*02	5	26,3	1	25,0	6	26,1	0	0,0	3	15,0	66	30,6
HLA-DQA1*03	4	21,1	1	25,0	5	21,7	2	22,2	5	25,0	63	29,2
HLA-DQA1*04	3	15,8	0	0,0	3	13,0	1	11,1	0	0,0	8	3,7
HLA-DQA1*05	6	31,6	4	100,0	10	43,5	6	66,7	8	40,0	90	41,7
HLA-DQA1*06	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	4	1,9
HLA-DQA1*X	1	5,3	0	0,0	1	4,3	2	22,2	1	5,0	0	0,0

[†] NC = narcolepsia com cataplexia; N = narcolepsia sem cataplexia; N total = narcolepsia total (NC+N); HIP = hipersónia idiopática; OPS = outras patologias de sono; Pop. Controle = População controle; N = nº indivíduos que apresentam o alelo; Freq. Fenotípica (%) = Frequência fenotípica (em percentagem).

De seguida serão representadas graficamente, para o alelo HLA-DQA1*0102, as frequências fenotípicas obtidas para os grupos de doentes e população controlo. No gráfico IV.1 pode observar-se também os valores do Teste Exacto Fischer (p) (quando significativo) e *Odds Ratio* (**OR**).



$p < 0,0001$ **OR**=7,193 NC

$p < 0,0001$ **OR**=6,225 N total

Gráfico IV-1. Representação gráfica das frequências fenotípicas para o alelo HLA-DQA1*0102, nos grupos de doentes e população controlo.

4.1.2.1.1. Comparação da frequência fenotípica dos alelos do locus HLA-DQA1 entre doentes e população controlo

Da análise da tabela IV-1 referente ao locus HLA-DQA1, verificou-se ao comparar o grupo de doentes N total com a população controlo, o aumento da frequência dos alelos HLA-DQA1 *0102, *0104 e *04 no grupo N total. Por outro lado, a frequência dos alelos DQA1*0101 (17,4% vs. 31,9% Pop. Controlo), *02 (26,1% vs. 30,6% Pop. Controlo) e *03 (21,7% vs. 29,2% Pop. Controlo) estava diminuída nos doentes do grupo N total. Os alelos DQA1*0103 e *06 não foram identificados nos pacientes com narcolepsia. O alelo DQA1*0102 foi o mais representado em relação à população controlo (65,2% vs. 23,1% Pop. Controlo, $p < 0,0001$ e **OR**=6,225) (gráfico IV-1 e tabela VII-17 Anexos). Quando se considerou os subgrupos NC e N, e se comparou com o grupo controlo, verificou-se que o grupo NC apresentou uma frequência aumentada para os alelos DQA1*01, *0102, *0104 e *04 e diminuída para

os alelos DQA1 *0101, *02, *03 e o *05. Da mesma forma que para o grupo N total, observou-se um aumento da frequência do alelo HLA-DQA1*0102 no grupo NC (68,4% vs. 23,1% Pop. Controlo) e no grupo N (50,0% vs. 23,1% Pop. Controlo), no primeiro caso o resultado é estatisticamente significativo ($p < 0,0001$ e $OR=7,193$). A frequência do alelo DQA1*04 (15,8% vs. 3,7% Pop. Controlo, $p=0,049$ e $OR=4,875$) apresentou também um aumento próximo da significância, no grupo NC (tabela VII-21 Anexos). No grupo de doentes com narcolepsia mas sem cataplexia associada (N) observou-se um aumento do alelo DQA1*05 (100,0% vs. 41,7% Pop. Controlo, $p=0,032$) (tabela VII-25 Anexos).

Ao efectuar a comparação entre doentes com hipersónia idiopática (HIP) e população controlo, verificou-se que a frequência dos alelos HLA-DQA1*0104, *04 e *05 estava aumentada. A frequência dos alelos DQA1*01, *0101-0103 e *03 estava diminuída, embora não significativamente no grupo HIP (tabela VII-29 Anexos). Apenas o alelo DQA1*0104 (22,2% vs. 0,0% Pop. Controlo; $p=0,001$) apresentou uma diminuição estatisticamente significativa, embora a sua ausência na população controlo limite a análise estatística (tabela VII-29 Anexos).

A comparação da frequência dos alelos HLA-DQA1 entre o grupo OPS e população controlo, permitiu observar um aumento da frequência dos alelos DQA1*01, *0102, *0103, *0104 e *0105 no grupo OPS (tabela VII-33 Anexos). Embora, sem significado estatístico o aumento mais representativo foi o do alelo HLA-DQA1*0102 (gráfico IV-1) (40,0% vs. 23,1% Pop. Controlo). A frequência dos alelos DQA1*0101, *02 e *03 estava diminuída no primeiro grupo, mas essa diminuição não foi significativa (tabela VII-33 Anexos).

4.1.2.1.2. Comparação da frequência fenotípica dos alelos do locus HLA-DQA1 entre os vários grupos de doentes

Relativamente à análise entre os grupos NC e N, o alelo DQA1*0102, embora aumentado no primeiro grupo, os valores encontrados para a sua frequência não foram estatisticamente significativos (68,4% vs. 50,0% N). Pelo contrário, a frequência do alelo DQA1*05 estava significativamente diminuída no grupo NC (31,6 vs. 100,0% N, $p=0,024$), apresentando todos os doentes N este alelo (tabela VII-1 Anexos).

A comparação entre os grupos N total e HIP, permitiu observar que o alelo DQA1 *0102 apresentou um aumento significativo na sua frequência fenotípica no grupo N total (65,2% vs. 11,1% HIP, $p=0,015$ e $OR=15,000$) (tabela VII-5 Anexos).

Ao estabelecermos comparação entre os grupos N total e OPS, verificou-se que a frequência do alelo DQA1*0102 estava aumentada no primeiro grupo (65,2% vs. 40% OPS), embora não de uma forma significativa (tabela VII-9 Anexos).

Analisando os grupos HIP e OPS, observou-se que a frequência dos alelos DQA1*01 (44,4% vs. 80,0% OPS) e DQA1*0102 (11,1% vs. 40,0% OPS) estava diminuída no grupo HIP e que a frequência do alelo DQA1*05 estava aumentada (66,7% vs. 40% OPS). Em nenhuma das situações esses aumentos ou diminuições foram significativos (tabela VII-13 Anexos).

Os resultados apresentados permitem concluir que a frequência do alelo DQA1 *0102 está aumentada significativamente nos grupos doentes N total e NC, o que não acontece nos indivíduos com hipersónia, nos quais a frequência deste alelo está diminuída relativamente à população controlo e no grupo OPS em que está aumentada, mas em nenhum dos casos de forma significativa. Assim, conclui-se que o alelo DQA1*0102 se encontra associado à narcolepsia com cataplexia (NC), o que está de acordo com outros resultados obtidos anteriormente, por Mignot *et al.*, em que este alelo estava representado em todos os doentes japoneses, 95% de caucasianos 70% de afro-americanos^{10,27,30}. Actualmente é considerado como um dos gene de susceptibilidade para a narcolepsia^{10,27,30}, ou seja, indivíduos com este alelo são mais susceptíveis ao desenvolvimento desta patologia do que aqueles que o não possuem. Estudos portugueses realizados anteriormente identificaram também o alelo DQA1*0102 como estando associado à narcolepsia com cataplexia^{29,31,32,33,34}. O facto da frequência do alelo DQA1*05 estar significativamente diminuída no grupo NC quando comparado com o grupo N (todos os narcolépticos sem cataplexia são DQA1*05), poderá sugerir que este alelo confira protecção contra a cataplexia, mas esta hipótese só poderá ser confirmada com estudos mais alargados.

4.1.2.2. *Locus HLA-DQB1*

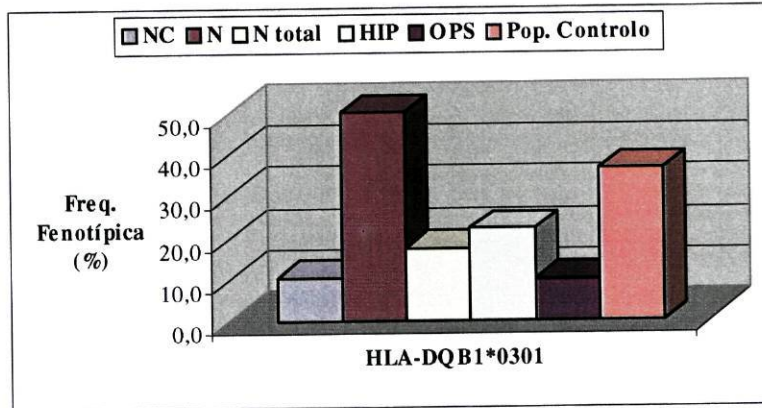
Na tabela IV-2 encontram-se as frequências fenotípicas obtidas para os grupos de doentes e população controlo para o *locus* HLA-DQB1.

Tabela IV-2. Frequências fenotípicas obtidas para o *locus* DQB1, nos grupos de doentes e população controlo ¹.

Alelo	NC (N=19)		N (N=4)		N total (N=23)		HIP (N=9)		OPS (N=20)		Pop. Controlo (N= 220)	
	N	Freq. (%)	N	Freq. (%)	N	Freq. (%)	N	Freq. (%)	N	Freq. (%)	N	Freq. (%)
HLA-DQB1*02	6	31,6	2	50,0	8	34,8	3	33,3	5	25,0	98	44,5
HLA-DQB1*03	6	31,6	4	100,0	10	43,5	3	33,3	10	50,0	131	59,5
HLA-DQB1*0301	2	10,5	2	50,0	4	17,4	2	22,2	2	10,0	80	36,4
HLA-DQB1*0302	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	37	16,8
HLA-DQB1*0303	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	13	5,9
HLA-DQB1*0304	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	1	0,5
HLA-DQB1*04	3	15,8	0	0,0	3	13,0	0	0,0	1	5,0	10	4,5
HLA-DQB1*05	5	26,3	0	0,0	5	21,7	4	44,4	8	40,0	86	39,1
HLA-DQB1*06	15	78,9	2	50,0	17	73,9	4	44,4	11	55,0	81	36,8
HLA-DQB1*0601	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	4	1,8
HLA-DQB1*0602	13	68,4	2	50,0	15	65,2	2	22,2	3	15,0	26	11,8
HLA-DQB1*0603	2	10,5	0	0,0	2	8,7	3	33,3	5	25,0	38	17,3
HLA-DQB1*0604	1	5,3	0	0,0	1	4,3	0	0,0	2	10,0	11	5,0
HLA-DQB1*0605	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	1	5,0	2	0,9
HLA-DQB1*X	1	5,3	0	0,0	1	4,3	2	22,2	5	25,0	0	0,0

Ver rodapé tabela IV-1.

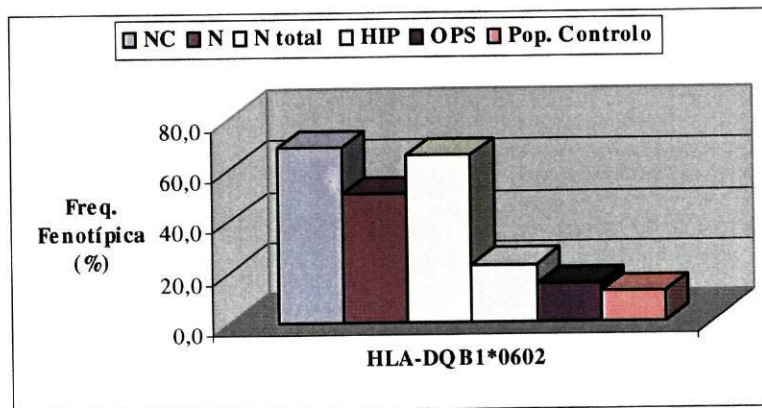
No gráfico IV-2 e IV-3 estão representadas as frequências fenotípicas para os alelos HLA-DQB1*0301 e DQB1*0602 em todos os grupos de doentes e população controlo, assim como os valores do Teste Exacto de Fischer (p) (quando significativo) e *Odds Ratio* (OR).



$p=0,023$ OR=0,206 NC

$p=0,024$ OR=0,194 OPS

Gráfico IV-2. Representação gráfica das frequências fenotípicas para o alelo HLA-DQB1*0301, nos grupos de doentes e população controle.



$p<0,0001$ OR=16,167 NC

$p<0,0001$ OR=13,990 N total

Gráfico IV-3. Representação gráfica das frequências fenotípicas para o alelo HLA-DQB1*0602, nos grupos de doentes e população controle.

4.1.2.2.1. Comparação da frequência fenotípica dos alelos do locus HLA-DQB1 entre doentes e população controle

Analisando a tabela IV-2 e comparando o grupo de doentes N total com a população controle, verificou-se um aumento da frequência dos alelos HLA-DQB1*04, *06 e 0602 e uma diminuição da frequência dos alelos HLA-DQB1*02, *03, *0301, *05 e *0603. Dentro do tipo HLA-DQB1*03, o único alelo representado nos doentes é o 0301 (gráfico IV-2). De todos os alelos referidos, os que apresentaram diferenças estatisticamente significativas no valor da frequência fenotípica foram apenas o HLA-DQB1*06 (73,9% vs. 36,8% Pop. Controle, $p=0,001$ e $OR=4,862$) e quando subtipamos, o HLA-DQB1*0602 (65,2% vs. 11,8% Pop. Controle, $p<0,0001$ e $OR=13,990$) (tabela VII-18 Anexos e gráfico IV-3).

Estabelecendo a comparação entre narcolepsia com cataplexia (NC) e população controle, observou-se um aumento do valor da frequência fenotípica para os alelos HLA-DQB1*04, *06 e *0602 e uma diminuição para os alelos DQB1*02, *03, *0301, *05 e *0603. Apenas a frequência do alelo DQB1 *06 (78,9% vs. 36,8% Pop. Controle, $p<0,0001$ e $OR=6,435$) e do seu subtipo DQB1*0602 (68,4% vs. 11,8% Pop. Controle, $p<0,0001$ e $OR=16,167$) (gráfico IV-3) mostrou um aumento estatisticamente significativo no grupo NC (tabela VII-22 Anexos). Dos alelos cuja frequência estava diminuída, apenas para os alelos DQB1*03 (31,6% vs. 59,5% Pop. Controle, $p=0,028$ e $OR=0,314$) e DQB1*0301 (10,5% vs. 36,4% Pop. Controle, $p=0,023$ e $OR=0,206$) (gráfico IV-2) os valores encontrados foram significativos (tabela VII-22 Anexos).

De realçar que, dos quatro doentes com narcolepsia sem cataplexia (N) todos possuem no seu fenótipo o alelo HLA-DQB1*03 (100,0% vs. 59,5% Pop. Controle) (tabela VII-26 Anexos).

Da comparação entre HIP e Pop. Controle, verificou-se que a frequência dos alelos HLA-DQB1*02, *03 e *0301 (gráfico IV-2) estava diminuída e que a dos alelos HLA-DQB1 *05, *06, *0602 e *0603 estava aumentada. Em nenhum dos casos esses aumentos ou diminuições foram significativas (tabela VII-30 Anexos).

Relativamente ao grupo das outras patologias de sono (OPS), quando comparado com a população controle, verificou-se que a frequência do alelo HLA-DQB1*06 e dos subtipos *0602, *0603, *0604 e *0605 estava aumentada nos doentes com OPS. Em contrapartida, a frequência dos alelos HLA-DQB1 *02, *03 e *0301 encontrou-se

diminuída no primeiro grupo. De todos os alelos referidos anteriormente, apenas o HLA-DQB1 *0301 apresentou uma diminuição estatisticamente significativa na sua frequência fenotípica (10,0% vs. 36,4% Pop. Controlo, $p=0,024$ e $OR=0,194$) (gráfico IV-2 e tabela VII-34 Anexos). De referir que a frequência deste alelo também estava diminuída no grupo N total e HIP, embora não de forma significativa.

4.1.2.2.2. Comparação da frequência fenotípica dos alelos do locus HLA-DQB1 entre os vários grupos de doentes

Não se observaram diferenças estatisticamente significativas para o alelo HLA-DQB1 *0602, quando se compara a frequência do alelo deste alelo entre as populações NC e N (68,4% vs. 50,0% N (tabela VII-2 Anexos). Por outro lado, os alelos HLA-DQB1*03 e *0301 apresentaram as suas frequências diminuídas no grupo NC, sendo no primeiro caso uma diminuição significativa (31,6% vs. 100,0% N, $p=0,024$) (tabela VII-2 Anexos).

Relativamente à análise entre os grupos N total e HIP, verificou-se que a frequência do alelo HLA-DQB1 *0301 estava diminuída no grupo N total (17,4% vs. 22,2% HIP) e que a do alelo DQB1* 0602 estava aumentada no primeiro grupo mas não significativamente (65,2% vs. 22,2% HIP, $p=0,049$ e $OR=6,563$) (tabela VII-6 Anexos).

Comparando o grupo de doentes N total com o das OPS, observou-se que a frequência do alelo HLA-DQB1*0602 estava aumentada no primeiro grupo de doentes e o aumento observado foi estatisticamente significativo (65,2% vs. 15,0% Pop. Controlo, $p=0,002$ e $OR=10,625$) (tabela VII-10 Anexos).

Analisando comparativamente os grupos HIP e OPS, salientou-se a frequência do alelo HLA-DQB1*03, que se apresentou diminuída no primeiro grupo quando comparado com o segundo (33,3% vs. 50,0% OPS) e a dos alelos HLA-DQB1*0301 (22,2% vs. 10,0% OPS), HLA-DQB1*0602 (22,2% vs. 15,0% OPS) e HLA-DQB1*0603 (33,3% vs. 25,0 OPS) que estava aumentada nas hipersónias, mas em nenhum dos caso de forma significativa (tabela VII-14 Anexos).

Da análise dos resultados obtidos pode-se concluir que o alelo HLA-DQB1*0301 se encontra mais associado à hipersónia idiopática do que à narcolepsia ou a outras patologias de sono, o que está de acordo com estudos anteriores que também o associam à hipersónia e não à narcolepsia ²⁹. No entanto, estes dados contrariam os

obtidos por Mignot *et al.*, que associa o alelo DQB1*0301 à narcolepsia²³. O facto do alelo DQB1*03 estar significativamente diminuído no grupo NC (31,6% contra 100% N), quando comparado com o N, poderá sugerir que este alelo seja um alelo de protecção contra a cataplexia, mas como foram estudados poucos doentes sem cataplexia, nada se pode concluir a este respeito. Relativamente ao alelo HLA-DQB1*0602 podemos concluir que este alelo é um alelo de susceptibilidade para a narcolepsia (sobretudo em pacientes com cataplexia associada). Ou seja, pessoas com este alelo têm maiores probabilidades de vir a desenvolver a doença do que aquelas que não o apresentam. Estes dados estão de acordo com os obtidos por outros grupos de investigação, como por exemplo o de Mignot *et al.*, em que o alelo DQB1*0602 está bem documentado em doentes com NC, sendo considerado, para populações caucasoides e afro-americanas, melhor marcador para NC do que o alelo DRB1*1501^{24,75,76}. Posteriormente, o haplótipo DQB1*0602-DQA1*0102 foi encontrado em todos os doentes narcolépticos-catapléticos japoneses, em 95% dos caucasianos e 70% dos afro-americanos, sendo considerado actualmente o haplótipo de susceptibilidade para a narcolepsia^{10,22,27}. O alelo DQB1*0602 foi considerado, mais tarde, por Mignot *et al.*, o mais específico e informativo^{22,77,78}. Estudos preliminares em doentes portugueses apontam também para esta mesma associação^{29, 31,32,33,34}.

4.1.2.3. Locus HLA-DRB1

Na tabela IV-3 podem observar-se as frequências fenotípicas obtidas para os grupos de doentes e população controlo para o locus HLA-DRB1.

Tabela IV-3. Frequências fenotípicas obtidas para o locus DRB1, nos grupos de doentes e população controlo.

Alelo	NC (N=19)		N (N=4)		N total (N=23)		HIP (N=9)		OPS (N=20)		Pop. Controlo (N= 240)	
	N	Freq. (%)	N	Freq. (%)	N	Freq. (%)	N	Freq. (%)	N	Freq. (%)	N	Freq. (%)
HLA-DRB1*01	4	21,1	0	0,0	4	17,4	2	22,2	4	20,0	61	25,4
HLA-DRB1*03	2	10,5	1	25,0	3	13,0	3	33,3	2	10,0	49	20,4
HLA-DRB1*04	3	15,8	1	25,0	4	17,4	2	22,2	6	30,0	70	29,2
HLA-DRB1*07	5	26,3	1	25,0	6	26,1	0	0,0	3	15,0	72	30,0
HLA-DRB1*08	3	15,8	0	0,0	3	13,0	1	11,1	1	5,0	17	7,1
HLA-DRB1*09	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	4	1,7
HLA-DRB1*10	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	2	10,0	4	1,7
HLA-DRB1*11	2	10,5	3	75,0	5	21,7	2	22,2	6	30,0	45	18,8
HLA-DRB1*12	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	5	2,1
HLA-DRB1*13	3	15,8	0	0,0	3	13,0	2	22,2	8	40,0	57	23,8
HLA-DRB1*14	3	15,8	0	0,0	3	13,0	2	22,2	2	10,0	18	7,5
HLA-DRB1*1501	13	68,4	2	50,0	15	65,2	2	22,2	3	15,0	33	13,8
HLA-DRB1*16	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	1	5,0	14	5,8
HLA-DRB1*X	0	0,0	0	0,0	0	0,0	2	22,2	2	10,0	0	0,0

Ver rodapé tabela IV-1.

As frequências fenotípicas para os alelos HLA-DRB1*03 e DRB1*1501 estão representadas nos gráficos IV-4 e IV-5, onde se podem também observar os valores Teste Exacto de Fischer (p) (quando significativo) e *Odds Ratio* (OR), no segundo gráfico.

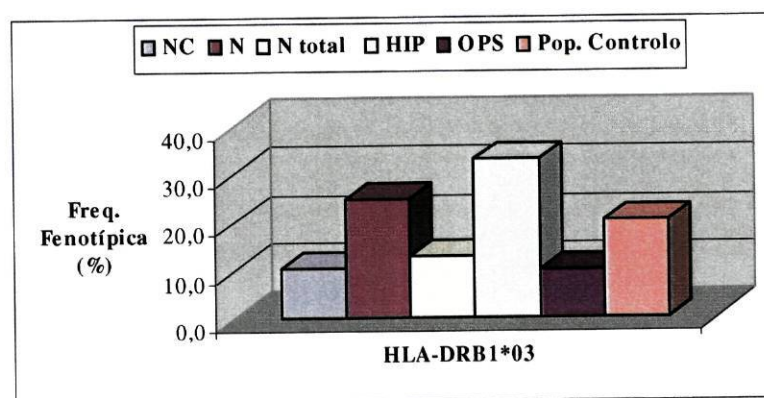
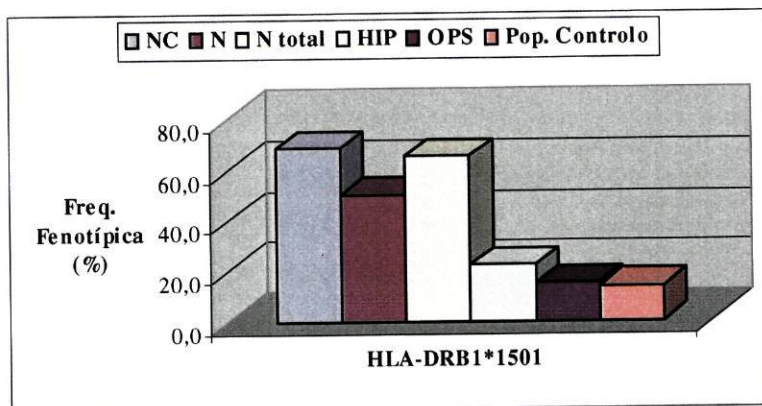


Gráfico IV-4. Representação gráfica das frequências fenotípicas para o alelo HLA-DRB1*03, nos grupos de doentes e população controlo.



$p < 0,0001$ OR=13,591 NC

$p < 0,0001$ OR=11,761 N total

Gráfico IV-5. Representação gráfica das frequências fenotípicas para o alelo HLA-DRB1*1501, nos grupos de doentes e população controle.

4.1.2.3.1. Comparação da frequência fenotípica dos alelos do locus HLA-DRB1 entre doentes e população controle

Analisando a tabela IV-3 e comparando o grupo de doentes N total com a população controle, verificou-se um aumento da frequência dos alelos HLA-DRB1*08, *11, *14 e *1501 e uma diminuição da frequência dos alelos HLA-DRB1*01, *03, *04, *07 e *13. De todos os alelos cuja frequência estava aumentada, apenas o HLA-DRB1*1501 (gráfico IV-5) apresentou um aumento estatisticamente significativo (65,2% vs. 13,8% Pop. Controle; $p < 0,0001$ e OR=11,761) (tabela VII-19 Anexos). O mesmo se verifica relativamente ao grupo NC e população controle, onde este alelo apareceu em 68,4% dos doentes e apenas 13,8% dos não doentes ($p < 0,0001$ e OR=13,591) (tabela VII-23 Anexos). Nos pacientes com narcolepsia sem cataplexia (N), há também o aumento da frequência deste alelo (50,0% vs. 13,8% Pop. Controle), mas não significativamente. Outro alelo onde se verificou um aumento na sua frequência fenotípica, foi o HLA-DRB1*11 (75,0% vs. 18,8% Pop. Controle; $p = 0,025$ e OR=13,000) (tabela VII-27 Anexos).

Relativamente à hipersónia idiopática (HIP) e população controle observou-se um aumento da frequência dos alelos HLA-DRB*03 (33,3% vs. 20,4% Pop. Controle)

(gráfico IV-4), *08 (11,1% vs. 7,1% Pop. Controle), *11 (22,2% vs. 18,8% Pop. Controle) *14 (22,2% vs. 7,5% Pop. Controle) e *1501 (22,2% vs. 13,8% Pop. Controle) (gráfico IV-5) (tabela VII-31 Anexos).

Considerando as outras patologias de sono (OPS) comparadas com a população controle, verificou-se que a frequência dos alelos HLA-DRB1*10, *11, *13, *14 e *1501 (gráfico IV-5) estava aumentada nos doentes com OPS. Em contrapartida, a frequência dos alelos HLA-DRB1*01, *03 (gráfico IV-4), *07 e *08 encontrou-se diminuída no primeiro grupo. De todos os alelos referidos anteriormente, salientam-se o DRB1 *11 (30,0% vs. 18,8% Pop. Controle) e *13 (40,0% vs. 23,8% Pop. Controle), cujas frequências embora aumentadas, não o estão de forma significativa (tabela VII-35 Anexos).

4.1.2.3.2. Comparação da frequência fenotípica dos alelos do locus HLA-DRB1 entre os vários grupos de doentes

Comparando NC com N salientou-se a frequências fenotípica dos alelos DRB1 *11 e *1501. A frequência do primeiro alelo encontrou-se diminuída na narcolepsia com cataplexia (10,5% vs. 75% N, $p=0,02$ e $OR=0,039$) e a do segundo aumentada (68,4% vs. 50% N) (tabela VII-3 Anexos).

Relativamente à análise entre os grupos N total e HIP, verificou-se que apenas a frequência do alelo HLA-DRB1*1501 estava aumentada (65,2% e 22,2% HIP), aumento esse próximo da significância ($p=0,049$ e $OR=6,563$) (tabela VII-7 Anexos). O mesmo acontece quando estabelecemos a comparação entre N total e OPS, onde só a frequência do alelo HLA-DRB1*1501 estava aumentada significativamente (65,2% vs. 15,0% OPS, $p=0,002$ e $OR=10,625$) (tabela VII-11 Anexos). Ao comparar HIP com OPS, verificou-se que as maiores diferenças surgiram para a frequência do alelo DRB1*03 (33,3% vs. 10,0% OPS) que estava mais aumentada no primeiro grupo, mas não significativamente. A frequência do alelo DRB1*1501 era superior no grupo HIP (22,2% vs. 15,0% OPS) (tabela VII-15 Anexos).

Da análise dos resultados anteriores pode-se concluir que a frequência do alelo HLA-DRB1*1501 está aumentada em todos os grupos de doentes com narcolepsia quando comparada com a população controle. Esse aumento foi estatisticamente significativo ($p<0,05$) nos grupos N total e NC, mas não no N, provavelmente devido

ao reduzido número de doentes estudado. O mesmo acontece nos grupos HIP e OPS, onde a frequência do alelo DRB1*1501 está apenas ligeiramente aumentada (22,2% HIP, 15,0% OPS vs. 13,8% Pop. Controlo). Assim, pode-se afirmar que existe uma associação entre este alelo e a narcolepsia, dado as diferenças observadas nas frequências fenotípicas deste alelo entre esta patologia e a população controlo. Assim, indivíduos que possuam o alelo DRB1*1501 estão mais susceptíveis ao desenvolvimento da doença do que os que não o apresentam. Estes resultados estão de acordo com trabalhos anteriormente realizados em Portugal, em que o alelo HLA-DRB1*1501 era mais representado nos narcolépticos (sobretudo nos pacientes com cataplexia associada)^{29,31,32,33,34}. Trabalhos efectuados noutras populações por Mignot *et al.* obtiveram os mesmos resultados^{10,22, 27,30}.

Para o alelo HLA-DRB1*03 houve o aumento nos grupos HIP e N, embora esse aumento fosse superior no primeiro destes grupos. Este aumento no grupo HIP está de acordo com estudos portugueses^{29,31,32,33,34}, em que o alelo DRB1*03 foi mais frequente nas hipersónias sem narcolepsia associada. A constatação de que a frequência do alelo HLA-DRB1*11 estava significativamente diminuída no grupo NC ($p=0,021$), quando comparado com doentes com narcolepsia sem cataplexia e o facto do OR ter dado inferior a 1 (OR=0,039), sugere que este alelo poderá ser um alelo protector. Assim, indivíduos que apresentem o alelo poderão ter menos probabilidades de vir a desenvolver cataplexia do que aqueles que não o possuem.

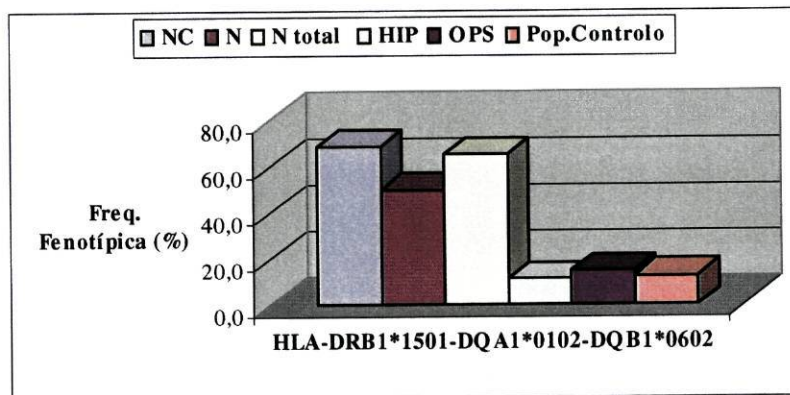
4.1.2.4. Análise do Haplótipo HLA-DRB1*1501-DQA1*0102-DQB1*0602

Na tabela IV-4 podem observar-se as frequências fenotípicas obtidas nos grupos de doentes e população controlo para o haplótipo HLA-DRB1*1501-DQA1*0102-DQB1*0602, assim como para os alelos que formam o haplótipo.

Tabela IV-4. Frequências fenotípicas de HLA-DRB1-DQA1-DQB1 em indivíduos com NC, N, N total, HIP, OPS e Pop. Controlo.

Alelo	NC (N=19)		N (N=4)		N total (N=23)		HIP(N=9)		OPS (N=20)		Pop.Controlo	
	N	Freq.(%)	N	Freq.(%)	N	Freq.(%)	N	Freq.(%)	N	Freq.(%)	N	Freq.(%)
DRB1*1501	13	68,4	2	50,0	15	65,2	2	22,2	3	15,0	33/240	13,8
DQA1*0102	13	68,4	2	50,0	15	65,2	1	11,1	8	40,0	50/216	23,1
DQB1*0602	13	68,4	2	50,0	15	65,2	2	22,2	3	15,0	26/220	11,8
Haplótipo	13	68,4	2	50,0	15	65,2	1	11,1	3	15,0	22/175	12,6

As frequências fenotípicas calculadas para o haplótipo em todos os grupos de doentes e população controlo podem ser visualizadas no gráfico IV-6. Os valores de **p** e **OR** estão registados, apenas, para os grupos em que existiram diferenças estatisticamente significativas nas frequências fenotípicas.



p< 0,0001 **OR**=15,068 NC

p< 0,0001 **OR**=13,040 N total

Gráfico IV-6. Representação gráfica das frequências fenotípicas para o haplótipo HLA-DRB1*1501-DQA1*0102-DQB1*0602 nos grupos de doentes e população controlo.

A observação da tabela IV-4 e gráfico IV-6, permitiu verificar que a frequência fenotípica do haplótipo HLA-DRB1*1501-DQA1*0102-DQB1*0602 apresentou um aumento estatisticamente significativo, quando comparada com a da população controlo, apenas nos grupos de doentes com N total (65,2% vs. 12,6% Pop. Controlo, **p**<0,0001 e **OR**=13,040) (tabelaVII-20 Anexos) e NC (68,4% vs. 12,6, Pop. Controlo, **p**<0,0001 e **OR**=15,068) (tabela VII-24 Anexos). Nos grupos HIP e OPS não se

observaram diferenças na frequência fenotípica deste haplótipo, quando comparada com a população controlo (tabelas VII-32 e 36 Anexos).

Entre os grupos NC e N, houve um aumento da frequência do haplótipo na narcolepsia com cataplexia, mas não de forma significativa (tabela VII-4 Anexos).

Quando se compara a frequência deste haplótipo nos grupos N total e HIP verificou-se que o haplótipo estava aumentado no primeiro grupo e que esse aumento foi significativo (65,2% vs. 11,1% HIP, $p=0,015$ e $OR=15,000$) (tabela VII-8 Anexos). O mesmo aconteceu ao comparar N total com OPS (65,2% vs. 15,0% OPS, $p=0,002$ e $OR=10,625$) (tabela VII-12 Anexos).

Estes resultados são concordantes com outros trabalhos realizados em Portugal^{29,31,32,33,34} e efectuados por Mignot *et al.*^{10,22,27,28,30}, nos quais o haplótipo HLA-DRB1*1501-DQA1*0102-DQB1*0602 estava associado à narcolepsia com cataplexia. Estes dados sugerem ainda que este haplótipo é importante para a distinção entre NC vs. HIP, considerando-se que estas duas entidades possuem características genéticas diferentes.

4.2. Análise do polimorfismo de tamanho de fragmentos de restrição no exão 6 do gene TNFR2 pela técnica de PCR-RFLP com enzima de restrição *Nla III*

A análise de um polimorfismo de tamanho de fragmentos de restrição no exão 6 do gene TNFR2 (196M/196R), por PCR-SSP, para detecção da substituição T→G foi efectuada em 32 doentes: 19 com narcolepsia e cataplexia (NC) ; 4 com narcolepsia sem cataplexia (N) e 9 com hipersónia idiopática (HIP). Utilizou-se uma população controlo de 44 indivíduos.

Na figura IV-5 está representado o resultado da separação electroforética dos fragmentos obtidos após a digestão do produto de amplificação do fragmento do gene TNFR2 com a enzima *Nla III*.

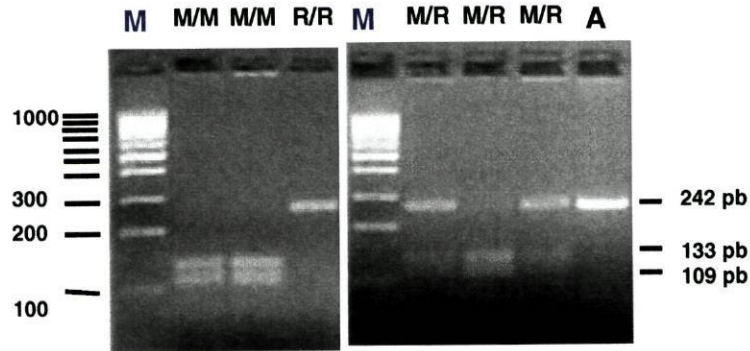


Figura IV-5. Detecção dos alelos 196M e 196R após digestão do produto amplificado com 4 U da Enzima *Nla III*. M - marcador de pesos moleculares 100 pb, A - produto amplificado = fragmento de 242 pb do exão 6 do gene TNFR2 resultante da amplificação do DNA genómico por PCR, (M) presença do local de restrição para *Nla III* (alelo196M), (R) ausência do local de restrição para *Nla III* (alelo 196R).

A presença de guanina (G) na posição 196 do gene TNFR2 origina um local de restrição, levando ao aparecimento de dois fragmentos mais pequenos (133 e 109 pb), formados a partir do produto amplificado original de 242 pb (figura IV-5). Ou seja, estamos na presença do alelo 196M, que contém o local de restrição para a enzima *Nla III*. Pelo contrário, quando o produto PCR amplificado não é clivado estamos perante o alelo 196R (alelo com timina (T) na posição 196 e ausência de local de restrição para a enzima *Nla III*). Deste modo, foram considerados homocigóticos para o não corte (presença de T) os indivíduos cujas amostras, depois de digeridas, apresentaram uma banda única de 242 pb. A intensidade desta banda é idêntica aquela obtida para o produto amplificado (genótipo R/R). Nas amostras de indivíduos homocigóticos para o local de corte (presença de G) apareceram, após digestão, duas bandas (133 pb e 109 pb) de menor intensidade (genótipo M/M). Para os doentes com genótipo M/R, isto é, heterocigóticos, para além destas duas bandas surgiu também uma terceira de 242 pb correspondente ao alelo R. Neste caso, estas três bandas apresentaram menor intensidade do que as duas do genótipo M/M.

4.2.1. Análise dos resultados

O cálculo do valor de p e OR mediante o uso do programa SPSS, para analisar existência de diferenças estatisticamente significativas nas frequências entre a população de doentes e população controlo foi efectuado apenas para os genótipos.

4.2.1.1. *Frequências Fenotípicas*

Na tabela IV-5 podem observar-se as frequências fenotípicas para o gene TNFR2, nos grupos de doentes e população controlo.

Tabela IV-5. Frequências fenotípicas obtidas para o gene TNFR2, nos grupos de doentes e população controlo.

TNFR2	NC (N=19)		N (N=4)		N total (N=23)		HIP (N=9)		Pop. Controlo (N=44)	
	N	Freq. (%)	N	Freq. (%)	N	Freq. (%)	N	Freq. (%)	N	Freq. (%)
Fenótipo										
196M	19	100,0	4	100,0	23	100,0	8	88,9	41	93,2
196R	8	42,1	2	50,0	10	43,5	4	44,4	19	43,2

No gráfico IV-7 estão representadas as frequências fenotípicas obtidas para o alelo 196M e 196R, nos vários grupos de doentes estudados e na população controlo.

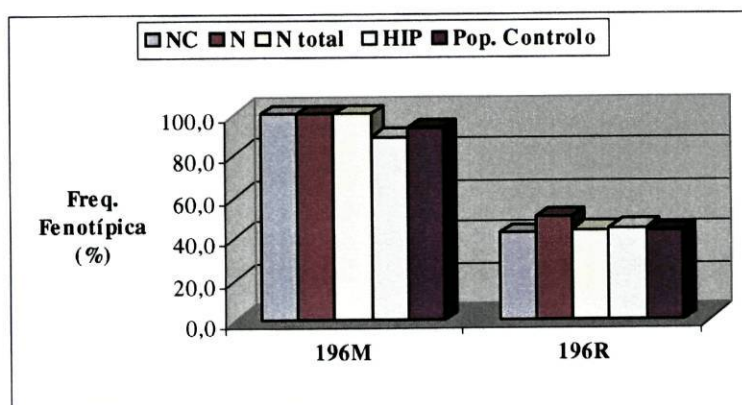


Gráfico IV-7. Representação gráfica das frequências fenotípicas para os alelos 196M e 196R nas populações estudadas.

Por análise da tabela IV-5 e gráfico IV-7, verificou-se que não existiram diferenças relevantes na frequência fenotípica dos alelos 196M e 196R em todos os grupos de doentes estudados, quando comparados com a população controlo.

Considerando-se o total de doentes com narcolepsia (N total), a frequência do alelo 196M foi de 100,0 % vs. 93,2% para a população controlo. Quando se analisaram os subgrupos NC e N, a frequência fenotípica deste alelo manteve-se semelhante. Para indivíduos com hipersónia idiopática (HIP) a frequência do alelo M foi de 88,9%.

A frequência fenotípica do alelo 196R foi de 43,5% para o grupo N total e 42,1% e 50% para os grupos NC e N, respectivamente. Este alelo estava representado em 44,4% de doentes com hipersónia idiopática, frequência essa idêntica à da população controlo (43,2%).

4.2.1.2. *Frequências Genotípicas*

Na tabela IV-6 e no gráfico IV-8 podem ser visualizadas as frequências dos genótipos (M/M, M/R e R/R), observadas nos grupos de doentes e população controlo.

Tabela IV-6. Frequências genotípicas obtidas para o gene TNFR2, nos grupos de doentes e população controlo.

TNFR2	NC (N=19)		N (N=4)		N total (N=23)		HIP (N=9)		Pop. Controlo (N=44)	
	N	Freq. (%)	N	Freq. (%)	N	Freq. (%)	N	Freq. (%)	N	Freq. (%)
Genótipo										
M/M	11	57,9	2	50,0	13	56,5	5	55,6	25	56,8
M/R	8	42,1	2	50,0	10	43,5	3	33,3	16	36,4
R/R	0	0,0	0	0,0	0	0,0	1	11,1	3	6,8

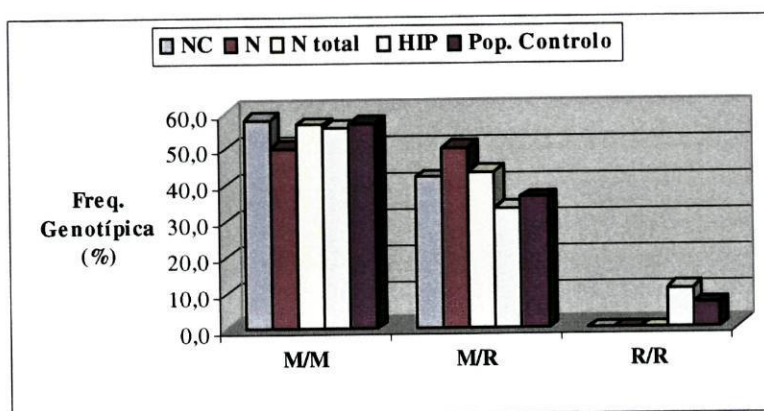


Gráfico IV-8. Representação gráfica das frequências para os genótipos M/M, M/R e R/R nas populações estudadas.

Analisando a tabela IV-6 e o gráfico IV-8 e recorrendo às tabelas VII-39 a VII-41 (Anexos) verificou-se que não existiram diferenças estatisticamente significativas no valor da frequência dos genótipos M/M, M/R e R/R entre os grupos de doentes e população controlo.

Para o genótipo M/M, a frequência obtida em cada grupo de doentes foi semelhante à da população controlo (56,5% N total, 57,9% NC, 50,0% N e 55,6% HIP vs. 56,8% Pop. Controlo).

Por outro lado, observou-se, quando comparado com o grupo controlo, um aumento na frequência do genótipo M/R em todos os doentes com narcolepsia (43,5% N total, 42,1% NC e 50,0% N vs. 36,4% na Pop. Controlo) e uma ligeira diminuição nos doentes com hipersónia idiopática (33,3%).

Relativamente ao genótipo R/R, verificou-se a sua ausência em todos os grupos de doentes estudados, excepto na hipersónia, em que estava aumentado (11,1% vs. 6,8% Pop. Controlo) (tabela VII-41 Anexos).

Da análise dos resultados obtidos para as frequências fenotípicas e genotípicas do gene TNFR2, pode-se constatar que tanto o alelo M como o R não se encontram associados a nenhum grupo de doentes em particular, embora a frequência do alelo M seja mais elevada que a do R. Por outro lado, dado o aumento da frequência do genótipo M/R nos doentes com narcolepsia, poder-se-ia associar este genótipo mais à narcolepsia do que a outras hipersónias, no entanto, como o número de indivíduos estudado foi pequeno, esta associação só poderá ser confirmada com estudos em amostras mais alargadas de doentes. Estas observações juntamente com o facto do genótipo R/R estar ausente nos narcolépticos levam-nos a concluir que a associação do alelo 196R à narcolepsia em doentes japoneses, descrita por Hohjoh *et al.*⁵¹, sugerindo que o TNFR2 estaria associado com a susceptibilidade para a narcolepsia, não foi observada neste estudo. Note-se, no entanto, que as frequências deste alelo obtidas nas populações de doentes narcolépticos foi semelhante em ambas as populações estudadas – portuguesa e japonesa (43,5% portuguesa vs. 30,2% japonesa). A razão pela qual, não foi encontrada qualquer associação no nosso estudo, deve-se, provavelmente, às diferenças observadas na frequência deste alelo nas respectivas populações de referência (43,2% portuguesa vs. 20,1% japonesa).

V. CONCLUSÕES

Do estudo dos antígenos HLA classe II (DQA1-DQB1- DRB1) em doentes com patologia de sono oriundos do Norte de Portugal, verificou-se que esta patologia está preferencialmente associada aos alelos HLA-DQA1*0102, DQB1*0301, DQB1*0602, DRB1*03 e DRB1*1501.

Relativamente à narcolepsia com cataplexia (NC), os alelos HLA-DQA1*0102, DQB1*0602 e DRB1*1501, são os mais frequentes. Estes resultados confirmam que o haplótipo HLA-DRB1*1501-DQA1*0102-DQB1*0602 confere susceptibilidade para a narcolepsia com cataplexia, sendo o alelo DQB1*0602 o mais específico e informativo.

Os resultados obtidos para doentes com hipersónia idiopática (HIP), indicam que os alelos mais associados a esta patologia são o HLA-DQB1*0301 e HLA-DRB1*03.

Os dados anteriores permitem concluir que o haplótipo HLA-DRB1*1501-DQA1*0102-DQB1*0602 é importante para a distinção entre NC e HIP, considerando-se que estas duas entidades possuem características genéticas diferentes. Assim, este estudo reforça a associação dos antígenos HLA à patologia de sono e também a ideia de que a caracterização genética poderá ser útil na distinção clínica entre pacientes com narcolepsia e pacientes com outras hipersónias.

Embora se tenha considerado também o grupo N (narcolepsia sem cataplexia), dada a importância atribuída ao factor cataplexia no diagnóstico desta patologia, o número de indivíduos estudados não permitiu tirar conclusões. De facto, o haplótipo HLA-DRB1*1501-DQA1*0102-DQB1*0602 não é um factor de distinção entre NC e N, dada a sua representatividade em ambas as populações, o que sugere que a cataplexia não é indispensável para o diagnóstico de narcolepsia. O facto da frequência dos alelos HLA-DQA1*05 e HLA-DRB1*11 estar significativamente diminuída no grupo NC, quando comparado com o N, poderá sugerir que estes alelos sejam alelos de protecção contra a cataplexia, mas esta hipótese só poderá ser confirmada com estudos em séries mais alargadas de doentes.

Para o grupo das outras patologias de sono (OPS), não se observou a associação com nenhum antígeno HLA em particular.

Da análise do polimorfismo no exão 6 do TNFR2 pode concluir-se que nenhum dos alelos 196M e 196R se encontra associado à patologia de sono. Esta observação

juntamente com a ausência do genótipo R/R nos doentes com narcolepsia, mostra que a associação do alelo 196R a esta patologia em doentes japoneses, descrita por Hohjoh *et al*, não foi observada no grupo de doentes estudados. O aumento da frequência do genótipo M/R nos narcolépticos, pode sugerir a sua associação apenas à narcolepsia. No entanto, estudos com um número mais elevado de doentes serão necessários para confirmar estas observações.

O trabalho realizado reforça a hipótese postulada da existência de genes de susceptibilidade para a narcolepsia e hipersónia idiopática localizados na região HLA classe II (DQA1, DQB1 e DRB1). No entanto, embora o haplótipo HLA-DQA1*0102 e DQB1*0602 esteja representado em 95% de doentes caucasianos, não é necessário nem suficiente para o desenvolvimento da narcolepsia. Assim, por exemplo, indivíduos que não possuam o alelo HLA-DQB1*0602 podem manifestar a doença e do mesmo modo, indivíduos com o alelo podem não ser doentes. Estes dados sugerem que factores genéticos não relacionados com o HLA e factores ambientais poderão também estar envolvidos na etiopatogénese desta doença. Apesar de todos estes estudos o mecanismo patofisiológico da doença é ainda desconhecido, sendo a hipótese mais provável a de que a narcolepsia é uma doença autoimune associada ao HLA e na qual a perda de neurónios, produtores de hipocretina é consequência de um processo de destruição neuronal, mediada pelos antígenos do sistema HLA. Neste contexto, a procura de um aumento da transmissão de hipocretina, poderá conduzir a novos tratamentos para a narcolepsia humana.

VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ¹ Laboratoire L. Lafon Aneid, Produtos Farmacêuticos, Lda (2001). As patologias da vigília.
- ² Tillet D, Billiard M (2001). A Narcolepsia Cataplexia - uma doença paradoxal. ANC (Associação Francesa de Narcolepsia e Cataplexia).
- ³ Siegel JM (2000). Narcolepsy. *Scientific American*: 59-63.
- ⁴ Lin L, Faraco J, Li R *et al.* (1999). The sleep disorder canine narcolepsy is caused by a mutation in the hypocretin (orexin) receptor 2 gene. *Cell* **98**: 365-376.
- ⁵ Siegel JM (1999). Narcolepsy: a key role for hypocretins (orexins). *Cell* **98**: 409-412.
- ⁶ Nishino S, Ripley B, Overeem S *et al.* (2000). Hypocretin (orexin) deficiency in human narcolepsy. *The Lancet* **355**: 39-40.
- ⁷ Carlander B, Touchon J, Billiard M (1998). Les hypersomnies - narcolepsie-cataplexie (syndrome de Gélineau). *La Presse Médicale* **27** (34): 1748-1753.
- ⁸ Aldrich MS (1998). Diagnostic aspects of narcolepsy. *Neurology* **50** (Suppl 1): S2-S7.
- ⁹ Thannickal TC, Moore RY, Nienhuis R *et al.* (2000). Reduced number of hypocretin neurons in human narcolepsy. *Neuron* **27**: 469-474.
- ¹⁰ Mignot E (1998). Genetic and familial aspects of narcolepsy. *Neurology* **50** (Suppl 1): S16-S22.
- ¹¹ Wagner JL, Storb R, Storer B *et al.* (2000). DLA-DQB1 alleles and bone marrow transplantation experiments in narcoleptic dogs. *Tissue Antigens* **56**: 223-231.
- ¹² Koch H, Craig I, Dahlitz M *et al.* (1999). Analysis of the monoamine oxidase genes and the Norrie disease gene locus in narcolepsy. *The Lancet* **353**: 645-646.
- ¹³ Laboratoire L. Lafon (2001). Modiodal (modafinil) - dossier d'information médicale et pharmaceutique.

- ¹⁴ Abbas AK, Lichtman AH, Pober S (1997). Cellular and molecular immunology, Third Edition. W. B. Saunders Company, Philadelphia.
- ¹⁵ Foissac A, Salhi M, Cambon-Thomsen A (2000). Microsatellites in the HLA region: 1999 update. *Tissue Antigens* **55**: 477-509.
- ¹⁶ Marsh SGE, Parham P, Barber LD(2000). The HLA-Facts Book. Academic Press, New York.
- ¹⁷ IMGT/HLA-Database. Disponível em: <http://www.ebi.ac.uk/imgt/hla>
- ¹⁸ Kuby J (1997). Immunology. W.H. Freeman and Company, New York.
- ¹⁹ Disponível em:
<http://www.crysl.bbk.ac.uk/pp97/assignments/projects/coadwell/006.htm>)
- ²⁰ Disponível em: <http://www.bmb.leeds.ac.uk/illingworth/icu3/selfder/immunol/>)
- ²¹ Disponível em: <http://www.ultranet.com/~jkimball/BiologyPages/H/HLA.html#beta-2>
- ²² Anic-Labat S, Guilleminault C, Kraemer HC *et al.* (1999). Validation of a cataplexy questionnaire in 983 sleep-disorders patients. *Sleep* **22** (1): 77-87.
- ²³ Mignot E, Lin L, Risch N *et al.* (1999). Identification of a novel HLA narcolepsy susceptibility subtype, HLA-DQB1*0301. *Sleep* **22**: S121-S122.
- ²⁴ Rogers AE, Meehan J, Guilleminault C *et al.* (1997). HLA DR15 (DR2) and DQB1*0602 typing studies 188 narcoleptic patients with cataplexy. *Neurology* **48**: 1550-1556.
- ²⁵ Mignot E, Hayduk R, Black J *et al.* (1997). HLA DQB1*0602 is associated with cataplexy in 509 narcoleptic patients. *Sleep* **20** (11):1012-1020.
- ²⁶ Hohjoh H, Terada N, Nakayama *et al.* (2001). Case-control study with narcoleptic patients and healthy controls who, like the patients, possess both HLA-DRB1*1501 and -DQB1*0602. *Tissue Antigens* **57**: 230-235.

- ²⁷ Mignot E, Lin X, Arrigoni J *et al.* (1994). DQB1*0602 and DQA1*0102 (DQ1) are better markers than DR2 for narcolepsy in caucasian and black americans. *Sleep* **17** (8): S60-S67.
- ²⁸ Mignot E, Tafti M, Dement WC *et al.* (1995). Narcolepsy and immunity. *Advances in Neuroimmunology* **5**: 23-37.
- ²⁹ Martins da Silva B , Lopes J, Pinto D *et al.* (2000). Different HLA predisposition for narcolepsy-cataplexy and other hypersomnias. *Human Immunology* **61**: S79.
- ³⁰ Mignot E, Lin L, Rogers W *et al.* (2001). Complex HLA-DR and -DQ interactions confer risk of narcolepsy-cataplexy in three ethnic groups. *Am J Hum Genet* **68**: 686-699.
- ³¹ Pinto D, Silva AM, Lopes J *et al.* (2001). Alelo HLA-DQB1*0602 e susceptibilidade a diferentes patologias do sono.
- ³² Lopes J, Ramalheira J, Carvalho C *et al.* (1999). Estudos imunogenéticos em pacientes com narcolepsia e hipersónia idiopática. *Vigilia Sueño* **11**(1):31-46.
- ³³ Martins Silva B, Pinto D, Lopes J *et al.* (2001). HLA e polimorfismo do receptor 2 do TNF: factores independentes implicados na susceptibilidade à narcolepsia.
- ³⁴ Pereira C, Bessa C, Cerqueira J *et al.* (2001). Narcolepsy susceptibility genes: HLA and TNFR1I.
- ³⁵ Dahlitz M, Vaughan R, Kaye K *et al.* (1992). The narcolepsy susceptibility gene. *The Lancet* **339**: 1297.
- ³⁶ Billiard M, Pasquié-Magnetto V, Heckman M *et al.* (1994). Environmental and genetic factors – family studies in narcolepsy. *Sleep* **17** : S54-S59.
- ³⁷ Kilduff TS, Peyron C (2000). The hypocretin/orexin ligand-receptor system: implications for sleep and sleep disorders. *Trends Neurosci.* **23**:359-365.
- ³⁸ Siegel JM, Moore R, Thannickal T *et al.* (2001). A brief history of hypocretin/orexin and narcolepsy. *Neuropsychopharmacology* **25** (S5): S14-S20.

- ³⁹ Sakurai T, Amemiya A, Ishii M *et al.* (1998). Orexins and orexin receptors: a family of hypothalamic neuropeptides and G protein-coupled receptors that regulate feeding behavior. *Cell* **92**: 573-585.
- ⁴⁰ Peyron C, Faraco J, Rogers W *et al.* (2000). A mutation in a case of early onset narcolepsy and a generalized absence of hypocretin peptides in human narcoleptic brains. *Nature Medicine* **6** (9): 991-997.
- ⁴¹ Lin L, Faraco J, Li R *et al.* (1999). Mutation in the hypocretin (orexin) receptor 2 gene causes canine narcolepsy. *J Neurol* **246**: 985-986.
- ⁴² Disponível em: <http://www.biobeat.com/narc/>
- ⁴³ Nevsimalova S, Faraco J, Mignot E *et al.* (2000). Clinical features of hypocretin (orexin) mutation in human narcolepsy. *Neurology* **54** (Suppl 3): A30-A31.
- ⁴⁴ Kilduff TS (2000). Narcolepsy: a neurodegenerative disease of the hypocretin/orexin system? *TINS* **23** (11): 512.
- ⁴⁵ Mignot E (2001). Narcolepsy and HLA system. *N Engl J Med* **344** (9): 692.
- ⁴⁶ Mignot E (2001). A commentary on the Neurobiology of the hypocretin/orexin system. *Neuropsychopharmacology* **25** (S5): S5-S13.
- ⁴⁷ Cruse JM, Lewis RE (1999). Atlas of immunology. CRC Press, New York.
- ⁴⁸ Hohjoh H, Nakayama T, Ohashi J *et al.* (1999). Significant association of a single nucleotide polymorphism in the tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) gene promoter with human narcolepsy. *Tissue Antigens* **54**: 138-145.
- ⁴⁹ Fanning GC, Bunce M, Black CM *et al.* (1997). Polymerase chain reaction haplotyping using 3' mismatches in the forward and reverse primers: application to the biallelic polymorphisms of tumor necrosis factor and lymphotoxin α . *Tissue Antigens* **50**: 23-31.
- ⁵⁰ Al-Ansari AS, Ollier WER, Villarreal J *et al.* (2000). Tumor necrosis factor receptor II (TNFRII) exon 6 polymorphism in systemic lupus erythematosus. *Tissue Antigens* **55**: 97-99.

- ⁵¹ Hohjoh H, Terada N, Kawashima M *et al.* (2000). Significant association of the tumor necrosis factor receptor 2 (TNFR2) gene with human narcolepsy. *Tissue Antigens* **56**: 446-448.
- ⁵² Disponível em: http://my.webmd.com/content/dmk/dmk_article_40080
- ⁵³ Douglas NJ (1998). The psychosocial aspects of narcolepsy. *Neurology* **50** (Suppl 1): S27-S30.
- ⁵⁴ Goswami M (1998). The influence of clinical symptoms on quality of life in patients with narcolepsy. *Neurology* **50** (Suppl 1): S31-S36.
- ⁵⁵ (1999). Atualização bibliográfica - apneia do sono aumenta o risco de acidentes de viação. *Perspectivas em Prática Médica* **4** (2): 11-12.
- ⁵⁶ Terán-Santos J, Jiménez-Gómez A, Cordero-Guevara J *et al.* (1999). The association between sleep apnea and the risk of traffic accidents. *N Engl J Med* **340**: 847-851.
- ⁵⁷ Suratt PM (1999). Driving with sleep apnea. *N Engl J Med* **340**: 881-883.
- ⁵⁸ Fry JM (1998). Treatment modalities for narcolepsy. *Neurology* **50** (Suppl 1): S43-S48.
- ⁵⁹ John J, Wu MF, Siegel JM (2000). Systemic administration of hypocretin-1 reduces cataplexy and normalizes sleep and waking durations in narcoleptic dogs. *Sleep Research Online* **3** (1): 23-28.
- ⁶⁰ Martinho A, Simões O, Santos P *et al.* (1996). Analysis of HLA-DR, DQA1 and DQB1 polymorphism in a Portuguese population.
- ⁶¹ American Sleep Disorders Association (1997). The international classification of sleep disorders, revised: diagnostic and coding manual. American sleep Disorders Association, Rochester.
- ⁶² Guilleminault C, Heinzer R, Mignot E *et al.* (1998). Investigations into the neurologic basis of narcolepsy. *Neurology* **50** (Suppl 1): S8-S15.

- ⁶³ Mahowald MW (2001). O que causa a sonolência excessiva durante o dia? *Postgraduate Medicine* **16** (2): 13-19.
- ⁶⁴ Attarian HP (2001). Ajudar os doentes que referem não conseguir dormir – formas práticas de avaliar e tratar as insónias. *Postgraduate Medicine* **16** (2): 23-35.
- ⁶⁵ Choo KL, Guilleminault C (1998). Narcolepsy and idiopathic hypersomnolence. *Clinics in Chest Medicine* **19** (1):169-181.
- ⁶⁶ Aldrich MS, Chervin RD, Malow BA (1997). Narcolepsy - value of the multiple sleep latency test (MSLT) for the diagnosis of narcolepsy. *Sleep* **20** (8): 620-629.
- ⁶⁷ Alloway CED, Ogilvie RD, Shapiro CM (1997). The alpha attenuation test: assessing excessive daytime sleepiness in narcolepsy-cataplexy. *Sleep* **20** (4): 258-266.
- ⁶⁸ Miller SA, Dykes DD, Polesky HF (1998). A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acid Res* **16** (3): 1215.
- ⁶⁹ Olerup O, Zetterquist H (1992). HLA-DR typing by PCR amplification with sequence-specific primers (PCR-SSP) in 2 hours: an alternative to serological DR typing in clinic practice including donor-recipient matching in cadaveric transplantation. *Tissue Antigens* **39**: 225-235.
- ⁷⁰ Olerup O, Aldener A, Fogdell A (1993). HLA-DQB1 and -DQA1 typing by PCR amplification with sequence-specific primers (PCR-SSP) in 2 hours. *Tissue Antigens* **41**: 119-134.
- ⁷¹ Olerup O, Zetterquist H (1993). DR “ Low-resolution” PCR-SSP typing a correction and an update. *Tissue Antigens* **40**:55-56.
- ⁷² Bunce M, O’Neill CM, Barnardo MCNM *et al.* (1995). Phototyping: comprehensive DNA typing for HLA-A, B, C, DRB1, DRB3, DRB4, DRB5 & DQB1 by PCR with 144 primer mixes utilizing sequence-specific primers (PCR-SSP). *Tissue Antigens* **46**: 355-367.
- ⁷³ Pinheiro F (2000). *Biologia forense e criminalística. Curso de pós-graduação em ciências médico-legais.* Instituto de Medicina Legal do Porto.

- ⁷⁴ Mullighan CG, Bunce M, Welsh KI (1997). High-resolution HLA-DQB1 typing using the polymerase chain reaction and sequence-specific primers. *Tissue Antigens* **50**: 688-692.
- ⁷⁵ Mignot E, Lin X, Hesla PE *et al.* (1993). A novel HLA DR17, DQ1 (DQA1-0102/DQB1-0602 positive) haplotype predisposing to narcolepsy in caucasians. *Sleep* **16** (8): 764-765.
- ⁷⁶ Mignot E, Young T, Lin L *et al.* (1999). Nocturnal sleep and daytime sleepiness in normal subjects with HLA-DQB1*0602. *Sleep* **22** (3): 347-351.
- ⁷⁷ Hublin C, Kaprio J, Partinen M *et al.* (1994). The prevalence of narcolepsy: an epidemiological study of the Finnish Twin Cohort. *Ann Neurol* **35**: 709-716.
- ⁷⁸ Nevsimalová S, Mignot E, Sonka K *et al.* (1997). Familial aspects of narcolepsy-cataplexy in the Czech Republic. *Sleep* **20** (11): 1021-1026.

VII-ANEXOS

7.1. Resultados do programa de estatística SPSS para a tipagem HLA

7.1.1. Comparação entre narcolepsia com cataplexia (NC) e narcolepsia sem cataplexia (N)

Tabela VII-1. Frequências fenotípicas e valores de **p** e **OR** obtidos para o *locus* HLA-DQA1, em doentes com narcolepsia e cataplexia (NC) e narcolepsia sem cataplexia (N).

Alelo	NC (N=19)		N (N=4)		Teste Exacto Fisher (p)	Odds Ratio (OR)
	N	Freq.(%)	N	Freq.(%)		
DQA1*01	15	78,9	2	50,0	0,270	3,750
DQA1*0101	4	21,1	0	0,0	1,000	_____
DQA1*0102	13	68,4	2	50,0	0,589	2,167
DQA1*0104	1	5,3	0	0,0	1,000	_____
DQA1*02	5	26,3	1	25,0	1,000	1,071
DQA1*03	4	21,1	1	25,0	1,000	0,800
DQA1*04	3	15,8	0	0,0	1,000	_____
DQA1*05	6	31,6	4	100,0	0,024	_____

Tabela VII-2. Frequências fenotípicas e valores de **p** e **OR** obtidos para o *locus* HLA-DQB1, em doentes com narcolepsia e cataplexia (NC) e narcolepsia sem cataplexia (N).

Alelo	NC (N=19)		N (N=4)		Teste Exacto Fisher (p)	Odds Ratio (OR)
	N	Freq.(%)	N	Freq.(%)		
DQB1*02	6	31,6	2	50,0	0,589	0,462
DQB1*03	6	31,6	4	100,0	0,024	_____
DQB1*0301	2	10,5	2	50,0	0,125	0,118
DQB1*04	3	15,8	0	0,0	1,000	_____
DQB1*05	5	26,3	0	0,0	0,539	_____
DQB1*06	15	78,9	2	50,0	0,270	3,750
DQB1*0602	13	68,4	2	50,0	0,589	2,167
DQB1*0603	2	10,5	0	0,0	1,000	_____
DQB1*0604	1	5,3	0	0,0	1,000	_____

Tabela VII-3. Frequências fenotípicas e valores de **p** e **OR** obtidos para o *locus* HLA-DQR1, em doentes com narcolepsia e cataplexia (NC) e narcolepsia sem cataplexia (N).

Alelo	NC (N=19)		N (N=4)		Teste Exacto Fisher	Odds Ratio
	N	Freq.(%)	N	Freq.(%)	(p)	(OR)
DRB1*01	4	21,1	0	0,0	1,000	_____
DRB1*03	2	10,5	1	25,0	0,453	0,353
DRB1*04	3	15,8	1	25,0	1,000	0,563
DRB1*07	5	26,3	1	25,0	1,000	1,071
DRB1*08	3	15,8	0	0,0	1,000	_____
DRB1*11	2	10,5	3	75,0	0,021	0,039
DRB1*13	3	15,8	0	0,0	1,000	_____
DRB1*14	3	15,8	0	0,0	1,000	_____
DRB1*1501	13	68,4	2	50,0	0,589	2,167

Tabela VII-4. Frequências fenotípicas e valores de **p** e **OR** obtidos para o haplótipo HLA-DRB1*1501-DQA1*0102-DQB1*0602, em doentes com narcolepsia e cataplexia (NC) e narcolepsia sem cataplexia (N).

Haplótipo	NC (N=19)		N (N=4)		Teste Exacto Fisher	Odds Ratio
	N	Freq.(%)	N	Freq.(%)	(p)	(OR)
DRB1*1501-DQA1*0102-DQB1*0602	13	68,4	2	50,0	0,589	2,167

7.1.2. Comparação entre narcolepsia total (N total) e hipersónia idiopática (HIP)

Tabela VII-5. Frequências fenotípicas e valores de **p** e **OR** obtidos para o *locus* HLA-DQA1, em doentes do grupo N total e dentes com hipersónia idiopática (HIP).

Alelo	N total (N=23)		HIP (N=9)		Teste Exacto Fisher	Odds Ratio
	N	Freq.(%)	N	Freq.(%)	(p)	(OR)
DQA1*01	17	73,9	4	44,4	0,213	3,542
DQA1*0101	4	17,4	2	22,2	1,000	0,737
DQA1*0102	15	65,2	1	11,1	0,015	15,000
DQA1*0103	0	0,0	1	11,1	0,281	_____
DQA1*0104	1	4,3	2	22,2	0,184	0,159
DQA1*02	6	26,1	0	0	0,150	_____
DQA1*03	5	21,7	2	22,2	1,000	0,972
DQA1*04	3	13,0	1	11,1	1,000	1,200
DQA1*05	10	43,1	6	66,7	0,433	0,385

Tabela VII-6. Frequências fenotípicas e valores de **p** e **OR** obtidos para o *locus* HLA-DQB1, em doentes do grupo N total e dentes com hipersónia idiopática (HIP).

Alelo	N total (N=23)		HIP (N=9)		Teste Exacto Fisher	Odds Ratio
	N	Freq.(%)	N	Freq.(%)	(p)	(OR)
DQB1*02	8	34,8	3	33,3	1,000	1,067
DQB1*03	10	43,5	3	33,3	0,704	1,538
DQB1*0301	4	17,4	2	22,2	1,000	0,737
DQB1*04	3	13,0	0	0,0	0,541	—
DQB1*05	5	21,7	4	44,4	0,226	0,347
DQB1*06	17	73,9	4	44,4	0,213	3,542
DQB1*0602	15	65,2	2	22,2	0,049	6,563
DQB1*0603	2	8,7	3	33,3	0,121	0,190
DQB1*0604	1	4,3	0	0,0	1,000	—

Tabela VII-7. Frequências fenotípicas e valores de **p** e **OR** obtidos para o *locus* HLA-DRB1, em doentes do grupo N total e dentes com hipersónia idiopática (HIP).

Alelo	N total (N=23)		HIP (N=9)		Teste Exacto Fisher	Odds Ratio
	N	Freq.(%)	N	Freq.(%)	(p)	(OR)
DRB1*01	4	17,4	2	22,2	1,000	0,737
DRB1*03	3	13,0	3	33,3	0,314	0,300
DRB1*04	4	17,4	2	22,2	1,000	0,737
DRB1*07	6	26,1	0	0,0	0,150	—
DRB1*08	3	13,0	1	11,1	1,000	1,200
DRB1*11	5	21,7	2	22,2	1,000	0,972
DRB1*13	3	13,0	2	22,2	0,604	0,525
DRB1*14	3	13,0	2	22,2	0,604	0,525
DRB1*1501	15	65,2	2	22,2	0,049	6,563

Tabela VII-8. Frequências fenotípicas e valores de **p** e **OR** obtidos para o haplótipo HLA-DRB1*1501-DQA1*0102-DQB1*0602, em doentes do grupo N total e doentes com hipersónia idiopática (HIP).

Haplótipo	N total (N=23)		HIP (N=9)		Teste Exacto Fisher	Odds Ratio
	N	Freq.(%)	N	Freq.(%)	(p)	(OR)
DRB1*1501-DQA1*0102-DQB1*0602	15	65,2	1	11,1	0,015	15,000

7.1.3. Comparação entre narcolepsia total (N total) e outras patologias de sono (OPS)

Tabela VII-9. Frequências fenotípicas e valores de **p** e **OR** obtidos para o *locus* HLA-DQA1, em doentes do grupo N total e doentes com outras patologias de sono (OPS).

Alelo	N total (N=23)		OPS (N=20)		Teste Exacto Fisher (p)	Odds Ratio (OR)
	N	Freq.(%)	N	Freq.(%)		
DQA1*01	17	73,9	16	80,0	0,728	0,708
DQA1*0101	4	17,4	3	15,0	1,000	1,193
DQA1*0102	15	65,2	8	40,0	0,131	2,813
DQA1*0103	0	0,0	5	25,0	0,016	_____
DQA1*0104	1	4,3	2	10,0	0,590	0,409
DQA1*0105	0	0,0	2	10,0	0,210	_____
DQA1*02	6	26,1	3	15,0	0,467	2,000
DQA1*03	5	21,7	5	25,0	1,000	0,833
DQA1*04	3	13,0	0	0,0	0,236	_____
DQA1*05	10	43,5	8	40,0	1,000	1,154

Tabela VII-10. Frequências fenotípicas e valores de **p** e **OR** obtidos para o *locus* HLA-DQB1, em doentes do grupo N total e doentes com outras patologias de sono (OPS).

Alelo	N total (N=23)		OPS (N=20)		Teste Exacto Fisher (p)	Odds Ratio (OR)
	N	Freq.(%)	N	Freq.(%)		
DQB1*02	8	34,8	5	25,0	0,5	1,600
DQB1*03	10	43,5	10	50,0	0,764	0,769
DQB1*0301	4	17,4	2	10,0	0,669	1,895
DQB1*04	3	13,0	1	5,0	0,610	2,850
DQB1*05	5	21,7	8	40,0	0,318	0,417
DQB1*06	17	73,9	11	55,0	0,219	2,318
DQB1*0602	15	65,2	3	15,0	0,002	10,625
DQB1*0603	2	8,7	5	25,0	0,222	0,286
DQB1*0604	1	4,3	2	10,0	0,590	0,409
DQB1*0605	0	0,0	1	5,0	0,465	_____

Tabela VII-11. Frequências fenotípicas e valores de **p** e **OR** obtidos para o *locus* HLA-DRB1, em doentes do grupo N total e doentes com outras patologias de sono (OPS).

Alelo	N total (N=23)		OPS (N=20)		Teste Exacto Fisher (p)	Odds Ratio (OR)
	N	Freq.(%)	N	Freq.(%)		
DRB1*01	4	17,4	4,0	20,0	1,000	0,842
DRB1*03	3	13,0	2	10,0	1,000	1,350
DRB1*04	4	17,4	6	30,0	0,473	0,491
DRB1*07	6	26,1	3	15,0	0,467	2,000
DRB1*08	3	13,0	1	5,0	0,610	2,850
DRB1*10	0	0,0	2	10,0	0,210	_____
DRB1*11	5	21,7	6	30,0	0,728	0,648
DRB1*13	3	13,0	8	40,0	0,078	0,225
DRB1*14	3	13,0	2	10,0	1,000	1,350
DRB1*1501	15	65,2	3	15,0	0,002	10,625
DRB1*16	0	0,0	1	5,0	0,465	_____

Tabela VII-12. Frequências fenotípicas e valores de **p** e **OR** obtidos para o haplótipo HLA-DRB1*1501-DQA1*0102-DQB1*0602, em doentes do grupo N total e doentes com outras patologias de sono (OPS).

Haplótipo	N total (N=23)		OPS (N=20)		Teste Exacto Fisher (p)	Odds Ratio (OR)
	N	Freq.(%)	N	Freq.(%)		
DRB1*1501-DQA1*0102-DQB1*0602	15	65,2	3	15	0,002	10,625

7.1.4. Comparação entre hipersónia idiopática (HIP) e outras patologias de sono (OPS)

Tabela VII-13. Frequências fenotípicas e valores de **p** e **OR** obtidos para o *locus* DQA1, em doentes com hipersónia idiopática (HIP) e outras patologias de sono (OPS).

Alelo	HIP (N=9)		OPS (N=20)		Teste Exacto Fisher (p)	Odds Ratio (OR)
	N	Freq.(%)	N	Freq.(%)		
DQA1*01	4	44,4	16	80,0	0,088	0,2
DQA1*0101	2	22,2	3	15,0	0,633	1,619
DQA1*0102	1	11,1	8	40,0	0,201	0,188
DQA1*0103	1	11,1	5	25,0	0,633	0,375
DQA1*0104	2	22,2	2	10,0	0,568	2,571
DQA1*0105	0	0,0	2	10,0	1,000	_____
DQA1*02	0	0,0	3	15,0	0,532	_____
DQA1*03	2	22,2	5	25,0	1,000	0,857
DQA1*04	1	11,1	0	0,0	0,310	_____
DQA1*05	6	66,7	8	40,0	0,245	3,000

Tabela VII-14. Frequências fenotípicas e valores de **p** e **OR** obtidos para o *locus* DQB1, em doentes com hipersónia idiopática (HIP) e outras patologias de sono (OPS).

Alelo	HIP (N=9)		OPS (N=20)		Teste Exacto Fisher (p)	Odds Ratio (OR)
	N	Freq.(%)	N	Freq.(%)		
DQB1*02	3	33,3	5	25,0	0,675	1,500
DQB1*03	3	33,3	10	50,0	0,454	0,500
DQB1*0301	2	22,2	2	10,0	0,568	2,571
DQB1*04	0	0,0	1	5,0	1,000	_____
DQB1*05	4	44,4	8	40,0	1,000	1,200
DQB1*06	4	44,4	11	55,0	0,700	0,655
DQB1*0602	2	22,2	3	15,0	0,633	1,619
DQB1*0603	3	33,3	5	25,0	0,675	1,500
DQB1*0604	0	0,0	2	10,0	1,000	_____
DQB1*0605	0	0,0	1	5,0	1,000	_____

Tabela VII-15. Frequências fenotípicas e valores de **p** e **OR** obtidos para o *locus* DRB1, em doentes com hipersónia idiopática (HIP) e outras patologias de sono (OPS).

Alelo	HIP (N=9)		OPS (N=20)		Teste Exacto Fisher (p)	Odds Ratio (OR)
	N	Freq.(%)	N	Freq.(%)		
DRB1*01	2	22,2	4,0	20,0	1,000	1,143
DRB1*03	3	33,3	2	10,0	0,287	4,500
DRB1*04	2	22,2	6	30,0	1,000	0,667
DRB1*07	0	0,0	3	15,0	0,532	_____
DRB1*08	1	11,1	1	5,0	0,532	2,375
DRB1*10	0	0,0	2	10,0	1,000	_____
DRB1*11	2	22,2	6	30,0	1,000	0,667
DRB1*13	2	22,2	8	40,0	0,431	0,429
DRB1*14	2	22,2	2	10,0	0,568	2,571
DRB1*1501	2,0	22,2	3	15,0	0,633	1,619
DRB1*16	0,0	0,0	1	5,0	1,000	_____

Tabela VII-16. Frequências fenotípicas e valores de **p** e **OR** obtidos para o haplótipo HLA-DRB1*1501-DQA1*0102-DQB1*0602, em doentes com hipersónia idiopática (HIP) e outras patologias de sono (OPS).

Haplótipo	HIP (N=9)		OPS (N=20)		Teste Exacto Fisher (p)	Odds Ratio (OR)
	N	Freq.(%)	N	Freq.(%)		
DRB1*1501-DQA1*0102-DQB1*0602	1	11,1	3	15,0	1,000	0,708

7.1.5. Comparação entre narcolepsia total (N total) e população controle (Pop. Controle)

Tabela VII-17. Frequências fenotípicas e valores de **p** e **OR** obtidos para o *locus* DQA1, em doentes do grupo N total e população controle (Pop. Controle).

Alelo	N total (N=23)		Pop. Controle (N=216)		Teste Exacto Fisher (p)	Odds Ratio (OR)
	N	Freq.(%)	N	Freq.(%)		
DQA1*01	17	73,9	160	74,1	1,000	0,992
DQA1*0101	4	17,4	69	31,9	0,232	0,449
DQA1*0102	15	65,2	50	23,1	0,000065606	6,225
DQA1*0103	0	0,0	41	19,0	0,018	_____
DQA1*0104	1	4,3	0	0,0	0,096	_____
DQA1*02	6	26,1	66	30,6	0,812	0,802
DQA1*03	5	21,7	63	29,2	0,628	0,675
DQA1*04	3	13,0	8	3,7	0,077	3,900
DQA1*05	10	43,5	90	41,7	1,000	1,077
DQA1*06	0	0,0	4	1,9	1,000	_____

Tabela VII-18. Frequências fenotípicas e valores de **p** e **OR** obtidos para o *locus* DQB1, em doentes do grupo N total e população controle (Pop. Controle).

Alelo	N total (N=23)		Pop. Controle (N=220)		Teste Exacto Fisher (p)	Odds Ratio (OR)
	N	Freq.(%)	N	Freq.(%)		
DQB1*02	8	34,8	98	44,5	0,508	0,664
DQB1*03	10	43,5	131	59,5	0,182	0,523
DQB1*0301	4	17,4	80	36,4	0,105	0,368
DQB1*0302	0	0,0	37	16,8	0,030	_____
DQB1*0303	0	0,0	13	5,9	0,619	_____
DQB1*0304	0	0,0	1	0,5	1,000	_____
DQB1*04	3	13,0	10	4,5	0,113	3,150
DQB1*05	5	21,7	86	39,1	0,117	0,433
DQB1*06	17	73,9	81	36,8	0,001	4,862
DQB1*0601	0	0,0	4	1,8	1,000	_____
DQB1*0602	15	65,2	26	11,8	0,0000000415	13,990
DQB1*0603	2	8,7	38	17,3	0,386	0,456
DQB1*0604	1	4,3	11	5,0	1,000	0,864
DQB1*0605	0	0,0	2	0,9	1,000	_____

Tabela VII-19. Frequências fenotípicas e valores de **p** e **OR** obtidos para o *locus* DRB1, em doentes do grupo N total e população controlo (Pop. Controlo).

Alelo	N total (N=23)		Pop. Controlo (N=240)		Teste Exacto Fisher	Odds Ratio
	N	Freq.(%)	N	Freq.(%)	(p)	(OR)
DRB1*01	4	17,4	61	25,4	0,460	0,618
DRB1*03	3	13,0	49	20,4	0,584	0,585
DRB1*04	4	17,4	70	29,2	0,332	0,511
DRB1*07	6	26,1	72	30,0	0,814	0,824
DRB1*08	3	13,0	17	7,1	0,398	1,968
DRB1*09	0	0,0	4	1,7	1,000	_____
DRB1*10	0	0,0	4	1,7	1,000	_____
DRB1*11	5	21,7	45	18,8	0,781	1,204
DRB1*12	0	0,0	5	2,1	1,000	_____
DRB1*13	3	13,0	57	23,8	0,306	0,482
DRB1*14	3	13,0	18	7,5	0,409	1,850
DRB1*1501	15	65,2	33	13,8	0,000000180	11,761
DRB1*16	0	0,0	14	5,8	0,619	_____

Tabela VII-20. Frequências fenotípicas e valores de **p** e **OR** obtidos para o haplótipo HLA-DRB1*1501-DQA1*0102-DQB1*0602, em doentes do grupo N total e população controlo (Pop. Controlo).

Haplótipo	N total (N=23)		Pop. Controlo (N=175)		Teste Exacto Fisher	Odds Ratio
	N	Freq.(%)	N	Freq.(%)	(p)	(OR)
DRB1*1501-DQA1*0102-DQB1*0602	15	65,2	22	12,6	0,000000138644	13,040

7.1.6. Comparação entre narcolepsia com cataplexia (NC) e população controle (Pop. Controle)

Tabela VII-21. Frequências fenotípicas e valores de **p** e **OR** obtidos para o *locus* DQA1, em doentes com narcolepsia e cataplexia (NC) e população controle (Pop. Controle).

Alelo	NC (N=19)		Pop. Controle (N=216)		Teste Exacto Fisher (p)	Odds Ratio (OR)
	N	Freq.(%)	N	Freq.(%)		
DQA1*01	15	78,9	160	74,1	0,788	1,313
DQA1*0101	4	21,1	69	31,9	0,441	0,568
DQA1*0102	13	68,4	50	23,1	0,0000900438	7,193
DQA1*0103	0	0,0	41	19,0	0,051	_____
DQA1*0104	1	5,3	0	0,0	0,081	_____
DQA1*02	5	26,3	66	30,6	0,799	0,812
DQA1*03	4	21,1	63	29,2	0,599	0,648
DQA1*04	3	15,8	8	3,7	0,049	4,875
DQA1*05	6	31,6	90	41,7	0,471	0,646
DQA1*06	0	0,0	4	1,9	1,000	_____

Tabela VII-22. Frequências fenotípicas e valores de **p** e **OR** obtidos para o *locus* DQB1, em doentes com narcolepsia e cataplexia (NC) e população controle (Pop. Controle).

Alelo	NC (N=19)		Pop. Controle (N=220)		Teste Exacto Fisher (p)	Odds Ratio (OR)
	N	Freq.(%)	N	Freq.(%)		
DQB1*02	6	31,6	98	44,5	0,339	0,575
DQB1*03	6	31,6	131	59,5	0,028	0,314
DQB1*0301	2	10,5	80	36,4	0,023	0,206
DQB1*0302	0	0,0	37	16,8	0,051	_____
DQB1*0303	0	0,0	13	5,9	0,607	_____
DQB1*0304	0	0,0	1	0,5	1,000	_____
DQB1*04	3	15,8	10	4,5	0,073	3,938
DQB1*05	5	26,3	86	39,1	0,331	0,556
DQB1*06	15	78,9	81	36,8	0,0004499152	6,435
DQB1*0601	0	0,0	4	1,8	1,000	_____
DQB1*0602	13	68,4	26	11,8	0,00000011626	16,167
DQB1*0603	2	10,5	38	17,3	0,748	0,563
DQB1*0604	1	5,3	11	5,0	1,000	1,056
DQB1*0605	0	0,0	2	0,9	1,000	_____

Tabela VII-23. Frequências fenotípicas e valores de **p** e **OR** obtidos para o *locus* DRB1, em doentes com narcolepsia e cataplexia (NC) e população controlo (Pop. Controlo).

Alelo	NC (N=19)		Pop. Controlo (N=240)		Teste Exacto Fisher	Odds Ratio
	N	Freq.(%)	N	Freq.(%)	(p)	(OR)
DRB1*01	4	21,1	61	25,4	0,789	0,783
DRB1*03	2	10,5	49	20,4	0,383	0,459
DRB1*04	3	15,8	70	29,2	0,292	0,455
DRB1*07	5	26,3	72	30,0	1,000	0,833
DRB1*08	3	15,8	17	7,1	0,171	2,460
DRB1*09	0	0,0	4	1,7	1,000	_____
DRB1*10	0	0,0	4	1,7	1,000	_____
DRB1*11	2	10,5	45	18,8	0,541	0,510
DRB1*12	0	0,0	5	2,1	1,000	_____
DRB1*13	3	15,8	57	23,8	0,577	0,602
DRB1*14	3	15,8	18	7,5	0,191	2,313
DRB1*1501	13	68,4	33	13,8	0,0000004425	13,591
DRB1*16	0	0,0	14	5,8	0,608	_____

Tabela VII-24. Frequências fenotípicas e valores de **p** e **OR** obtidos para o haplótipo HLA-DRB1*1501-DQA1*0102-DQB1*0602, em doentes com narcolepsia e cataplexia (NC) e população controlo (Pop. Controlo).

Haplótipo	NC (N=19)		Pop. Controlo (N=175)		Teste Exacto Fisher	Odds Ratio
	N	Freq.(%)	N	Freq.(%)	(p)	(OR)
DRB1*1501-DQA1*0102-DQB1*0602	13	68,4	22	12,6	0,0000003298	15,068

7.1.7. Comparação entre narcolepsia sem cataplexia (N) e população controlo (Pop. Controlo)

Tabela VII-25. Frequências fenotípicas e valores de **p** e **OR** obtidos para o *locus* DQA1, em doentes com narcolepsia sem cataplexia (N) e população controlo (Pop. Controlo).

Alelo	N (N=4)		Pop. Controlo (N=216)		Teste Exacto Fisher (p)	Odds Ratio (OR)
	N	Freq.(%)	N	Freq.(%)		
DQA1*01	2	50,0	160	74,1	0,284	0,350
DQA1*0101	0	0,0	69	31,9	0,312	_____
DQA1*0102	2	50,0	50	23,1	0,238	3,320
DQA1*0103	0	0,0	41	19,0	1,000	_____
DQA1*0104	0	0,0	0	0,0	_____	_____
DQA1*02	1	25,0	66	30,6	1,000	0,758
DQA1*03	1	25,0	63	29,2	1,000	0,810
DQA1*04	0	0,0	8	3,7	1,000	_____
DQA1*05	4	100,0	90	41,7	0,032	_____
DQA1*06	0	0,0	4	1,9	1,000	_____

Tabela VII-26. Frequências fenotípicas e valores de **p** e **OR** obtidos para o *locus* DQB1, em doentes com narcolepsia sem cataplexia (N) e população controlo (Pop. Controlo).

Alelo	N (N=4)		Pop. Controlo (N=220)		Teste Exacto Fisher (p)	Odds Ratio (OR)
	N	Freq.(%)	N	Freq.(%)		
DQB1*02	2	50,0	98	44,5	1,000	1,245
DQB1*03	4	100,0	131	59,5	0,153	_____
DQB1*0301	2	50,0	80	36,4	0,625	1,750
DQB1*0302	0	0,0	37	16,8	1,000	_____
DQB1*0303	0	0,0	13	5,9	1,000	_____
DQB1*0304	0	0,0	1	0,5	1,000	_____
DQB1*04	0	0,0	10	4,5	1,000	_____
DQB1*05	0	0,0	86	39,1	0,301	_____
DQB1*06	2	50,0	81	36,8	0,628	1,716
DQB1*0601	0	0,0	4	1,8	1,000	_____
DQB1*0602	2	50,0	26	11,8	0,077	7,462
DQB1*0603	0	0,0	38	17,3	1,000	_____
DQB1*0604	0	0,0	11	5,0	1,000	_____
DQB1*0605	0	0,0	2	0,9	1,000	_____

Tabela VII-27. Frequências fenotípicas e valores de **p** e **OR** obtidos para o *locus* DRB1, em doentes com narcolepsia sem cataplexia (N) e população controlo (Pop. Controlo).

Alelo	N (N=4)		Pop. Controlo (N=240)		Teste Exacto Fisher (p)	Odds Ratio (OR)
	N	Freq.(%)	N	Freq.(%)		
DRB1*01	0	0,0	61	25,4	0,575	—
DRB1*03	1	25,0	49	20,4	1,000	1,299
DRB1*04	1	25,0	70	29,2	1,000	0,810
DRB1*07	1	25,0	72	30,0	1,000	0,778
DRB1*08	0	0,0	17	7,1	1,000	—
DRB1*09	0	0,0	4	1,7	1,000	—
DRB1*10	0	0,0	4	1,7	1,000	—
DRB1*11	3	75,0	45	18,8	0,025	13,000
DRB1*12	0	0,0	5	2,1	1,000	—
DRB1*13	0	0,0	57	23,8	0,576	—
DRB1*14	0	0,0	18	7,5	1,000	—
DRB1*1501	2	50,0	33	13,8	0,100	6,273
DRB1*16	0	0,0	14	5,8	1,000	—

Tabela VII-28. Frequências fenotípicas e valores de **p** e **OR** obtidos para o haplótipo HLA-DRB1*1501-DQA1*0102-DQB1*0602, em doentes com narcolepsia sem cataplexia (N) e população controlo (Pop. Controlo).

Haplótipo	N (N=4)		Pop. Controlo (N=175)		Teste Exacto Fisher (p)	Odds Ratio (OR)
	N	Freq.(%)	N	Freq.(%)		
DRB1*1501-DQA1*0102-DQB1*0602	2	50	22	12,6	0,087	6,955

7.1.8. Comparação entre hipersónia idiopática (HIP) e população controlo (Pop. Controlo)

Tabela VII-29. Frequências fenotípicas e valores de **p** e **OR** obtidos para o *locus* DQA1, em doentes com hipersónia idiopática (HIP) e população controlo (Pop. Controlo).

Alelo	HIP (N=9)		Pop. Controlo (N=216)		Teste Exacto Fisher (p)	Odds Ratio (OR)
	N	Freq.(%)	N	Freq.(%)		
DQA1*01	4	44,4	160	74,1	0,063	0,280
DQA1*0101	2	22,2	69	31,9	0,723	0,609
DQA1*0102	1	11,1	50	23,1	0,688	0,415
DQA1*0103	1	11,1	41	19,0	1,000	0,534
DQA1*0104	2	22,2	0,0	0,0	0,001	—
DQA1*02	0	0,0	66	30,6	0,061	—
DQA1*03	2	22,2	63	29,2	1,000	0,694
DQA1*04	1	11,1	8	3,7	0,312	3,250
DQA1*05	6	66,7	90	41,7	0,175	2,800
DQA1*06	0	0,0	4	1,9	1,000	—

Tabela VII-30. Frequências fenotípicas e valores de **p** e **OR** obtidos para o *locus* DQB1, em doentes com hipersónia idiopática (HIP) e população controlo (Pop. Controlo).

Alelo	HIP (N=9)		Pop. Controlo (N=220)		Teste Exacto Fisher (p)	Odds Ratio (OR)
	N	Freq.(%)	N	Freq.(%)		
DQB1*02	3	33,3	98	44,5	0,735	0,622
DQB1*03	3	33,3	131	59,5	0,168	0,340
DQB1*0301	2	22,2	80	36,4	0,496	0,500
DQB1*0302	0	0,0	37	16,8	0,361	_____
DQB1*0303	0	0,0	13	5,9	1,000	_____
DQB1*0304	0	0,0	1	0,5	1,000	_____
DQB1*04	0	0,0	10	4,5	1,000	_____
DQB1*05	4	44,4	86	39,1	0,741	1,247
DQB1*06	4	44,4	81	36,8	0,730	1,373
DQB1*0601	0	0,0	4	1,8	1,000	_____
DQB1*0602	2	22,2	26	11,8	0,303	2,132
DQB1*0603	3	33,3	38	17,3	0,205	2,395
DQB1*0604	0	0,0	11	5,0	1,000	_____
DQB1*0605	0	0,0	2	0,9	1,000	_____

Tabela VII-31. Frequências fenotípicas e valores de **p** e **OR** obtidos para o *locus* DRB1, em doentes com hipersónia idiopática (HIP) e população controlo (Pop. Controlo).

Alelo	HIP (N=9)		Pop. Controlo (N=240)		Teste Exacto Fisher (p)	Odds Ratio (OR)
	N	Freq.(%)	N	Freq.(%)		
DRB1*01	2	22,2	61	25,4	1,000	0,838
DRB1*03	3	33,3	49	20,4	0,400	1,949
DRB1*04	2	22,2	70	29,2	1,000	0,694
DRB1*07	0	0,0	72	30,0	0,063	_____
DRB1*08	1	11,1	17	7,1	0,497	1,640
DRB1*09	0	0,0	4	1,7	1,000	_____
DRB1*10	0	0,0	4	1,7	1,000	_____
DRB1*11	2	22,2	45	18,8	0,679	1,238
DRB1*12	0	0,0	5	2,1	1,000	_____
DRB1*13	2	22,2	57	23,8	1,000	0,917
DRB1*14	2	22,2	18	7,5	0,157	3,524
DRB1*1501	2	22,2	33	13,8	0,618	1,792
DRB1*16	0	0,0	14	5,8	1,000	_____

Tabela VII-32. Frequências fenotípicas e valores de **p** e **OR** obtidos para o haplótipo HLA-DRB1*1501-DQA1*0102-DQB1*0602, em doentes com hipersónia idiopática (HIP) e população controlo (Pop. Controlo).

Haplótipo	HIP (N=9)		Pop. Controlo (N=175)		Teste Exacto Fisher (p)	Odds Ratio (OR)
	N	Freq.(%)	N	Freq.(%)		
DRB1*1501-DQA1*0102-DQB1*0602	1	11,1	22	12,6	1,000	0,869

7.1.9. Comparação entre outras patologias de sono (OPS) e população controlo (Pop. Controlo)

Tabela VII-33. Frequências fenotípicas e valores de **p** e **OR** obtidos para o locus DQA1, em doentes com outras patologias de sono (OPS) e população controlo (Pop. Controlo).

Alelo	OPS (N=20)		Pop. Controlo (N=216)		Teste Exacto Fisher (p)	Odds Ratio (OR)
	N	Freq.(%)	N	Freq.(%)		
DQA1*01	16	80,0	160	74,1	0,789	1,400
DQA1*0101	3	15,0	69	31,9	0,134	0,376
DQA1*0102	8	40,0	50	23,1	0,107	2,213
DQA1*0103	5	25,0	41	19,0	0,555	1,423
DQA1*0104	2	10,0	0,0	0,0	0,007	—
DQA1*0105	2	10,0	0,0	0,0	0,007	—
DQA1*02	3	15,0	66	30,6	0,200	0,401
DQA1*03	5	25,0	63	29,2	0,801	0,810
DQA1*04	0	0,0	8	3,7	1,000	—
DQA1*05	8	40,0	90	41,7	1,000	0,933
DQA1*06	0	0,0	4	1,9	1,000	—

Tabela VII-34. Frequências fenotípicas e valores de **p** e **OR** obtidos para o *locus* DQB1, em doentes com outras patologias de sono (OPS) e população controlo (Pop. Controlo).

Alelo	OPS (N=20)		Pop. Controlo (N=220)		Teste Exacto Fisher (p)	Odds Ratio (OR)
	N	Freq.(%)	N	Freq.(%)		
DQB1*02	5	25,0	98	44,5	0,103	0,415
DQB1*03	10	50,0	131	59,5	0,479	0,679
DQB1*0301	2	10,0	80	36,4	0,024	0,194
DQB1*0302	0	0,0	37	16,8	0,050	—
DQB1*0303	0	0,0	13	5,9	0,609	—
DQB1*0304	0	0,0	1	0,5	1,000	—
DQB1*04	1	5,0	10	4,5	1,000	1,105
DQB1*05	8	40,0	86	39,1	1,000	1,039
DQB1*06	11	55,0	81	36,8	0,148	2,097
DQB1*0601	0	0,0	4	1,8	1,000	—
DQB1*0602	3	15,0	26	11,8	0,718	1,317
DQB1*0603	5	25,0	38	17,3	0,369	1,596
DQB1*0604	2	10,0	11	5,0	0,296	2,111
DQB1*0605	1	5,0	2	0,9	0,231	5,737

Tabela VII-35. Frequências fenotípicas e valores de **p** e **OR** obtidos para o *locus* DRB1, em doentes com outras patologias de sono (OPS) e população controlo (Pop. Controlo).

Alelo	OPS (N=20)		Pop. Controlo (N=240)		Teste Exacto Fisher (p)	Odds Ratio (OR)
	N	Freq.(%)	N	Freq.(%)		
DRB1*01	4	20,0	61	25,4	0,8	0,734
DRB1*03	2	10,0	49	20,4	0,382	0,433
DRB1*04	6	30,0	70	29,2	1,000	1,041
DRB1*07	3	15,0	72	30,0	0,202	0,412
DRB1*08	1	5,0	17	7,1	1,000	0,690
DRB1*09	0	0,0	4	1,7	1,000	—
DRB1*10	2	10,0	4	1,7	0,070	6,556
DRB1*11	6	30,0	45	18,8	0,242	1,857
DRB1*12	0	0,0	5	2,1	1,000	—
DRB1*13	8	40,0	57	23,8	0,114	2,140
DRB1*14	2	10,0	18	7,5	0,658	1,370
DRB1*1501	3	15,0	33	13,8	0,746	1,107
DRB1*16	1	5,0	14	5,8	1,000	0,850

Tabela VII-36. Frequências fenotípicas e valores de **p** e **OR** obtidos para o haplótipo HLA-DRB1*1501-DQA1*0102-DQB1*0602, em doentes com outras patologias de sono (OPS) e população controlo (Pop. Controlo).

Haplótipo	OPS (N=20)		Pop. Controlo (N=175)		Teste Exacto Fisher (p)	Odds Ratio (OR)
	N	Freq.(%)	N	Freq.(%)		
DRB1*1501-DQA1*0102-DQB1*0602	3	15	22	12,6	0,726	1,227

7.2. Resultados do programa de estatística SPSS para o TNFR11

Tabela VII-37. Frequências fenotípicas e valores de **p** e **OR** obtidos para os genótipos M/M, M/R, R/R em doentes com narcolepsia e cataplexia (NC) e narcolepsia sem cataplexia (N).

Genótipo	NC (N=19)		N (N=4)		Teste Exacto de Fisher (p)	Odds Ratio (OR)
	N	Freq. (%)	N	Freq. (%)		
M/M	11	57,9	2	50,0	1,000	1,375
M/R	8	42,1	2	50,0	1,000	0,727
R/R	0	0,0	0	0,0	-----	-----

Tabela VII-38. Frequências fenotípicas e valores de **p** e **OR** obtidos para os genótipos M/M, M/R, R/R em doentes do grupo N total e doentes com hipersónia idiopática (HIP).

Genótipo	N total (N=23)		HIP (N=9)		Teste Exacto de Fisher (p)	Odds Ratio (OR)
	N	Freq. (%)	N	Freq. (%)		
M/M	13	56,5	5	55,6	1,000	1,040
M/R	10	43,5	3	33,3	0,704	1,538
R/R	0	0,0	1	11,1	0,281	-----

Tabela VII-39. Frequências fenotípicas e valores de **p** e **OR** obtidos para os genótipos M/M, M/R, R/R em doentes do grupo N total e população controlo (Pop. Controlo).

Genótipo	N total (N=23)		Pop. Controlo (N=44)		Teste Exacto de Fisher (p)	Odds Ratio (OR)
	N	Freq. (%)	N	Freq. (%)		
M/M	13	56,5	25	56,8	1,000	0,988
M/R	10	43,5	16	36,4	0,606	1,346
R/R	0	0,0	3	6,8	0,546	-----

Tabela VII-40. Frequências fenotípicas e valores de **p** e **OR** obtidos para os genótipos M/M, M/R, R/R em doentes com narcolepsia e cataplexia (NC) e população controlo (Pop. Controlo).

Genótipo	NC (N=19)		Pop. Controlo (N=44)		Teste Exacto de Fisher (p)	Odds Ratio (OR)
	N	Freq. (%)	N	Freq. (%)		
M/M	11	57,9	25	56,8	1,000	1,045
M/R	8	42,1	16	36,4	0,779	1,273
R/R	0	0,0	3	6,8	0,547	-----

Tabela VII-41. Frequências fenotípicas e valores de **p** e **OR** obtidos para os genótipos M/M, M/R, R/R em doentes com hipersónia idiopática (HIP) e população controlo (Pop. Controlo).

Genótipo	HIP (N=9)		Pop. Controlo (N=44)		Teste Exacto de Fisher (p)	Odds Ratio (OR)
	N	Freq. (%)	N	Freq. (%)		
M/M	5	55,6	25	56,8	1,000	0,950
M/R	3	33,3	16	36,4	1,000	0,875
R/R	1	11,1	3	6,8	0,536	1,708

7.3. Grupos de doentes considerados e respectiva tipagem HLA e TNFRII

Tabela VII-42. Tipagem HLA e TNFRII para doentes com narcolepsia e cataplexia (NC) e apenas com narcolepsia (N) ¹.

Nº REGIS.	DIAGNOST	DRB1*	DQA1*	DQB1*	TNFRII
95297=95456=00086	NC	11,1501;DRB3+,DRB5+	0102,05	0301,0602	M/R
95384=95457	NC	07,1501;DRB4+,DRB5+	0102,02	02,0602	M/R
95455	NC	04,1501;DRB4,DRB5+	0102,03	03,0602	M/M
95458=99024	NC	07,1501;DRB4+,DRB5+	0102,02	02,0602	M/M
96385=01064	NC	01,13;DRB3+	0101,01	05,0603	M/M
97001	NC	07,08;DRB4+	02,04	02,04	M/M
97008	NC	04,1501;DRB4+,DRB5+	0102,03	03,0602	M/R
97126	NC	01,1501;DRB5+	0101,0102	05,0602	M/R
97259	NC	01,03;DRB3+	0101,05	02,05	M/M
98003	NC	01,1501;DRB5+	0101,0102	05,0602	M/M
98055	NC	03,07;DRB3+,DRB4+	02,05	02,X	M/R
98125	NC	1501,14;DRB3+,DRB5+	0102,X	0602,0604	M/M
98201	NC	1501,14;DRB3+,DRB5+	0102,0104	05,0602	M/M
99039	NC	04,11;DRB3+,DRB4+	03,05	0301,03	M/R
00022	NC	13,08;DRB3+	03,04	04,0603	M/R
00120	NC	1501,14;DRB3+,DRB5+	0102,05	03,0602	M/R
00251	NC	07,1501;DRB4+,DRB5+	02,0102	0602,02	M/M
00390	NC	13,1501;DRB3+,DRB5+	0102,05	03,0602	M/M
00569	NC	08,1501;DRB5+	0102,04	04,0602	M/M
95105	N	07,11;DRB3+,DRB4+	02,05	02,0301	M/R
95452=00380	N	11,1501;DRB3+,DRB5+	0102,05	03,0602	M/M
97182	N	03,04;DRB3+,DRB4+	03,05	02,0301	M/M
00112	N	11,1501;DRB3+,DRB5+	0102,05	03,0602	M/R

¹ NºREGIS.= nº com que foram registadas as amostras biológicas do doente, quando deram entrada no laboratório (Ex: 00112= 00 - Ano 2000 112 - nº doente); DIAGNOST = diagnóstico da patologia do doente.

Tabela VII-43. Tipagem HLA e TNFRII para doentes com hipersónia idiopática (HIP).

Nº REGIS.	DIAGNOST	DRB1*	DQA1*	DOB1*	TNFRII
97208	HIP	13,14;DRB3+	0103,0104	05,0603	MM
97237=00285	HIP	03,04;DRB3+,DRB4+	03,05	02,03	MM
97362=99023	HIP	1501,13;DRB3+,DRB5+	04,05	0602,0603	MM
98021	HIP	14,X;DRB3+	0104,01	05,0603	MM
98103	HIP	04,11;DRB3+,DRB4+	03,05	0301,X	R/R
98197	HIP	03,X;DRB3+	05,X	02,X	MM
98235	HIP	01,1501;DRB5+	0101,0102	05,0602	MR
99052	HIP	01,03;DRB3+	0101,05	02,05	MR
99092	HIP	08,11;DRB3+	05,X	03,0301	MR

Tabela VII-44. Tipagem HLA para doentes com outras patologias de sono (OPS).

Nº REGIS.	DIAGNOST	DRB1*	DQA1*	DQB1*
97349	OPS	11,X;DRB3+	0102,05	0301,0604
98222	OPS	11,13;DRB3+	0102,05	0301,0603
99001	OPS	03,X;DRB3+	0102,0103	02,04
99215	OPS	1501,08;DRB5+	0102,X	0602,X
00069	OPS	04,14;DRB3+,DRB4+	0104,03	03,05
00211	OPS	01,07;DRB4+	01,02	02,05
00227	OPS	10,13;DRB3+	0102,0105	05,0604
00261	OPS	03,0,4;DRB3+,DRB4+	03,05	02,03
00287	OPS	07,13;DRB4+	01,02	02,0605
00424	OPS	04,11;DRB3+,DRB4+	03,05	03,X
00526	OPS	01,07;DRB4+	0101,02	02,05
01004	OPS	11,1501;DRB3+,DRB5+	0102,05	03,0602
01102	OPS	04,13;DRB3+,DRB4+	03,05	03,X
01115	OPS	01,1501;DRB5+	0101,0102	05,0602
01125	OPS	04,11;DRB3+,DRB4+	03,05	03,X
01127	OPS	01,13;DRB3+	0101,0103	05,0603
01175	OPS	13,16;DRB3+,DRB5+	0102,0103	0603,X
01241	OPS	04,10;DRB4+	0105,01	03,05
01244	OPS	13,14;DRB3+	0103,0104	05,0603
01280	OPS	11,13;DRB3+	05,0103	0603,03

7.4. Tabelas população controlo HLA e TNFR11

Tabela VII-45. Frequências dos alelos dos *locus* DRB1, DQA1 e DQB1 em portugueses caucasoides.

DRB1 (N=240)	%	DQA1 (N=216)	%	DQB1 (N=220)	%
1	25,4	0101	31,9	0201	44,5
3	20,4	0102	23,1	0301	36,3
4	29,1	0103	18,9	0302	16,8
7	30,0	0201	30,5	0303	5,9
8	7,0	0301	29,1	0304	0,4
9	1,6	0401	3,7	0401	0,4
10	1,6	0501	41,6	0402	4,1
11	18,7	0601	1,8	0501	27,2
12	2,0			0502	6,3
13	23,7			0503	4,5
14	7,5			0504	0,9
15	13,8			0601	1,8
16	5,8			0602	11,8
				0603	17,2
				0604	5,0
				0605	0,9

Tabela VII-46. Haplótipo DRB1-DQA1-DQB1 em Portugueses caucasoides.

DRB1*-DQA1*-DQB1*	N	%
1 0101 0501	53	28,9
4 0300 0301	21	11,4
4 0300 0302	31	16,9
4 0300 0401	2	1,0
7 0201 0201	49	26,7
7 0201 0303	9	4,9
8 0401 0402	6	3,2
8 0601 0301	4	2,1
9 0300 0303	1	0,5
10 0101 0501	3	1,6
11 0501 0301	40	21,8
12 0501 0301	2	1,0
13 0102 0605	2	1,0
13 0103 0603	32	17,5
13 0102 0604	10	5,5
13 0501 0301	1	0,5
14 0101 0503	8	4,3
14 0501 0301	6	3,3
15 0102 0502	1	0,5
15 0102 0602	22	12
15 0103 0601	4	2,2
16 0102 0502	6	3,2
17 0501 0201	37	20,2
(N=175)		

Tabela VII-47. População controlo TNFRII.

Pop. Controlo	TIPAGEM TNFRII
1	M/R
2	M/R
3	M/M
4	M/M
5	M/R
6	M/M
7	M/R
8	M/M
9	M/R
10	M/M
11	M/R
12	M/M
13	M/M
14	M/M
15	M/M
16	M/R
17	M/R
18	M/R
19	M/R
20	M/M
21	M/M
22	M/M
23	M/R
24	M/R
25	M/M
26	M/M
27	M/M
28	M/M
29	M/M
30	R/R
31	M/M
32	M/M
33	M/M
34	R/R
35	M/M
36	M/R
37	M/R
38	M/M
39	M/R
40	M/M
41	M/R
42	M/M
43	R/R
44	M/M