

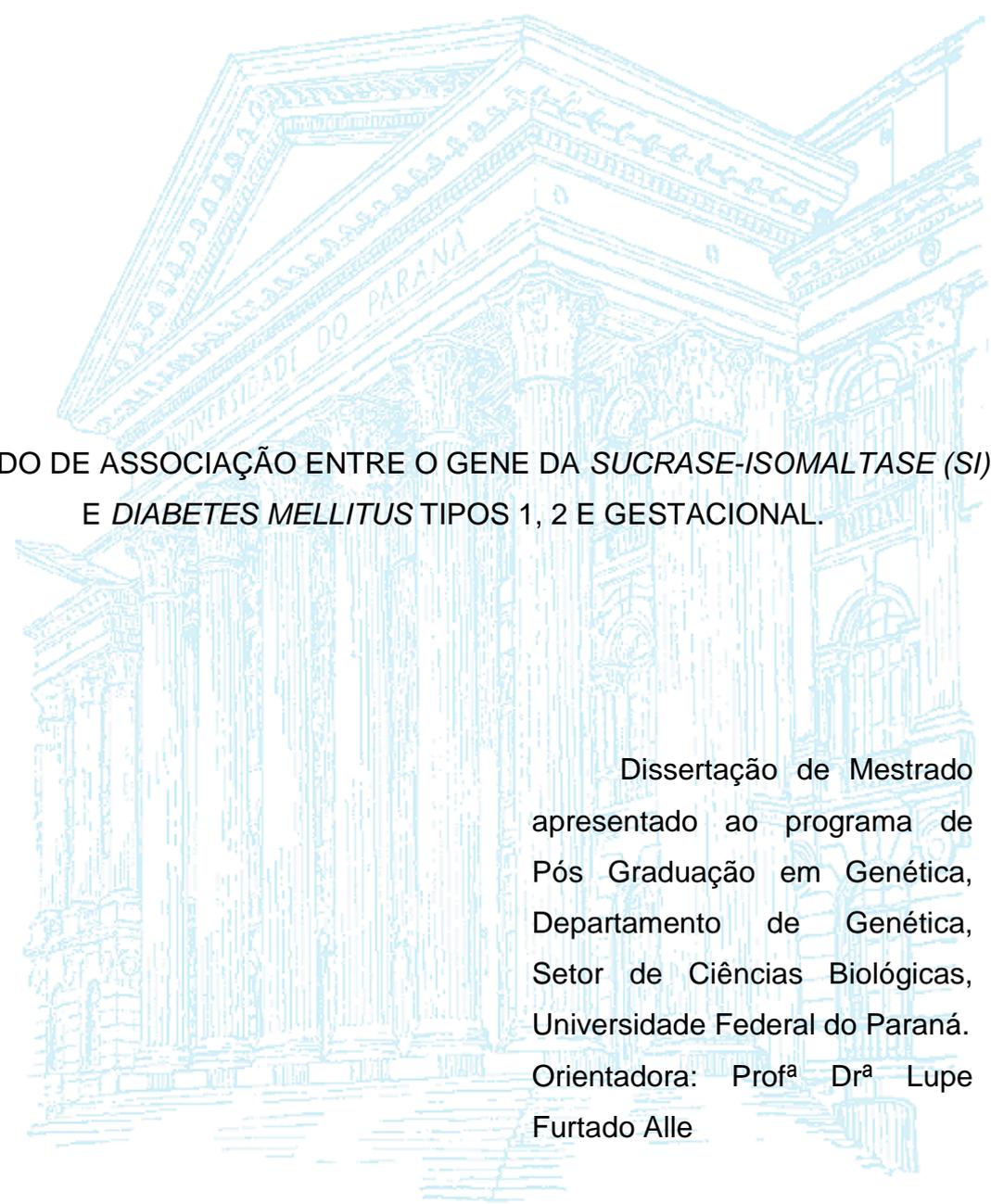
NALINI DRIELI JOSVIAK

ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO ENTRE O GENE DA *SUCRASE-ISOMALTASE (SI)*  
E *DIABETES MELLITUS* TIPOS 1, 2 E GESTACIONAL.

CURITIBA

2012

NALINI DRIELI JOSVIAK



ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO ENTRE O GENE DA *SUCRASE-ISOMALTASE* (SI)  
E *DIABETES MELLITUS* TIPOS 1, 2 E GESTACIONAL.

Dissertação de Mestrado  
apresentado ao programa de  
Pós Graduação em Genética,  
Departamento de Genética,  
Setor de Ciências Biológicas,  
Universidade Federal do Paraná.  
Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Lupe  
Furtado Alle

CURITIBA

2012

## AGRADECIMENTOS

À Deus, criador da vida e fornecedor de toda sabedoria para o desenvolvimento deste trabalho.

À minha família, em especial minha mãe (Vera) que sempre me apoiou na busca pelos meus sonhos, me proporcionando todo suporte psicológico e financeiro. Ao meu irmão Willman que sempre esteve disposto a ouvir e conversar sobre este trabalho, contribuindo inclusive na análise do meu resultado. À minha irmã Nicole pelos momentos de descontração, conversas e companhia. Vocês foram a minha base e o meu porto seguro.

Ao meu grande amor Deivity, pela paciência, apoio e companheirismo nos momentos de alegria e tristeza. Pelo auxílio nas ferramentas de informática e disposição com que sempre me ajudou. A você dedico todo meu amor, Obrigada.

À minha orientadora Professora Dra. Lupe Furtado-Alle, pelo exemplo de profissional como professora e orientadora. Sempre disposta a me ajudar em todos os momentos e dúvidas fossem elas simples ou complexas. Pela simpatia e disposição que sempre demonstrou em me orientar, por confiar em mim e no meu trabalho, pela amizade e palavras de conforto nos momentos mais difíceis que passei. Obrigada por tudo!

Ao meu co-orientador Professor Dr. Ricardo L. de Souza pela parceria na discussão dos resultados e auxílio na utilização dos Softwares para as análises.

À Professora Dra. Eleidi Freire Maia pela simpatia e atenção com que corrigiu este trabalho como participante da banca de acompanhamento.

A minha amiga Meire Batistella pela amizade, parceria e por toda ajuda que me forneceu durante o desenvolvimento deste trabalho.

Aos demais colegas do Laboratório de Polimorfismos e Ligação, em especial Dellyana Boberg e Natacha Baretto pelos momentos de descontração, conversas, risadas e confidências. Adoro vocês.

Ao Programa de Pós-Graduação em Genética da Universidade Federal do Paraná, por possibilitar a conclusão desta titulação.

Ao Programa de Reestruturação e Expansão das Universidades Federais (REUNI) pela disponibilidade de bolsa.

“A vida sem ciência é uma espécie de morte”

Sócrates.

## Resumo

A Sucrase - Isomaltase é uma glicoproteína integral de membrana codificada pelo gene Sucrase - Isomaltase ( SI ; 3q25 - q26 ) , exclusivamente expressa nas microvilosidades do intestino delgado e responsável pela digestão terminal de sacarose e amido . Sabe-se que em Diabetes Mellitus há um aumento na atividade de dissacaridases, incluindo a sucrase-isomaltase , mas até agora nenhum estudo de associação foi descrito entre a expressão aumentada e / ou atividade da sucrase - isomaltase e polimorfismos do gene SI. Estudos de associação do genoma inteiro identificaram loci associados com diabetes, entre essas regiões de associações está o cromossomo 3 . O objetivo deste estudo foi verificar a associação entre o gene SI e os três tipos de Diabetes Mellitus (tipo 1, tipo 2 e gestacional) por genotipagem de SNPs em estudo caso-controle. 865 amostras de caso-controle foram genotipadas para três tag SNPs no gene SI ( rs4557160 , rs7626281 e rs13095976 ) . Embora as frequências alélicas e genóticas terem sido semelhantes em pacientes e controles, três haplótipos de predisposição ao diabetes tipo 2 e um haplótipo de predisposição ao diabetes gestacional foram encontrados . Três haplótipos de proteção foram encontrados, um para diabetes gestacional e dois para diabetes tipo 2. Considerando estes resultados, sugerimos: 1) Como existem diferenças nas frequências de haplótipos entre casos e controles, estes haplótipos representam uma região de associação, assim, outra variante ou região, em desequilíbrio de ligação com esses haplótipos, pode ser responsável por contribuir para fenótipo de diabetes tipo 2 e diabetes gestacional . 2) Esses haplótipos podem ter um efeito regulador sobre a expressão do gene que está associado com diabetes tipo 2 e diabetes gestacional .

Palavras-Chave: Diabetes Mellitus , gene SI, tag SNPs

## **Abstract**

Sucrase-Isomaltase is an integral membrane glycoprotein encoded by Sucrase-Isomaltase gene (*SI*; 3q25-q26), exclusively expressed in the brush border membrane of small intestine and responsible for terminal digestion of sucrose and starch. It is known that in Diabetes Mellitus there is an increase in activity of disaccharidases, including Sucrase-Isomaltase, but so far no association study between increased expression and/or activity of sucrase-isomaltase and polymorphisms of *SI* gene has been described. Genome-wide association studies have identified susceptibility loci associated with diabetes, among these regions of associations is chromosome 3. The objective of this study was to verify the association between *SI* gene and three types of Diabetes Mellitus (Type 1, Type 2 and Gestational) by genotyping of SNPs in case-control study. 865 case-control samples were genotyped for three tag SNPs in the *SI* gene (rs4557160, rs7626281 and rs13095976). Although allele and genotype frequencies were similar in patients and controls, three haplotypes of predisposition to Type 2 Diabetes and one haplotype of predisposition to Gestational Diabetes were found. Three protective haplotypes were found, one for Gestational Diabetes and two for Type 2 Diabetes. Considering these results, we suggest: 1) As there are differences in the frequencies of haplotypes between cases and controls, this haplotypes represent one region of association, so another variant or region, in linkage disequilibrium with these haplotypes, can be responsible for contribute for phenotype of Type 2 Diabetes and Gestational Diabetes. 2) These haplotypes have a regulatory effect on gene expression that is associated with Type 2 Diabetes and Gestational Diabetes.

Keywords: Diabetes Mellitus, *SI* gene, tag SNPs

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO .....	1
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	3
2.1	<i>Diabetes Mellitus</i> – Aspectos Gerais.....	3
2.1.1	<i>Diabetes Mellitus</i> Tipo 1 .....	4
2.1.2	<i>Diabetes Mellitus</i> Tipo 2 .....	5
2.1.3	Outros tipos específicos de Diabetes .....	6
2.1.3.1	Diabetes Secundário ao Aumento de Função das Glândulas Endócrinas.....	6
2.1.3.2	Diabetes Secundário a doenças Pancreáticas .....	6
2.1.3.3	Resistência Congênita ou Adquirida à Insulina .....	7
2.1.3.4	Diabetes Associado à Poliendocrinopatias Auto-Imunes .....	7
2.1.3.5	Diabetes Associado à Desnutrição e Fibrocalculoso.....	7
2.1.3.6	Diabetes Relacionados à Anormalidade da Insulina (Insulinopatias) .....	7
2.1.3.7	Diabetes Tipo LADA (Diabetes Latente Auto-imune em Adultos) 8	
2.1.4	<i>Diabetes Mellitus</i> Gestacional.....	8
2.2	Base Genética do <i>Diabetes Mellitus</i> .....	11
2.2.1	<i>Diabetes Mellitus</i> tipo 1.....	11
2.2.2	<i>Diabetes Mellitus</i> tipo 2.....	12
2.2.3	<i>Diabetes Mellitus</i> Gestacional.....	14
2.3	Gene da Sucrase-Isomaltase (SI) .....	15
2.4	A Proteína Sucrase-Isomaltase.....	16
2.5	Variantes do gene <i>SI</i> .....	18
2.6	Sucrase-Isomaltase e <i>Diabetes Mellitus</i> .....	20
3	OBJETIVOS .....	22
3.1	Objetivos Gerais.....	22
3.2	Objetivos Específicos.....	22
4	JUSTIFICATIVA .....	23
5	MATERIAL E MÉTODOS .....	25
5.1	Amostras .....	25
5.1.1	<i>Diabetes Mellitus</i> tipos 1 e 2.....	25
5.1.2	<i>Diabetes Mellitus</i> Gestacional.....	25

5.2	Genotipagem dos Tag-SNPs no gene <i>SI</i> .....	26
5.2.1	Genotipagem por <i>Taq-Man</i> .....	27
5.3	Análise dos dados.....	29
6	RESULTADOS .....	30
6.1	Equilíbrio de Hardy-Weinberg .....	30
6.2	Frequências Genotípicas e Alélicas .....	31
6.3	Haplótipos .....	35
6.4	Desequilíbrio de Ligação.....	37
6.5	Regressão.....	40
7	DISCUSSÃO .....	42
8	CONCLUSÃO .....	50
9	REFERÊNCIAS .....	51

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1 – Estrutura do Gene <i>SI</i></b> .....	15
<b>Figura 2 – Localização a jusante do Gene <i>BCHE</i></b> .....	15
<b>Figura 3 – Característica estrutural do Pró-SI e modelo esquemático do Pró-SI em sua interação com a membrana plasmática</b> .....	17
<b>Figura 4 – Esquema do metabolismo de carboidratos no intestino deslgado</b> .....	18
<b>Figura 5 – Localização da substituição da glutamina por uma arginina no resíduo 117.....</b>	20
<b>Figura 6 – Localização dos genes <i>BCHE</i>, <i>SI</i> e região abrangida pelo loco IDDM9.....</b>	24
<b>Figura 7 – Genotipagem em casos para o SNP rs7626281</b> .....	28

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Equilíbrio de Hardy-Weimberg em amostras caso-controle em DM1.....	26
<b>Tabela 2.</b> Equilíbrio de Hardy-Weimberg em amostras caso-controle em DM2.....	26
<b>Tabela 3.</b> Equilíbrio de Hardy-Weimberg em amostras caso-controle em DMG.....	27
<b>Tabela 4.</b> Frequências genótípicas e alélicas para o rs4557160 em DM1.....	27
<b>Tabela 5.</b> Frequências genótípicas e alélicas para o rs7626281 em DM1.....	27
<b>Tabela 6.</b> Frequências genótípicas e alélicas para o rs13095976 em DM1.....	28
<b>Tabela 7.</b> Frequências genótípicas e alélicas para o rs4557160 em DM2.....	28
<b>Tabela 8.</b> Frequências genótípicas e alélicas para o rs7626281 em DM2.....	28
<b>Tabela 9.</b> Frequências genótípicas e alélicas para o rs13095976 em DM2.....	28
<b>Tabela 10.</b> Frequências genótípicas e alélicas para o rs4557160 em DMG.....	29
<b>Tabela 11.</b> Frequências genótípicas e alélicas para o rs7626281 em DMG.....	29
<b>Tabela 12.</b> Frequências genótípicas e alélicas para o rs13095976 em DMG.....	29
<b>Tabela 13.</b> Comparação das frequências genótípicas e alélicas entre casos e controles para os SNPs em DM1.....	30
<b>Tabela 14.</b> Comparação das frequências genótípicas e alélicas entre casos e controles para os SNPs em DM2.....	30
<b>Tabela 15.</b> Comparação das frequências genótípicas e alélicas entre casos e controles para os SNPs em DMG.....	31
<b>Tabela 16.</b> Frequencia de haplótipos para os SNPs em casos e controles de DM1.....	34

<b>Tabela 17.</b> Frequencia de haplótipos para os SNPs em casos e controles de DM2.....	35
<b>Tabela 18.</b> Frequencia de haplótipos para os SNPs em casos e controles de DMG.....	36
<b>Tabela 19.</b> Desequilíbrio de ligação entre SNPs em DM1 .....	36
<b>Tabela 20.</b> Desequilíbrio de ligação entre SNPs em controle de DM1 .....	37
<b>Tabela 21.</b> Valores do desequilíbrio de ligação entre SNPs em casos e controles de DM1.....	37
<b>Tabela 22.</b> Desequilíbrio de ligação entre SNPs em DM2 .....	37
<b>Tabela 23.</b> Desequilíbrio de ligação entre SNPs em controles de DM2 .....	38
<b>Tabela 24.</b> Valores do desequilíbrio de ligação entre SNPs em casos e controles de DM2.....	38
<b>Tabela 25.</b> Desequilíbrio de ligação entre SNPs em DMG .....	38
<b>Tabela 26.</b> Desequilíbrio de ligação entre SNPs em controles de DMG .....	39
<b>Tabela 27.</b> Valores do desequilíbrio de ligação entre SNPs em casos e controles de DMG.....	39
<b>Tabela 28.</b> Análise de Regressão onde DM1 foi a variável dependente.....	40
<b>Tabela 29.</b> Análise de Regressão onde DMG foi a variável dependente.....	40
<b>Tabela 30.</b> Comparação das frequências alélicas em diferentes populações e em amostras controle de DM1 e DM2.....	32
<b>Tabela 31.</b> Comparação das frequências alélicas em diferentes populações e em amostras controle de DMG.....	33

## 1 INTRODUÇÃO

O *Diabetes Mellitus* (DM) é caracterizado como uma síndrome de etiologia múltipla decorrente da falta de insulina e/ou da incapacidade da insulina de exercer adequadamente seus efeitos. Caracteriza-se por hiperglicemia crônica, com distúrbio no metabolismo de carboidratos, lipídeos e proteínas, frequentemente acompanhada de dislipidemia, hipertensão arterial, disfunção endotelial e obesidade. As consequências do DM em longo prazo decorrem de alterações micro e macrovasculares que levam à disfunção, dano ou falência de vários órgãos. As complicações crônicas incluem a nefropatia, com possível evolução para insuficiência renal, a retinopatia, com a possibilidade de cegueira, neuropatia, risco de úlceras nos pés, amputações, artropatia de Charcot e manifestações de disfunção autonômica, incluindo disfunção sexual.

A Sucrase-Isomaltase é uma glicoproteína integral de membrana codificada pelo gene SI (3q25-q26), exclusivamente expressa nas microvilosidades da membrana do intestino delgado e responsável pela digestão terminal da dieta de sacarose e amido. Sabe-se que no *Diabetes Mellitus* tipos 1 e 2 há um aumento na atividade de dissacaridases, incluindo a Sucrase-Isomaltase, porém nenhum polimorfismo resultando no aumento da expressão e/ou atividade foi descrito até o momento. No entanto, foi encontrada, em trabalho anterior realizado por nosso grupo de pesquisa, associação entre dois SNPs (rs7624915 e rs4387996) a jusante do gene *BCHE* (3q26.1-q26.2) e *diabetes mellitus* tipo 1, sugerindo possível associação com variante em gene a jusante do gene *BCHE*. Outro estudo de associação entre *diabetes mellitus* gestacional com variantes a jusante do gene *BCHE*, indicou tendência do SNP rs7624915 diferir entre casos e controles. Outro achado importante em estudos de associação foi a identificação de um loco de susceptibilidade ao DM do tipo 1 (IDDM9) localizado no cromossomo 3 (3q22.3-q25.1). Estes resultados apontam para alguma variante a jusante do gene *BCHE* que possa estar associada ao *diabetes mellitus* tanto nos tipos 1 e 2 como no diabetes gestacional. Assim, pela sua funcionalidade e localização,

o gene *SI* torna-se um bom candidato para o estudo com SNPs objetivando a busca da real associação funcional.

Para verificar associação do gene *SI* e diabetes tipos 1, 2 e gestacional foi realizado um estudo caso-controle com tag-SNPs dentro do gene *SI* que capturam grande parte dos alelos do gene ( $r^2 = 0.929$ ).

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 *Diabetes Mellitus* – Aspectos Gerais

Caracterizada como uma síndrome de etiologia múltipla, o *diabetes mellitus* (DM) é decorrente da falta de insulina e/ou da incapacidade da insulina de exercer adequadamente seus efeitos. Caracteriza-se por hiperglicemia crônica, com distúrbio no metabolismo de carboidratos, lipídeos e proteínas, frequentemente acompanhada de dislipidemia, hipertensão arterial, disfunção endotelial e obesidade. As consequências do DM em longo prazo decorrem de alterações micro e macrovasculares que levam à disfunção, dano ou falência de vários órgãos. As complicações crônicas incluem a nefropatia, com possível evolução para insuficiência renal, a retinopatia, com a possibilidade de cegueira, neuropatia, risco de úlceras nos pés, amputações, artropatia de Charcot e manifestações de disfunção autonômica, incluindo disfunção sexual.

Indivíduos com diabete apresentam risco maior de doença vascular aterosclerótica, como doença coronariana, doença arterial periférica e doença vascular cerebral. Os sintomas decorrentes de hiperglicemia acentuada incluem perda de peso, poliúria, polidipsia, embaçamento na visão, infecções repetidas na pele ou mucosas, difícil cicatrização, fadiga e dores nas pernas por causa da má circulação. Mesmo em indivíduos assintomáticos poderá haver hiperglicemia discreta, porém em grau suficiente para causar alterações funcionais ou morfológicas por um longo período antes que o diagnóstico seja estabelecido. Em suas formas mais severas, um estado de cetoacidose pode desenvolver estupor, coma e, na ausência de tratamento adequado, pode levar à morte. Em alguns casos não há sintomas e nestes casos o paciente pode passar muitos meses ou até anos para descobrir a doença. Os sintomas muitas vezes são vagos, como formigamento nas mãos e pés. Por isso a importância de se pesquisar o diabete em todas as pessoas com mais de 40 anos de idade (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2010).

A influência de fatores ambientais nesta doença é evidente, esses fatores podem ser agrupados em fatores de susceptibilidade introduzidos no ambiente (infecção viral, dieta, exposição a nitratos), e fatores de proteção

removidos do ambiente (“hipótese higiênica”, deficiência de vitamina D) (MERRIMAN *et al.*, 2009).

As classificações e os critérios diagnósticos para o *Diabetes Mellitus* sofreram modificações desde a década de 1980, objetivando a classificação etiológica adequada, para o estabelecimento da melhor terapia e do diagnóstico precoce, para se prevenir o aparecimento de complicações crônicas. A classificação atualmente recomendada utiliza os estágios clínicos do DM, desde a normalidade, passando por tolerância à glicose diminuída e/ou glicemia em jejum alterada, até o DM propriamente dito. A nova classificação, baseada na etiologia do DM, elimina os termos diabete melito insulino-dependente (IDDM) e não insulino-dependente (NIDDM) e sugere as seguintes classes clínicas: 1) *Diabetes Mellitus* do tipo 1 ou imunomediado; 2) *Diabetes Mellitus* do tipo 2; 3) Outros tipos específicos de *Diabetes Mellitus* e; 4) *Diabetes Mellitus* gestacional (PROJETO DIRETRIZES, 2004).

### **2.1.1 *Diabetes Mellitus* Tipo 1**

O DM do tipo 1 (DM1) é uma doença auto-imune que resulta primariamente da destruição das células beta pancreáticas e tem tendência à cetoacidose. Os marcadores da destruição imune incluem os auto-anticorpos contra as células das ilhotas, contra a insulina e contra a descarboxilase do ácido glutâmico (PROJETO DIRETRIZES, 2004). Corresponde de 5% a 10% do total de casos de diabete e tem incidência muito variável, podendo ir de 0,1/1.000.000/ano em uma região do interior da China a mais de 40/100.000/ano na Finlândia. Esta grande variação na incidência do DM1 entre os diferentes grupos étnicos provavelmente decorre de diferenças nos fatores genéticos e ambientais (DIB *et al.*, 2008).

A incidência do DM1 está aumentando nas populações mundiais nos últimos anos, especialmente entre crianças de 0 a 4 anos (ATKINSON *et al.*, 2001). Esses dados sugerem a participação de fatores ambientais no desenvolvimento do DM1. Fatores ambientais mais especificamente implicados são: a dieta (leite bovino, cereais e deficiência de vitamina D ou de ácidos graxos ligados ao ômega-3); viroses (enteroviroses); sedentarismo e

obesidade. Os dois últimos podem possibilitar a ocorrência simultânea de resistência à insulina e de auto-imunidade antiilhotas (“diabetes duplo”) (LIBMAN E BECKER, 2003).

### **2.1.2 *Diabetes Mellitus* Tipo 2**

DM do tipo 2 (DM2) resulta, em geral, de graus variáveis de resistência à insulina e deficiência relativa de secreção de insulina. A maioria dos pacientes tem excesso de peso e a cetoacidose ocorre apenas em situações especiais. O diabetes tipo 2 é cerca de 8 a 10 vezes mais comum que o tipo 1 e pode responder ao tratamento com dieta e exercício físico, somente em alguns casos necessitando de medicamentos orais (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2010).

Na maioria dos casos, o DM2 ocorre a partir dos 40 anos de idade. Abrange 85% a 90% do total de casos de diabetes, sendo que sua incidência vem crescendo entre crianças e jovens, em associação ao aumento da incidência de obesidade, o que pode causar ou agravar a resistência à insulina (OLIVEIRA, 2006). Sua etiologia específica não está claramente estabelecida como no diabetes do tipo 1, mas sabe-se que a destruição auto-imune do pâncreas não está envolvida (GROSS *et al.*, 2002). Além disso, ao menos inicialmente, e com frequência, ao longo da vida, esses indivíduos não necessitam do tratamento com insulina para sobreviverem (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2002). Devido a alimentação inadequada e ao sedentarismo crescente em nossos dias, o diabetes tipo 2 tem se tornado uma epidemia mundial, trazendo consigo aumento na ocorrência de complicações microvasculares (neuropatia, nefropatia e retinopatia) e macrovasculares (infarto agudo do miocárdio e acidente vascular cerebral).

Apesar de novas opções terapêuticas terem surgido na última década, essas complicações não têm diminuído como esperado. Embora passível de prevenção, em muitos pacientes, o aparecimento dessas complicações crônicas é, atualmente, quase inevitável. Logo, a prevenção se torna a medida mais importante, e isso inclui principalmente a mudança nos hábitos alimentares, diminuindo a ingestão de gorduras totais e saturadas, aumento na

ingestão de fibras e exercícios físicos para conseqüente perda de peso. (PROJETO DIRETRIZES, 2006).

### **2.1.3 Outros tipos específicos de *Diabetes***

Os outros tipos específicos de diabetes mencionados anteriormente baseados na classificação do Projeto Diretrizes ocorrem com menor frequência, sendo listados mais detalhadamente abaixo.

#### **2.1.3.1 *Diabetes* Secundário ao Aumento de Função das Glândulas Endócrinas**

Em determinadas doenças glandulares, quando ocorre aumento de função, a ação da insulina é de alguma maneira dificultada ou prejudicada, aparecendo diabetes em pessoas de alguma maneira predispostas. É o que pode ocorrer, por exemplo, com doenças da tireóide, doença de Cushing da suprarenal, acromegalia ou gigantismo da hipófise. Também pode aparecer na presença de tumores do sistema nervoso simpático (feocromocitoma) e de células alfa do pâncreas (glucagonoma) (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2010).

#### **2.1.3.2 *Diabetes* Secundário a doenças Pancreáticas**

Doenças que causam dano ao Pâncreas afetam a produção de insulina. Retirada cirúrgica de 75% do pâncreas, pancreatite crônica (inflamação geralmente causada pelo alcoolismo crônico) e destruição pancreática por depósito de ferro denominado hemocromatose (extremamente rara). Nesses casos, o diabete está associado à diarréia com perda de gordura nas fezes, pois o pâncreas, extensamente afetado, não produz enzimas digestivas suficientes (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2010).

### **2.1.3.3 Resistência Congênita ou Adquirida à Insulina**

A produção de insulina fica aumentada, porém com ação ineficaz por causa da diminuição ou defeito de receptores celulares, em tecido gorduroso, músculo e outros. Essas anormalidades, quando congênitas, podem ser defeito dos receptores de insulina e presença de anticorpos anti-receptores (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2010).

### **2.1.3.4 *Diabetes* Associado à Poliendocrinopatias Auto-Imunes**

Ocorrem em casos onde existem anticorpos anticélulas de ilhotas pancreática produtoras de insulina (Tipo 1). Destes, 20% apresentam anticorpos contra tireóide e (menos freqüentemente) anticorpos contra supra-renal, mucosa do estômago, músculo e glândulas salivares, além da ocorrência de vitiligo, alopecia (intensa queda de cabelos), hepatite crônica e candidíase (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2010).

### **2.1.3.5 *Diabetes* Associado à Desnutrição e Fibrocalculoso**

Ocorre em jovens de países tropicais com baixa ingestão protéica, freqüentemente associada a alimentos que contêm cianetos, como a mandioca amarga. Esta associação pode causar dano pancreático, com destruição das ilhotas e diminuição da produção de insulina (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2010).

### **2.1.3.6 *Diabetes* Relacionados à Anormalidade da Insulina (Insulinopatias)**

Uma alteração na estrutura molecular da insulina prejudica a sua função. Aplicando-se insulina, controla-se o *diabetes* (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2010).

### **2.1.3.7 Diabetes Tipo LADA (Diabetes Latente Auto-imune em Adultos)**

O LADA caracteriza-se pelo surgimento tardio do *Diabetes Mellitus* do Tipo 1 e atinge entre 2 e 12% dos casos, ou seja, 1,4 milhão de pessoas no Brasil. O LADA costuma ser confundido com DM2 e sua maior incidência concentra-se em pacientes entre 35 e 60 anos, magros e com cetose. O seu diagnóstico é feito pelo teste do anticorpo anti-descarboxilase do ácido glutâmico (GAD). A hereditariedade do diabetes tipo 1, doenças de Hashimoto e Graves devem ser levadas em conta num histórico familiar. Atualmente, não há um consenso na literatura médica para o tratamento do LADA. A manutenção do controle de glicemia é o principal objetivo do tratamento do portador do LADA. Um aspecto que deve ser levado em conta é a progressão lenta para a insulino-dependência, assim como um risco maior de complicações cardiovasculares para esses pacientes (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2010).

### **2.1.4 Diabetes Mellitus Gestacional**

*Diabetes Mellitus Gestacional* (DMG) é definido como qualquer nível de intolerância a carboidratos, resultando em hiperglicemia de gravidade variável, caracterizado pela insuficiência na função das células  $\beta$  pancreáticas em captar as partículas de insulina disponíveis (BUCHANAN *et al.*, 2007), com início ou diagnóstico durante a gestação. Sua fisiopatologia é explicada pela elevação de hormônios contra-reguladores da insulina, pelo estresse fisiológico imposto pela gravidez e a fatores predeterminantes (genéticos ou ambientais). O principal hormônio relacionado com a resistência à insulina durante a gravidez é o hormônio lactogênico placentário, contudo, sabe-se hoje que outros hormônios hiperglicemiantes como cortisol, estrógeno, progesterona e prolactina também estão envolvidos.

A gestação é um estado hiperinsulinêmico caracterizado por uma diminuição da sensibilidade à insulina, parcialmente explicada pela presença de hormônios diabetogênicos, tais como a progesterona, o cortisol, a prolactina e o hormônio lactogênico placentário. Os níveis glicêmicos de jejum tendem a

ser mais baixos na gestante, contudo, os valores pós-prandiais são mais altos, sobretudo naquelas em que não há aumento adequado da liberação de insulina (MAGANHA *et al.*, 2003). O DMG é considerado uma patologia grave, uma vez que pode provocar o nascimento de fetos macrossômicos, pré-eclâmpsia e ainda morte perinatal (SCHMIDT *et al.*, 2001). No Brasil, o Ministério da Saúde, a Sociedade Brasileira de Diabetes (SBD) e o Grupo de Trabalho em Diabetes e Gravidez (GTDG) recomendam que o rastreamento dessa enfermidade seja universal - a partir da vigésima semana de gestação (DODE E SANTOS, 2009).

Dependendo da população estudada e dos meios diagnósticos utilizados, a incidência de intolerância à glicose irá variar entre 3 e 10% das gestações, embora 80% ou mais desses casos apenas se apresentem durante a gravidez com rápidos episódios de hiperglicemia (LOBATO, 2002). Pacientes com DMG assemelham-se a pacientes com *Diabetes Mellitus* do tipo 2, já que apresentam uma diminuição ainda mais acentuada da sensibilidade periférica à insulina, além de uma secreção diminuída de insulina, explicando os picos pós-prandiais. Entretanto, a fisiopatologia do DMG não está totalmente elucidada. Se todas as gestantes fossem resistentes à insulina, a incidência do DMG seria superior aos níveis encontrados (MAGANHA *et al.*, 2003).

Alguns fatores são considerados de risco para o DMG tais quais: 1) idade superior a 25 anos; 2) obesidade ou ganho excessivo de peso na gravidez atual; 3) deposição central excessiva de gordura corporal; 4) história familiar de diabetes em parentes de 1º grau; 5) baixa estatura (1,50cm); 6) crescimento fetal excessivo, hipertensão ou pré-eclâmpsia na gravidez atual; 7) antecedentes obstétricos de morte fetal ou neonatal, de macrossomia ou de *diabetes mellitus* gestacional (REICHELDT *et al.*, 2002). Mulheres com menos de 25 anos de idade, com peso corpóreo normal, que não apresentem histórico familiar para o diabetes, histórico de metabolismo anormal de glicose ou ainda de insucesso obstétrico e não sejam membros de grupo étnico com alta prevalência de diabetes constituem um grupo com menor risco de desenvolver intolerância à glicose. No Brasil adotou-se como critério diagnóstico de DMG o teste oral de tolerância à glicose (TOTG) – 100 g, caracterizando como hiperglicemia na gestação (HGG) a determinação glicêmica das 8h (basal) às 18h a cada duas horas, mantendo-se ingestão de uma dieta geral com 2.840

kcal, fracionada em desjejum, almoço e lanche. São considerados valores normais os menores do que 90 mg/dL e 130 mg/dL para as condições de jejum e pós-prandiais, respectivamente. (SILVA *et al.*, 2003). Pelos critérios apresentados pela *American Diabetes Association* (2004), duas medidas excedendo esses valores já são suficientes para a detecção do DMG. O teste é uma medida da capacidade das células  $\beta$  de secretar insulina e da capacidade da insulina de reduzir a concentração de glicose no sangue (FOX, 2007).

Mulheres apresentando muitas características consideradas de risco para o DMG devem ser acompanhadas desde a primeira visita pré-natal, devendo ser submetidas ao teste de verificação dos níveis de glicose. Se as dosagens compatíveis com o diagnóstico de DMG não forem observadas no primeiro teste, mas a paciente apresentar fatores de risco à doença, ela deverá ser acompanhada até a 24<sup>a</sup> - 28<sup>a</sup> semana de gestação. Na presença de hiperglicemia, o diagnóstico deve ser confirmado em um dia subsequente (American Diabetes Association, 2004).

Deve-se salientar que não é pequena a quantidade de problemas que contribuem para a mortalidade perinatal em gestações diabéticas, dentre os quais podem ser citados macrossomia, traumatismos decorrentes do parto, hipoglicemia, hipocalcemia, icterícia, distúrbios respiratórios, malformações congênitas, policitemia com hiperviscosidade sanguínea, hipertrofia cardíaca, hipomagnesemia, natimortalidade, crescimento intrauterino retardado, entre outros. Em longo prazo, a prole resultante de gestações complicadas pelo diabetes pode sofrer de obesidade, diabetes e déficits neuropsicológicos (LOBATO, 2002).

Em estudo realizado no Canadá, com mulheres nos períodos pré e pós-parto, foram identificados quatro grupos metabolicamente distintos de tolerância à glicose na gravidez, cujas diferenças na sensibilidade à insulina, função das células  $\beta$  e no metabolismo da glicose persistiram nos três meses após o parto. Observa-se ainda que qualquer grau anormal na homeostase da glicose na gravidez (não apenas no DMG) prediz intolerância à glicose nos três meses após o parto. Assim, o rastreamento de DMG no período pré-parto é importante para identificação de risco futuro de pré-diabetes e diabetes do tipo 2 (RETNAKARAN *et al.*, 2008). Outro estudo realizado na Dinamarca

evidenciou que um ambiente intra-uterino hiperglicêmico parece estar primariamente envolvido na patogênese do *Diabetes Mellitus* do tipo 2/pré-diabetes. Este estudo foi realizado observando-se a descendência adulta de mulheres caucasianas com DMG em tratamento nutricional ou diabetes do tipo 1 durante a gravidez (CLAUSEN *et al.*, 2008).

## **2.2 Base Genética do *Diabetes Mellitus***

O *Diabetes Mellitus* é uma doença multifatorial e sua etiologia está relacionada com vários genes e grande influência de fatores ambientais.

### **2.2.1 *Diabetes Mellitus* tipo 1**

Em DM1 há forte agrupamento de afetados em uma mesma família, com a taxa de recorrência entre irmãos de 6%, e a taxa de concordância entre gêmeos monozigóticos de 30% - 70% (TODD, *et al.*, 1990; KYVIK, *et al.*, 1995, LAINE, *et. Al.*, 2004).

Muitos estudos têm sido feitos visando identificar os fatores genéticos para a susceptibilidade ao DM1, fazendo com que essa desordem seja uma das mais bem estudadas entre as doenças complexas. (ALIZADEH *et al.*, 2008).

Muitos genes candidatos foram estudados para o DM1 nas últimas décadas, mas somente alguns poucos comprovadamente estão associados à desordem. Muitas das associações significativas iniciais não foram confirmadas em estudos independentes, algumas outras foram confirmadas inconsistentemente, e somente algumas se mostraram consistentemente associadas por diferentes trabalhos, identificando fatores de risco para o DM1. Estudos com microssatélites encontraram ligação de DM1 com 18 regiões (Loci IDDM1 – IDDM18). Sendo IDDM1 (6p21) o maior loco de suscetibilidade ao DM1, nele encontram-se genes DQB1, DQA1 e DRB1 do complexo MHC, responsáveis por aproximadamente 50% do risco genético para o desenvolvimento da doença. Em segundo lugar está o loco IDDM2 (11p15), próximo ao gene da Insulina (*INS*). VNTRs antes do gene possuem forte

associação funcional (MEIN *et al.*, 1998; LAINE *et al.*, 2004). LAINE *et al.*, (2004) estudaram ligação de quatro microssatélites no loco IDDM9 (D3S1269, D3S3576, D3S3620, D3S1303) e encontraram o maior valor de lod score para o marcador D3S3576, próximo do gene CD86 responsável por codificar uma proteína ligante das células T apresentadoras de antígeno (CTLA4). Funcionalmente, a interação de CD86 com CTLA diminui a resposta imune. MEIN *et al.*, (1998) encontraram dois picos de lod score correspondentes aos microssatélites D3S1576 e D3S1279, que abrangem a região 3q22-q25, sugerindo uma boa região para caminhada em busca de real associação funcional.

Em trabalhos anteriores da nossa equipe de pesquisa (LEPIENSKI, 2004; OLIVEIRA, 2006), foram encontradas associações entre a idade de aparecimento do DM1 e variações no gene *BCHE* (3q26.1-q26.2) da butirilcolinesterase humana. LEPIENSKI *et al.*, (2004) mostraram que os portadores da variação K (nucleotídeo 1615) apresentam risco aumentado de apresentar DM1 com idade  $\leq 12$  anos. Ao estudar as variações do nucleotídeo -116 do exon 1 desse gene, em conjunto com as variações do nucleotídeo 1615 (exon 4), OLIVEIRA (2006) mostrou que a presença conjunta de -116A e da mutação K aumenta ainda mais o risco do aparecimento precoce do DM1. Entretanto, a autora não descarta a possibilidade de um outro gene próximo e em desequilíbrio de ligação com essas variantes, ser o responsável pelo aparecimento precoce.

FERNANDES (2010) encontrou associação com dois tag-SNPs a jusante do gene *BCHE* (3q26.1-26.2) e a montante do gene *SI* (3q25-q26), gene que se encontra parcialmente dentro da região de ligação IDDM9. Esses achados sugerem esta região como boa candidata para estudos de associação com tag-SNPs.

### **2.2.2 Diabetes Mellitus tipo 2**

Os fatores genéticos no DM2 têm um papel importante, evidenciado pela alta taxa de concordância em gêmeos idênticos (VOGEL E MOTULSKY, 2000).

Uma história de diabetes do tipo 2 em parentes de primeiro grau duplica o risco ao diabete (ELBEIN, 1997).

No momento, são conhecidos alguns genes implicados em formas monogênicas de diabetes (MODY, diabetes mitocondrial), no entanto, nas formas mais comuns e de caráter poligênico, sabe-se apenas de poucos genes que são associados à doença de uma forma reprodutível nos diferentes grupos populacionais estudados. Cada um destes poligenes apresenta um papel isolado muito pequeno, atuando na modulação de fenótipos associados ao diabetes (REIS E VELHO, 2002).

Segundo uma meta-análise publicada no ano de 2009, alguns genes podem ser considerados para a melhor compreensão das bases genéticas do diabetes do tipo 2. O primeiro gene candidato a ser fortemente associado à doença foi o *TCF7L2*, que foi avaliado em outros estudos com pacientes de outras etnias. Os genes *IGF2BP2*, *CDKAL1*, *CDKN2A/B*, *HHEX*, *SLC30A8* e *KCNJ11* mostraram associação em japoneses; os genes *IGF2BP2*, *SLC30A8*, *HHEX*, *CDKAL1*, *CDKN2A/B* e *FTO*, em asiáticos de Hong Kong e da Coréia; *CDKAL1*, *CDKN2A/B*, *HHEX* e *SLC30A8* em chineses da etnia Han; e *IGF2BP2*, *PPARG2* e *FTO* em Índios Siques (SANGHERA *et al.*, 2009), entre outros estudos.

Uma variedade de fatores ambientais pode estar envolvida na expressão clínica do diabetes do tipo 2, tais quais, grau e tipo de obesidade, sedentarismo, má nutrição nos períodos fetal e perinatal e diferentes tipos de drogas tais quais esteróides, diuréticos e agentes anti-hipertensivos. Ressalta-se que a obesidade, um dos chamados determinantes ambientais para esta doença, está claramente sob controle genético (VELHO E FROGUEL, 1997).

Como a obesidade e o *diabetes mellitus* do tipo 2 aparecem frequentemente associados, acredita-se que possam apresentar genes em comum para explicar sua base genética. Estes genes desfavoráveis atuam em fenótipos intermediários do diabetes que irão influenciar na homeostase glicídica como massa gordurosa, sensibilidade à insulina, padrão secretório da insulina (REIS E VELHO, 2002).

### 2.2.3 *Diabetes Mellitus Gestacional*

Existem relativamente poucas pesquisas que visam compreender as bases genéticas do *Diabetes Mellitus Gestacional*. Dentre os fatores que dificultam os estudos genéticos desta patologia estão encontrar e acompanhar mulheres que pretendam ficar grávidas – o acompanhamento no período anterior à gravidez é importante, já que é feito todo um estudo baseado no histórico das pacientes; e encontrar famílias com múltiplos casos de DMG, o que está parcialmente relacionado à baixa prevalência da doença (WATANABE *et al.*, 2007). Sabe-se que entre mulheres com risco prévio para o DMG, aquelas com histórico familiar de *Diabetes Mellitus* do tipo 2, mais provavelmente apresentam não apenas fatores de risco para doenças cardiovasculares, incluindo síndrome metabólica e diabetes do tipo 2, mas também risco aumentado de já terem vivenciado eventos cardiovasculares em idade precoce (CARR *et al.*, 2006). Por causa de tais associações, pode-se esperar que genes relacionados à patogênese das doenças cardiovasculares também possam estar envolvidos no desenvolvimento do *Diabetes Mellitus Gestacional*.

A predisposição genética ao DMG foi relatada por variações nos genes codificadores do receptor de insulina (INSR), fator de crescimento semelhante à insulina 2 (IGF2), receptor  $\beta$ 3-adrenérgico (ADRB3), entre outros genes importantes. Entretanto, muitos estudos mostram-se controversos, o que pode estar relacionado ao baixo poder dos testes utilizados, ao pequeno efeito de muitas variantes comuns ou à heterogeneidade das populações (SHAAT *et al.*, 2005). Os estudos realizados por SHAAT *et al.* (2005 e 2007) analisaram o efeito de genes de proteínas envolvidas no mecanismo do canal de potássio e observaram que o polimorfismo E23K do gene *KCNJ11* parece predispor ao DMG em mulheres escandinavas e que a variante 7903146 do gene *TCF7L2*, que codifica um fator de transcrição, também apresenta associação com o DMG.

Como observado, muitas lacunas permeiam a compreensão da etiologia do diabetes em suas diversas formas. Esta incompreensão começa a estimular os cientistas a realizarem análises moleculares, principalmente com genes

candidatos à doença e genes associados a outros distúrbios metabólicos que interferem no *Diabetes Mellitus*.

### 2.3 Gene da *Sucrase-Isomaltase (SI)*

O gene SI compreende as regiões 25 e 26 no braço longo do cromossomo 3 (3q25-q26), possui uma sequência de 106.561 nucleotídeos com 48 regiões codificadoras (éxons - figura 1) e encontra-se a jusante do gene da *Butirilcolinesterase* humana (*BCHE* - figura 2). Codifica uma enzima, a *Sucrase-Isomaltase*, que se expressa nas microvilosidades do intestino delgado. A proteína codificada é sintetizada como uma proteína precursora, pro-SI, que é clivada por proteases pancreáticas em duas subunidades enzimáticas, *Sacarase* e *Isomaltase*. Estas duas subunidades heterodimerizam para formar o complexo *Sucrase-Isomaltase*. Este complexo é essencial para a digestão dos carboidratos da dieta incluindo amido e sacarose. (NCBI, acessado em 18/07/ 2010).



Figura 1 – ESTRUTURA DO GENE SI. FONTE: NCBI, acessado em 18/07/ 2010.

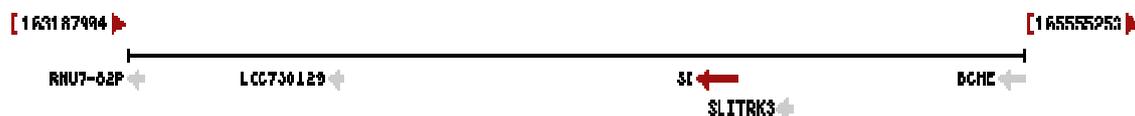


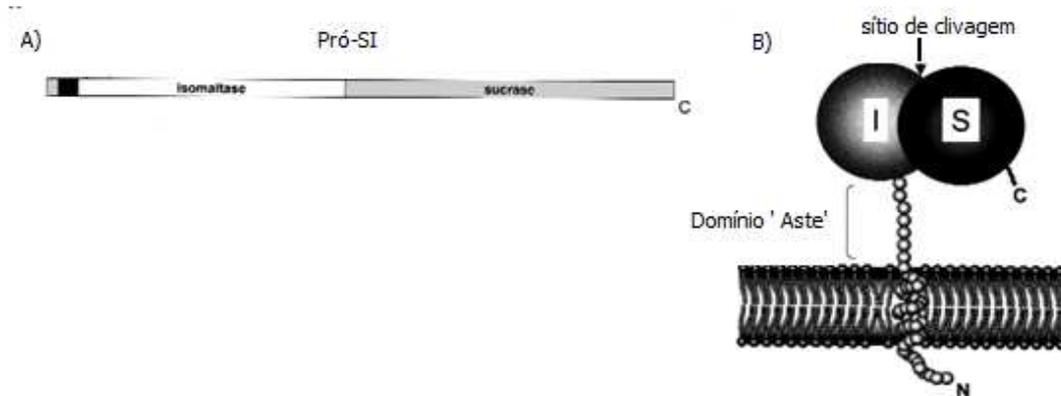
Figura 2 – LOCALIZAÇÃO A JUSANTE DO GENE *BCHE*. FONTE: NCBI, acessado em 18/07/ 2010.

## 2.4 A Proteína Sucrase-Isomaltase

A Sucrase-Isomaltase é uma glicoproteína integral de membrana, composta por 1827 aminoácidos, exclusivamente expressa nas microvilosidades da membrana do intestino delgado e é responsável pela digestão terminal de sacarose e amido. É formada por duas subunidades enzimáticas, sacarase e isomaltase, conhecida como complexo SI (OUWENDIJK *et al.*, 1996; HUNZIKER *et al.*, 1986).

As duas subunidades do complexo SI são altamente homólogas, compartilhando mais de 35% de sequências de aminoácidos e 41% de sequências conservadas. A estreita relação entre essas duas subunidades levou à concepção de que o gene *SI* (*Sucrase-Isomaltase*) foi originado por duplicação gênica (JACOB *et al.*, 2002).

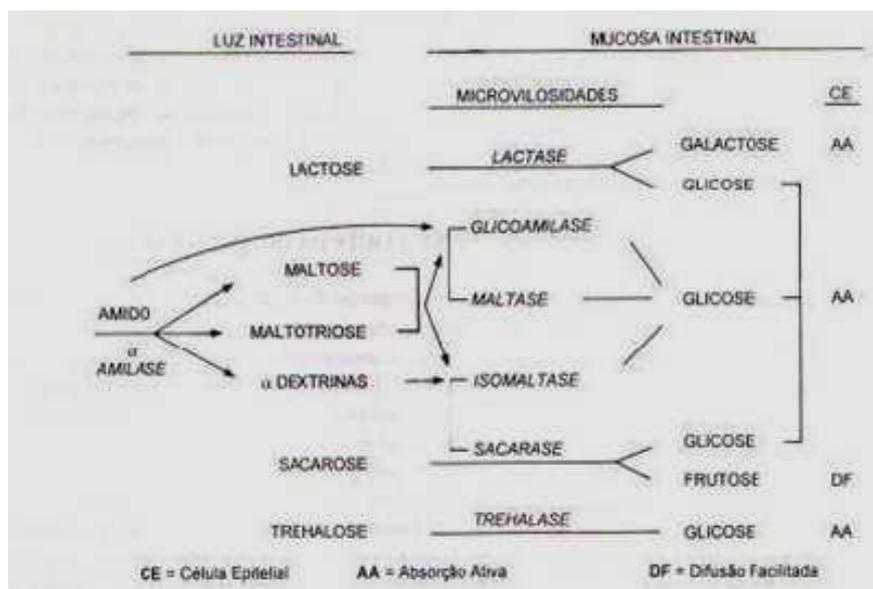
O complexo SI é formado a partir de um longo peptídeo precursor rico em manose, pro-SI (figura 3). A extremidade citoplasmática contém 12 resíduos de aminoácidos seguido pelo domínio intramembrana com 20 aminoácidos e um domínio de 'aste'/suporte (intracelular), com 28 aminoácidos, rico em serina e tirosina; ambos são considerados parte da subunidade isomaltase. A subunidade isomaltase termina com o aminoácido arginina e a subunidade sacarase começa imediatamente após com o aminoácido leucina, e é exatamente na região arg/leu o sítio de clivagem para a formação das duas subunidades ativas. O pro-SI é sintetizado nos ribossomos do retículo endoplasmático rugoso e transportado para o complexo de Golgi onde ocorre a glicosilação preferencialmente na região rica em ser/thr do domínio 'aste'. Essa glicosilação é o maior sinal para o transporte do pro-SI para a membrana apical do intestino (JACOB *et al.*, 2000). O pro-SI é então clivado por proteases pancreáticas no lúmen do intestino delgado, dando origem às duas subunidades enzimáticas ativas, ricas em manose, e que finalmente se mantêm por forte associação através de ligações covalentes e iônicas finalizando a digestão do amido e da sacarose (OUWENDIJK *et al.*, 1996).



**Figura 3** – (a) CARACTERÍSTICA ESTRUTURAL DO PRÓ-SI. (b) MODELO ESQUEMÁTICO DO PRÓ-SI EM SUA INTERAÇÃO COM A MEMBRANA PLASMÁTICA. FONTE: JACOB *et al.*, (2000)

A sacarose é um dissacarídeo formado a partir da ligação de dois monossacarídeos (glucose + frutose) por meio de ligações glicosídicas entre o carbono anomérico de um monossacarídeo e qualquer outro carbono do monossacarídeo seguinte, através de suas hidroxilas e com a saída de uma molécula de água.

O amido é um carboidrato complexo de reserva da célula vegetal que é constituído essencialmente pela mistura de dois polissacarídeos: a amilose e a amilopectina. O primeiro deles é um polímero linear, com cerca de 200 moléculas de glicose em sua estrutura; o segundo, composto por mais de mil moléculas de glicose, é um polímero altamente ramificado. As duas subunidades, isomaltase e a sacarase terminam a digestão do amido, porém a subunidade sacarase também digere sacarose (figura 4).



**Figura 4** – ESQUEMA DO METABOLISMO DE CARBOIDRATOS NO INTESTINO DELGADO. FONTE: CORRADINI *et al.*, (2005).

## 2.5 Variantes do gene *SI*

Mutações de ponto no gene *SI* são causa da deficiência de Sucrase-Isomaltase Congênita (CSID). CSID é um distúrbio autossômico recessivo do intestino delgado que leva a uma má digestão de carboidratos e se manifesta clinicamente como uma diarreia aquosa osmótica-fermentativa após a ingestão de dissacarídeos e polissacarídeos. Variantes neste gene podem afetar o transporte, processamento ou função do complexo SI. As células epiteliais dos pacientes com esta doença têm falta de atividade da sacarase da enzima SI, enquanto que a atividade isomaltase pode variar de ausente a praticamente normal (OUWENDIJK *et al.*, 1996; SANDER, *et al.*, 2006).

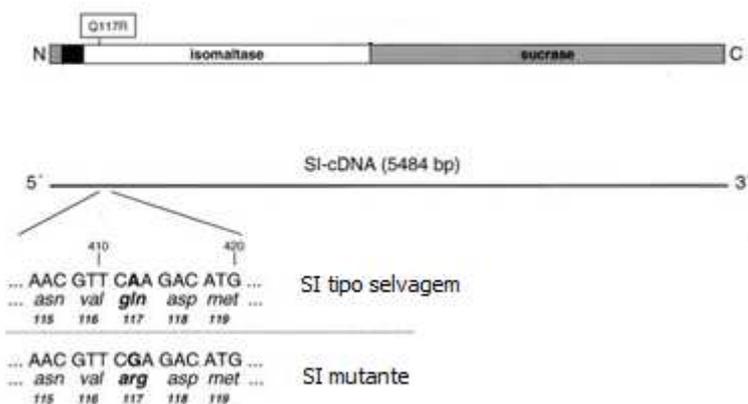
Algumas variantes alélicas já são bem conhecidas, a mutação de ponto A/G no nucleotídeo 4001 representa uma mutação sinônima, uma segunda variação C/G no nucleotídeo 3612 leva a um ácido glutâmico ao invés da glutamina no aminoácido 1203 da subunidade sucrase. A substituição A/C no nucleotídeo 3298 leva a uma substituição do aminoácido 1098 glutamina por uma prolina na subunidade sucrase resultando em um dos fenótipos da CSID, essa mutação de ponto cria um sinal ou uma mudança na conformação da

subunidade sucrase que detém o complexo enzimático no complexo de Golgi onde é degradada por um mecanismo de controle desconhecido (OUWENDIJK *et al.*, 1996). Uma substituição da leucina 620 por uma prolina, provocada pela mutação T/C no nucleotídeo 1859, também impede o transporte do pro-SI, ficando acumulado ainda no retículo endoplasmático (RITZ *et al.*, 2003).

Um outro fenótipo foi descrito por JACOB *et al.*, (2000) onde uma variação T/C no nucleotídeo 1021 que codifica para a subunidade isomaltase leva a uma substituição do aminoácido 340 leucina por uma prolina resultando em uma clivagem anormal do peptídeo precursor pro-SI que elimina o domínio transmembrana, esta clivagem ocorre ainda no retículo endoplasmático exatamente no determinado pela mutação (figura 5), o pro-SI erroneamente clivado é transportado para o complexo de Golgi e excretado para o lúmen intestinal como uma enzima ativa, porém apresenta meia-vida, impossibilitando sua função adequada. Um outro fenótipo da CSID resulta em uma distribuição aleatória do complexo SI para a membrana apical e basolateral. Neste caso, uma mutação de ponto A/G no nucleotídeo 412, região que codifica a subunidade isomaltase, leva a uma alteração de glutamina para arginina no resíduo 117 (figura 5). Esta variação não permite o reconhecimento da glicosilação por algum receptor específico desconhecido da membrana apical, sendo assim o complexo SI é transportado de forma aleatória para a membrana basal resultando em uma drástica redução da atividade de ambas as enzimas, sacarase e isomaltase (SPODSBERG *et al.*, 2001).

Um estudo realizado por SANTER *et al.*, (2006), com humanos portadores de CSID de descendência húngara, identificou duas novas mutações responsáveis pelo fenótipo da doença. A primeira é uma deleção de uma citosina no nucleotídeo 1648, resultando em um códon de parada prematuro e a segunda é uma transversão G/C que provavelmente causa um processamento defeituoso do pro-SI. Neste mesmo estudo foram encontradas mais nove variações que causam trocas de aminoácidos não conservativas e que podem representar alelos hipomórficos ou nulos.

Como observado, as variações descritas prejudicam a expressão da enzima no intestino delgado e/ou o seu funcionamento. Nenhuma variação resultando no aumento da expressão e/ou atividade foi descrita até o momento.



**Figura 5** – LOCALIZAÇÃO DA SUBSTITUIÇÃO DA GLUTAMINA POR UMA ARGININA NO RESÍDUO 117. FONTE: SPODSBERG *et al.*, (2001).

## 2.6 Sucrase-Isomaltase e *Diabetes Mellitus*

*Diabetes Mellitus* é um estado de inanição de nutrientes que frequentemente resulta de um metabolismo não balanceado e está associado ao aumento da digestão intestinal de carboidratos, proteínas e gorduras tanto quanto à absorção de glicose, aminoácidos e ácidos graxos (ADACHI *et al.*, 2003). No intestino delgado essa grave doença causa significantes mudanças na morfologia e função da mucosa e o aumento da atividade de dissacaridases, incluindo a sucrase-isomaltase, o que tem sido observado tanto em humanos (TANDON *et al.*, 1975) como em modelos animais. Alguns estudos sugerem que esse aumento possa ser devido à hiperplasia intestinal (MATSUO *et al.*, 1992), aumento na expressão de fatores transcricionais (TENNO *et al.*, 2000), pelo aumento da síntese da própria proteína SI ou queda na taxa de degradação da mesma, provavelmente pela diminuição de proteases intraluminais ou ainda alguma mudança estrutural do complexo que possa torná-lo resistente à degradação (OLSEN *et al.*, 1977). Entretanto, os mecanismos pelos quais a atividade da Sucrase-Isomaltase é aumentada ainda são pouco esclarecidos (TAKENOSHITA *et al.*, 1998). Em um estudo realizado por ADACHI *et al.* (2003), ratos com *diabetes mellitus* tipo 1 e tipo 2

apresentaram atividade da Sucrase-Isomaltase significativamente maior do que os controles, aumentando a digestão final de carboidratos, sugerindo que esse aumento na digestão possa ser umas das causas da hiperglicemia em *diabetes mellitus*.

Outros estudos também identificaram uma atividade de supressão da insulina na síntese de Sucrase-Isomaltase, sugerindo que a depleção de insulina induz diretamente o aumento da atividade do complexo SI nas células epiteliais esclarecendo porque esse aumento anormal é observado na maioria das vezes em *diabetes mellitus* tipo 1. Estudos com ratos diabéticos do tipo 1 normalizaram seu nível de expressão do complexo SI imediatamente após terem sido tratados com insulina, provavelmente pelo decréscimo no nível de expressão transcricional do gene que codifica este complexo (TAKENOSHITA *et al.*, 1998). Porém, ADACHI *et al.*, (1999) também mostraram que há um aumento anormal da expressão do complexo SI na progressão do diabetes tipo 2 em ratos, neste caso a insulina, por algum motivo, não pode funcionar bem para regular a expressão do gene SI e esta ação defeituosa resulta no aumento da expressão do complexo Sucrase-Isomaltase.

Assim, embora os resultados de estudos realizados até o momento sugiram que a atividade aumentada de SI pode não ser causa do *diabetes mellitus* e sim uma resposta fisiológica às modificações intestinais causadas pela doença, não há informação suficiente para se descartar um papel causal desta enzima na etiologia do *diabetes mellitus*. Além disso, a localização do gene SI, em uma região onde já foi encontrada associação com *diabetes mellitus*, justifica uma busca mais detalhada por meio de tag- SNPs.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivos Gerais

Verificar associação entre o gene *SI* e *Diabetes Mellitus* tipos 1, 2 e Gestacional através de estudo caso-controle.

#### 3.2 Objetivos Específicos

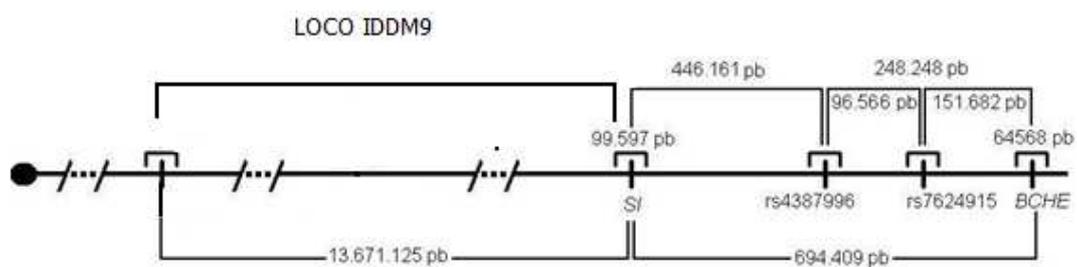
- ✓ Genotipar os tag-SNPs rs4557160, rs7626281 e rs13095976 que se encontram dentro do gene *SI* em pacientes com *diabetes mellitus* tipo 1 e respectivos controles e verificar se existe associação.
- ✓ Genotipar os tag-SNPs rs4557160, rs7626281 e rs13095976 que se encontram dentro do gene *SI* em pacientes com *diabetes mellitus* tipo 2 e respectivos controles e verificar se existe associação.
- ✓ Genotipar os tag-SNPs rs4557160, rs7626281 e rs13095976 que se encontram dentro do gene *SI* em pacientes com *diabetes mellitus* gestacional e respectivos controles e verificar se existe associação.
- ✓ Inferir os possíveis haplótipos para casos e controles nos grupos de *diabetes mellitus* tipos 1, 2 e gestacional e verificar se existe associação.
- ✓ Verificar se há associação de outras variáveis como LDL, HDL, Triglicérides e IMC com o *diabetes mellitus* tipos 1 e gestacional.

#### 4 JUSTIFICATIVA

O trabalho que deu origem a este estudo mostrou uma associação de DM tipo 1 com dois SPNs estudados (rs7624915 e rs4387996) localizados a jusante do gene da *BCHE* (FERNANDES, 2010) (Figura 6). Os microssatélites D3S1279 (MEIN *et al.*, 1998) e D3S3576 (LAINE *et al.*, 2004) indicaram ligação do loco IDDM9 com diabetes tipo 1, sendo que esta região inclui parcialmente o gene *SI*.

Outro dado importante foi o encontrado por GUIMARÃES, L. O. (2011), em estudo caso-controle com *diabetes mellitus* gestacional o SNP rs7624915 apresentou uma tendência a diferir entre os grupos amostrais avaliados, este SNP também encontra-se a jusante do gene *BCHE*.

A jusante do gene *BCHE* (~700Kb) e pertencente ao loco IDDM9 encontra-se o gene *SI* (Sucrase-Isomaltase), que tem como função a digestão terminal de dissacarídeos e polissacarídeos no intestino delgado (Figura 4). Estudos utilizando-se modelos animais com a doença mostram um aumento significativo na expressão e/ou atividade desta enzima (ADACHI *et al.*, 1999; ADACHI *et al.*, 2003; TAKENOSHITA *et al.*, 1998), sendo que a razão pela qual esse aumento ocorre ainda não está esclarecida e poucos estudos de associação estão sendo feitos em modelos humanos. Além disso, nenhuma variante do gene descrita até o momento parece estar associada com o desenvolvimento da doença, todas as descritas estão associadas à baixa expressão e/ou atividade da enzima resultando na Deficiência Congênita da Sucrase-Isomaltase. Por ser o gene a jusante da região onde foi encontrada associação com os SNPs (rs7624915 e rs4387996), o gene *SI* torna-se um bom candidato para o estudo de associação em modelos humanos com *diabetes mellitus*. Além disso, parte do gene *SI* encontra-se dentro da região de ligação IDDM9 (Figura 6), indicando o sentido da caminhada em busca da real associação funcional.



**Figura 6** – LOCALIZAÇÃO DOS GENES *BCHE* (3q26.1q26.2), *SI* (3q25-q26) E REGIÃO ABRANGIDA PELO LOC O IDD M9 (3q21-q25). FONTE: FERNANDES (2010).

## 5 MATERIAL E MÉTODOS

### 5.1 Amostras

#### 5.1.1 *Diabetes Mellitus* tipos 1 e 2

Foram utilizadas 174 amostras de pacientes com *diabetes mellitus* tipo 1 e 110 amostras de pacientes com *diabetes mellitus* tipo 2, ambas coletadas de pacientes do Hospital das Clínicas de Curitiba . As amostras controles para ambas os casos foram de 203 indivíduos não diabéticos e pareadas por grupo étnico, tais amostras de pacientes e controles já foram coletadas e estocadas em nosso laboratório por estudos anteriores, as quais foram submetidas ao protocolo de extração Salting Out (LAHIRI e NURNBERGER, 1991). As concentrações das amostras estoque foram medidas usando-se o aparelho Nanodrop da *Thermo Scientific*. Foi feita uma alíquota de uso com concentração de 20ng/µl.

#### 5.1.2 *Diabetes Mellitus* Gestacional

Amostras de pacientes com *diabetes mellitus* gestacional foram 143 e 235 amostras controles (gestantes não-diabéticas). Os critérios utilizados para a caracterização dos grupos de pacientes com DMG e do grupo controle estão de acordo com a Organização Mundial da Saúde (WHO, 2006) e com a Sociedade Brasileira de Diabetes (SBD, 2010), e são os seguintes: a) Grupo com *Diabetes Mellitus* gestacional (DMG) - gestantes apresentando glicemia de jejum superior a 100mg/dL com posterior confirmação através do teste oral de tolerância a glicose (TOTG) com 75g de sobrecarga, apresentando glicemia superior a 140 mg/dL após 2 horas à dose de glicose; e, b) Grupo controle - gestantes apresentando glicemia de jejum inferior a 85mg/dL. Não foram incluídas na amostra, pacientes com insuficiência renal e doença cardiovascular. O grupo de gestantes diabéticas foi obtido no Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná (Unidade de Diabetes do Serviço

de Endocrinologia e Metabologia do Hospital de Clínicas da UFPR- SEMPR) e as amostras para o grupo controle foram obtidas no Laboratório Municipal de Curitiba. As coletas foram realizadas entre os anos de 2007 e 2009. As pacientes concordaram em participar do estudo através da assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Setor de Ciências da Saúde da UFPR e pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Secretaria Municipal de Saúde da Prefeitura Municipal de Curitiba.

A extração de DNA genômico das amostras foi realizada pelo grupo do Laboratório de Bioquímica Clínica do Curso de Farmácia da Universidade Federal do Paraná. Os métodos de extração utilizados seguiram o protocolo descrito por LAHIRI e NURNBERGER (1991). Após a extração, o DNA genômico foi quantificado conforme WITTER e KUSUKAWA (2006). As amostras foram diluídas 1:50 com água ultra-pura e quantificadas por espectrofotometria em 260nm (Bio Photometer, *Eppendorf*). Todas as amostras de DNA foram padronizadas para a concentração de 20ng/ $\mu$ L, por diluição com água ultra-pura estéril. Alíquotas das amostras foram estocadas a -20°C no Laboratório de Polimorfismos e Ligação do Departamento de Genética – Universidade Federal do Paraná. Tais amostras também foram coletadas por estudo anterior.

## 5.2 Genotipagem dos Tag-SNPs no gene *SI*

Tag-SNPs constituem um conjunto de SNPs que capturam grande parte da variação genética em uma região, e podem ser usados em estudos de associação para reduzir o número de SNPs necessários para a detecção de associação, através de desequilíbrio de ligação entre uma característica de interesse e uma região do genoma (NCBI, Acessado em 16/11/2010). Foram escolhidos três tag-SNPs (rs4557160; rs7626281; rs13095976) dentro do gene *SI* que capturam grande parte dos alelos do gene ( $r^2 = 0.929$ ; acessado em <http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov> em 14/12/2010/).

### 5.2.1 Genotipagem por *Taq-Man*

A técnica de genotipagem por *Taq-Man* é baseada no método clássico de PCR (Polymerase Chain Reaction – Reação em Cadeia da Polimerase), que foi desenvolvido

por Kary Mullis na década de 80, permitindo aos pesquisadores amplificar regiões específicas de DNA em mais de 1 um bilhão de cópias.

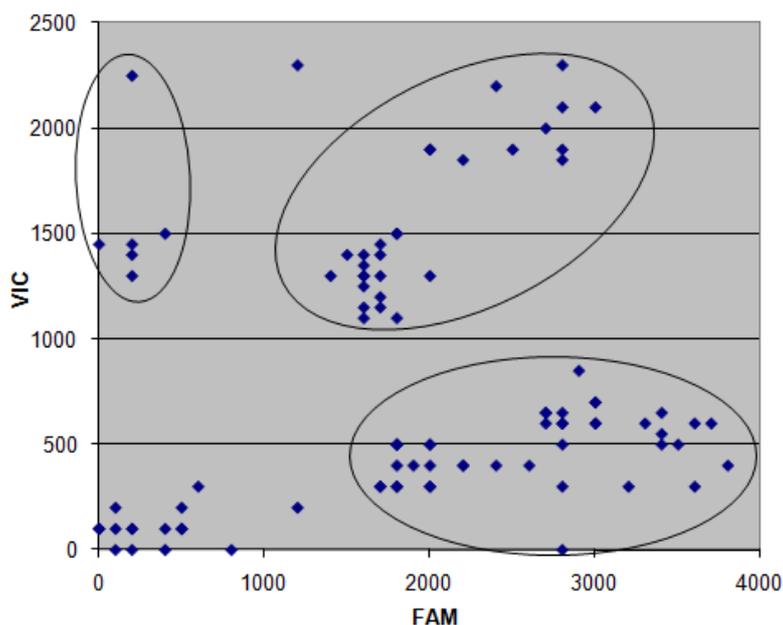
A grande vantagem da genotipagem por *Taq-Man* quando comparada com a PCR convencional é a possibilidade da detecção dos resultados na primeira fase da reação de amplificação (fase exponencial), considerada mais precisa. Na PCR convencional existe a necessidade da utilização de géis de poliacrilamida ou agarose, que normalmente consomem muito tempo e nem sempre garantem um resultado preciso, além de os resultados só poderem ser observados na última fase da reação (Fase Platô). Com a técnica de genotipagem por *Taq-Man* é possível fazer a genotipagem de tag-SNPs, que normalmente é feita com a enzima *AmpliTaq Gold R DNA Polimerase* com atividade exo-nuclease 5'. Esta atividade e o sistema *FRET* (Fluorescent Resonant Energy Transfer) permitem a detecção da reação de PCR em Tempo Real por emissão de fluorescência. Também são utilizadas sondas *TaqManR Probes* que são pequenos oligonucleotídeos específicos para cada SNP a ser analisado contendo os fluoróforos Repórter (extremidade 5') e Quencher (extremidade 3'), há dois tipos de fluorescência no fluoróforo Repórter representadas pela sigla FAM e VIC, cada uma responsável por se ligar a um alelo diferente, acrescidos de uma solução PCR Master Mix contendo todos os reagentes necessários para a reação de amplificação. As sondas se hibridizam especificamente em uma região entre os dois iniciadores. Se somente uma das fluorescências for liberada, é possível dizer que a amostra é homocigota para aquele alelo, se as duas forem detectadas, a amostra é considerada heterocigota possuindo os dois alelos marcados pelas sondas. Esta análise dos resultados é feita pela curva *melting*. Amostras que são homocigotas para qualquer um dos alelos, representam na curva uma mudança no sinal de apenas um dos dois fluoróforos. As amostras heterocigotas, quando analisadas

no software, resultam em uma mudança no sinal da fluorescência referente a ambos os fluoróforos.

A genotipagem por Taq-Man foi realizada pelo aparelho Mastercycler Realplex 2 da *Eppendorf*, localizado na Unidade de Sequenciamento e Análise de DNA - SEAD.

As reações foram feitas de acordo com os seguintes parâmetros: 1) 50°C por 2 minutos; 2) 95°C por 10 minutos; 3) 95°C por 15 segundos; 4) 62°C por 1 minuto; os passos 3 e 4 foram repetidos por 50 ciclos. As análises foram feitas com o software *Eppendorf realplex v. 1.5*.

Após o término de cada corrida, os valores dos picos de fluorescência para VIC e FAM eram anotados e transferidos para o *Microsoft Excel* onde eram gerados gráficos que possibilitavam a genotipagem visual para cada amostra (Figura 7).



**Figura 7** – GENOTIPAGEM EM CASOS PARA O SNP RS7626281. Os círculos identificam genótipos específicos e dados fora dos círculos são repetidos.

### 5.3 Análise dos dados

As frequências alélicas e genotípicas foram obtidas através da contagem direta do número de cromossomos e de indivíduos respectivamente, com o auxílio do *Microsoft Excel*.

O programa *BioEstat 3.0 for Windows* foi usado tanto para comparar as frequências alélicas, genotípicas e haplotípicas entre casos e controles como também para o teste do Equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Os testes para verificar o desequilíbrio de ligação entre as variantes analisadas foram realizados por meio do programa *Arlequin 3.0*. O programa *Arlequin* versão 3.0 também foi utilizado para inferência dos haplotípos, cálculo dos valores de D e D' e testes de  $\chi^2$  para o equilíbrio de Hardy-Weinberg.

As análises de Regressão foram realizadas pelo programa SPSS 13.0 for Windows.

Para todas as análises estatísticas foi considerado nível de significância ( $\alpha$ ) de 0,05.

## 6 RESULTADOS

### 6.1 Equilíbrio de Hardy-Weinberg

Todas as amostras caso-controle estavam em equilíbrio de Hardy-Weinberg para os três SNPs analisados (Tabelas 1, 2 e 3).

**Tabela 1** – VALORES DE P PARA O TESTE DE EQUILÍBRIO DE HARDY-WEINBERG EM AMOSTRAS CASO-CONTROLES PARA OS SNPS rs4557160, rs7626281 E rs13095976 REFERENTE A AMOSTRAS DM1 (GL=1).

SNPs	rs4557160	rs7626281	rs13095976
	$\chi^2_{(1)} (p)$	$\chi^2_{(1)} (p)$	$\chi^2_{(1)} (p)$
Casos	2,761	0,976	0,214
	(p>0,05)	(p>0,30)	(p>0,50)
Controles	2,973	1,830	1,052
	(p>0,05)	(p>0,10)	(p>0,30)

**Tabela 2** – VALORES DE P PARA O TESTE DE EQUILÍBRIO DE HARDY-WEINBERG EM AMOSTRAS CASO-CONTROLES PARA OS SNPS rs4557160, rs7626281 E rs13095976 REFERENTE A AMOSTRAS DM2 (GL=1).

SNPs	rs4557160	rs7626281	rs13095976
	$\chi^2_{(1)} (p)$	$\chi^2_{(1)} (p)$	$\chi^2_{(1)} (p)$
Casos	1,319	0,753	1,959
	(p>0,20)	(p>0,30)	(p>0,10)
Controles	2,973	1,830	1,052
	(p>0,05)	(p>0,10)	(p>0,30)

**Tabela 3** – VALORES DE **P** PARA O TESTE DE EQUILÍBRIO DE HARDY-WEINBERG EM AMOSTRAS CASO-CONTROLES PARA OS SNPS rs4557160, rs7626281 E rs13095976 REFERENTE A AMOSTRAS DMG (GL=1).

SNPs	rs4557160	rs7626281	rs13095976
	$\chi^2_{(1)} (p)$	$\chi^2_{(1)} (p)$	$\chi^2_{(1)} (p)$
Casos	0,001	1,898	2,242
	(p>0,95)	(p>0,10)	(p>0,05)
Controles	0,148	0,294	0,853
	(p>0,70)	(p>0,50)	(p>0,30)

## 6.2 Frequências Genotípicas e Alélicas

As frequências genotípicas e alélicas foram calculadas para os SNPs rs4557160, rs7626281 e rs13095976 para casos e controles em DM1, DM2 e DMG conforme as tabelas 4 a 12.

**Tabela 4** – FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS PARA O SNP rs4557160 EM AMOSTRAS DM1.

rs4557160	N	Frequências Genotípicas			Frequências Alélicas	
		CC (%)	CT (%)	TT (%)	T (%)	C(%)
Casos	174	29±3,44	44±3,44	27±3,44	48,8 ±2,67	51,2 ±2,67
Controles	203	30±3,22	44±3,22	26±3,22	47,5±2,47	52,5±2,47

**Tabela 5** – FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS PARA O SNP rs7626281 EM AMOSTRAS DM1.

rs7626281	N	Frequências Genotípicas			Frequências Alélicas	
		CC (%)	CT (%)	TT (%)	T(%)	C(%)
Casos	168	8±2,09	36±2,09	56±2,09	73,8±2,39	26,1±2,39
Controles	204	7±1,79	32±1,79	61±1,79	77,2±2,07	22,8±2,07

**Tabela 6** – FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS PARA O SNP rs13095976 EM AMOSTRAS DM1.

rs13095976	N	Frequências Genotípicas			Frequências Alélicas	
		CC (%)	CT (%)	TT (%)	T(%)	C(%)
Casos	169	26±3,37	48±3,37	26±3,37	50,0±2,71	50,0±2,71
Controles	200	17±2,66	53±2,66	30±2,66	57,2±2,47	42,8±2,47

**Tabela 7** – FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS PARA O SNP rs4557160 EM AMOSTRAS DM2.

rs4557160	N	Frequências Genotípicas			Frequências Alélicas	
		CC (%)	CT (%)	TT (%)	T (%)	C(%)
Casos	101	19±3,90	55±3,90	26±3,90	53,5±3,51	46,5±3,51
Controles	203	30±3,22	44±3,22	26±3,22	47,5±2,48	52,5±2,48

**Tabela 8** – FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS PARA O SNP rs7626281 EM AMOSTRAS DM2.

rs7626281	N	Frequências Genotípicas			Frequências Alélicas	
		CC (%)	CT (%)	TT (%)	T (%)	C(%)
Casos	109	5±2,08	44±2,08	60±2,08	75,2±2,92	24,8±2,92
Controles	203	7±1,79	32±1,79	61±1,79	77,2±2,08	22,8±2,08

**Tabela 9** – FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS PARA O SNP rs13095976 EM AMOSTRAS DM2.

rs13095976	N	Frequências Genotípicas			Frequências Alélicas	
		CC (%)	CT (%)	TT (%)	T (%)	C(%)
Casos	104	19±3,85	57±3,85	24±3,85	52,4±3,46	47,6±3,46
Controles	203	17±2,64	53±2,64	30±2,64	57,2±2,46	42,8±2,46

**Tabela 10** – FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS PARA O SNP rs4557160 EM AMOSTRAS DMG.

rs4557160	N	Frequências Genotípicas			Frequências Alélicas	
		CC (%)	CT (%)	TT (%)	T (%)	C(%)
Casos	138	19±3,34	49±3,34	32±3,34	56,5±2,98	43,5±2,98
Controles	199	22±2,84	51±2,84	27±2,84	52,3±2,50	47,7±2,50

**Tabela 11** – FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS PARA O SNP rs7626281 EM AMOSTRAS DMG.

rs7626281	N	Frequências Genotípicas			Frequências Alélicas	
		CC (%)	CT (%)	TT (%)	T (%)	C(%)
Casos	137	3±1,46	41±1,46	56±1,46	75,9±2,58	24,1±2,58
Controles	195	7±1,83	37±1,83	56±1,83	74,6±2,20	25,4±2,20

**Tabela 12** – FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS PARA O SNP rs13095976 EM AMOSTRAS DMG.

rs13095976	N	Frequências Genotípicas			Frequências Alélicas	
		CC (%)	CT (%)	TT (%)	T (%)	C(%)
Casos	132	24±3,72	43±3,72	33±3,72	54,2±3,07	45,8±3,07
Controles	185	21±2,99	46±2,99	33±2,99	55,9±2,58	44,1±2,58

As frequências genotípicas e alélicas entre as amostras caso e controle foram comparadas através do teste de qui-quadrado pelo programa *BioEstat 3.0* (Tabelas 13, 14 e 15).

**Tabela 13** – COMPARAÇÃO DAS FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS ENTRE CASOS E CONTROLES PARA OS SNPS rs4557160, rs7626281 E rs13095976 EM AMOSTRAS DM1 (GL=1 PARA FREQ. ALÉLICA E GL= 2 PARA FREQ. GENOTÍPICA).

SNP	$\chi^2_{(1)} (p)$	
	Genótipos	Alelos
rs4557160	0,12 (p = 0,94)	0,13 (p = 0,77)
rs7626281	1,12 (p = 0,57)	1,16 (p = 0,28)
rs1395976	4,72 (p = 0,09)	3,55 (p = 0,07)

**Tabela 14** – COMPARAÇÃO DAS FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS ENTRE CASOS E CONTROLES PARA OS SNPS rs4557160, rs7626281 E rs13095976 EM AMOSTRAS DM2 (GL=1 PARA FREQ. ALÉLICA E GL= 2 PARA FREQ. GENOTÍPICA).

SNP	$\chi^2_{(1)} (p)$	
	Genótipos	Alelos
rs4557160	3,77 (p = 0,15)	0,05 (p = 0,88)
rs7627281	2,55 (p = 0,28)	0,31 (p = 0,65)
rs1395976	1,68 (p = 0,43)	1,30 (p = 0,29)

**Tabela 15** – COMPARAÇÃO DAS FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS ENTRE CASOS E CONTROLES PARA OS SNPS rs4557160, rs7626281 E rs13095976 EM AMOSTRAS DMG (GL=1 PARA FREQ. ALÉLICA E GL= 2 PARA FREQ. GENOTÍPICA).

SNP	$\chi^2_{(1)} (p)$	
	Genótipos	Alelos
rs4557160	1,26 (p = 0,53)	1,19 (p = 0,31)
rs7627281	2,18 (p = 0,34)	0,14 (p = 0,77)
rs13095976	0,48 (p = 0,79)	0,09 (p = 0,85)

### 6.3 Haplótipos

As análises de Haplótipos foram efetuadas por meio do programa *Arlequin 3.1* (Tabelas 16, 17, 18).

**Tabela 16** – FREQUÊNCIA DOS HAPLÓTIPOS PARA rs4557160, rs7626281 E rs13095976 PARA CASOS E CONTROLES DE DM1. NÚMERO DE CROMOSSOMOS ANALISADOS EM CASOS= 324 E CONTROLES= 388; GL= 1.

Haplótipos	Frequências		Comparação Caso/Controle	
	Casos	Controles	$\chi^2_{(1)}(p)$	ODDS Ratio
TTT	3,3%	1,3%	3,00 (p= 0,08)	-
TCT	22,3%	31,6%	<b>7,16 (p= 0,01)</b>	0,62
TCC	25,6%	19,2%	<b>3,88 (p= 0,05)</b>	1,46
CTT	19,5%	19,0%	0,02 (p= 0,90)	-
CTC	4,4%	2,6%	1,21 (p= 0,27)	-
CCT	6,2%	5,6%	0,13 (p= 0,72)	-
CCC	18,8%	20,8%	0,46 (p= 0,56)	-

**Tabela 17** – FREQUÊNCIA DOS HAPLÓTIPOS PARA rs4557160, rs7626281 E rs13095976 PARA CASOS E CONTROLES DE DM2. NÚMERO DE CROMOSSOMOS ANALISADOS EM CASOS= 192 E CONTROLES= 388; GL= 1.

Haplótipos	Frequências		Comparação Caso/Controle	
	Casos	Controles	$\chi^2_{(1)}(p)$	ODDS Ratio
TTT	21,48%	5,84%	<b>32,06 (p= 0,00)</b>	4,31
TTC	41,22%	20,74%	<b>27,01 (p= 0,00)</b>	2,69
TCT	3,51%	18,79%	<b>24,04 (p= 0,00)</b>	0,16
TCC	---	2,56%	---	---
CTT	23,49%	31,76%	<b>4,27 (p= 0,04)</b>	0,66
CTC	6,06%	18,97%	<b>16,06 (p= 0,00)</b>	0,28
CCT	22,42%	1,33%	<b>74,98 (p= 0,00)</b>	22,11
CCC	1,16%	---	---	---

**Tabela 18** – FREQUÊNCIA DOS HAPLÓTIPOS PARA rs4557160, rs7626281 E rs13095976 PARA CASOS E CONTROLES DE DMG. NÚMERO DE CROMOSSOMOS ANALISADOS EM CASOS= 252 E CONTROLES= 342; GL= 1.

Haplótipos	Frequências		Comparação Caso/Controle	
	Casos	Controles	$\chi^2_{(1)}(p)$	ODDS Ratio
TTT	4,14%	12,35%	<b>11,11 (p= 0,00)</b>	0,30
TTC	32,15%	20,38%	<b>10,62 (p= 0,00)</b>	1,84
TCT	19,11%	13,84%	2,61 (p= 0,11)	---
TCC	1,75%	4,60%	2,78 (p= 0,10)	---
CTT	28,76%	26,29%	0,45 (p= 0,57)	---
CTC	11,53%	15,54%	1,96 (p= 0,16)	---
CCT	2,34%	4,25%	1,08 (p= 0,30)	---
CCC	---	2,76%	---	---

#### 6.4 Desequilíbrio de Ligação

Os valores de desequilíbrio de ligação foram calculados a partir de  $D' = D/D_{max}$  pelo programa *Arlequin 3.1* (Tabelas 21, 24 e 27).

**Tabela 19** – DESEQUILÍBRIO DE LIGAÇÃO ENTRE OS SNPS SENDO 0 = rs4557160; 1 = rs7626281 E 2 = rs13095976 E + QUANDO ESTÁ EM DESEQUILÍBRIO E – QUANDO NÃO ESTÁ EM DESEQUILÍBRIO EM AMOSTRAS DM1 ( \* = NÃO HÁ DESEQUILÍBRIO POR SE TRATAR DO MESMO SNP)

Locus	0	1	2
0	*	+	–
1	+	*	+
2	–	+	*

**Tabela 20** – DESEQUILÍBRIO DE LIGAÇÃO ENTRE OS SNPS SENDO 0 = rs4557160; 1 = rs7626281 E 2 = rrs13095976 E + QUANDO ESTÁ EM DESEQUILÍBRIO E – QUANDO NÃO ESTÁ EM DESEQUILÍBRIO EM CONTROLES DE DM1 ( \* = NÃO HÁ DESEQUILÍBRIO POR SE TRATAR DO MESMO SNP).

Locus	0	1	2
0	*	+	+
1	+	*	+
2	+	+	*

**Tabela 21** – VALORES DE DESEQUILÍBRIO DE LIGAÇÃO ENTRE OS SNPS EM CASOS E CONTROLES PARA DM1, SENDO 0 = rs4557160; 1 = rs7626281 E 2 = rs13095976.

Loci	D' = D/Dmax	
	Casos	Controles
0 e 1	0,7560	0,8918
0 e 2	-0,0266	0,1363
1 e 2	0,6738	0,7351

**Tabela 22** – DESEQUILÍBRIO DE LIGAÇÃO ENTRE OS SNPS SENDO 0 = rs4557160; 1 = rs7626281 E 2 = rs13095976 E + QUANDO ESTÁ EM DESEQUILÍBRIO E – QUANDO NÃO ESTÁ EM DESEQUILÍBRIO EM AMOSTRAS DM2 ( \* = NÃO HÁ DESEQUILÍBRIO POR SE TRATAR DO MESMO SNP)

Locus	0	1	2
0	*	+	+
1	+	*	+
2	+	+	*

**Tabela 23** – DESEQUILÍBRIO DE LIGAÇÃO ENTRE OS SNPS SENDO 0 = rrs4557160; 1 = rs7626281 E 2 = rs13095976 E + QUANDO ESTÁ EM DESEQUILÍBRIO E – QUANDO NÃO ESTÁ EM DESEQUILÍBRIO EM CONTROLES DE DM2 ( \* = NÃO HÁ DESEQUILÍBRIO POR SE TRATAR DO MESMO SNP).

Locus	0	1	2
0	*	+	+
1	+	*	+
2	+	+	*

**Tabela 24** – VALORES DE DESEQUILÍBRIO DE LIGAÇÃO ENTRE OS SNPS EM CASOS E CONTROLES PARA DM2, SENDO 0 = rs4557160; 1 = rs7626281 E 2 = rs13095976.

Loci	D' = D/Dmax	
	Casos	Controles
0 e 1	0,7573	0,8909
0 e 2	0,6620	0,1333
1 e 2	0,9053	0,7312

**Tabela 25** – DESEQUILÍBRIO DE LIGAÇÃO ENTRE OS SNPS SENDO 0 = rs4557160; 1 = rs7626281 E 2 = rs13095976 E + QUANDO ESTÁ EM DESEQUILÍBRIO E – QUANDO NÃO ESTÁ EM DESEQUILÍBRIO EM AMOSTRAS DMG ( \* = NÃO HÁ DESEQUILÍBRIO POR SE TRATAR DO MESMO SNP).

Locus	0	1	2
0	*	+	+
1	+	*	+
2	+	+	*

**Tabela 26** – DESEQUILÍBRIO DE LIGAÇÃO ENTRE OS SNPS SENDO 0 = rs4557160; 1 = rs7626281 E 2 = rs13095976 E + QUANDO ESTÁ EM DESEQUILÍBRIO E – QUANDO NÃO ESTÁ EM DESEQUILÍBRIO EM CONTROLES DE DMG ( \* = NÃO HÁ DESEQUILÍBRIO POR SE TRATAR DO MESMO SNP).

Locus	0	1	2
0	*	+	+
1	+	*	+
2	+	+	*

**Tabela 27** – VALORES DE DESEQUILÍBRIO DE LIGAÇÃO ENTRE OS SNPS EM CASOS E CONTROLES PARA DMG, SENDO 0 = rs4557160; 1 = rs7626281 E 2 = rs13095976.

Loci	D' = D/Dmax	
	Casos	Controles
0 e 1	0,7243	0,4351
0 e 2	0,3937	0,1421
1 e 2	0,8150	0,3360

## 6.5 Regressão

Foram realizadas análises de regressão com os três SNPs estudados e outras variáveis de características de pacientes e controles como IMC, HDL, LDL e Triglicerídeos para verificar se existe associação entre essas variáveis e a possibilidade de desenvolver ou não o Diabetes (Tabelas 28 e 29).

**Tabela 28** – RESULTADO DA ANÁLISE DE REGRESSÃO MÚLTIPLA ESCALONADA EM QUE A MEDIANA DA IDADE DE INÍCIO DE *DIABETES MELLITUS* TIPO 1 FOI A VARIÁVEL DEPENDENTE.

Variáveis Independentes	Score	df	P
rs4557160	0.630	1	0.428
rs7626281	0.267	1	0.606
rs13095976	0.382	1	0.536
HDL	0.008	1	0.927
Triglicerídeos	0.800	1	0.371
LDL	0.124	1	0.724
IMC	1.491	1	0.222

**Tabela 29** – RESULTADO DA ANÁLISE DE REGRESSÃO LOGÍSTICA EM QUE *DIABETES MELLITUS* GESTACIONAL FOI A VARIÁVEL DEPENDENTE.

Variáveis Independentes	Score	df	P
rs4557160	0.987	1	0.320
rs7626281	2.080	1	0.149
rs13095976	0.333	1	0.564
HDL	0.361	1	0.548
Triglicerídeos	31.523	1	0.000
LDL	8.543	1	0.003
IMC	18.280	1	0.000

Não foi possível realizar a análise de regressão para as amostras de DM2 pois as mesmas foram coletadas em estudo bem anterior realizado pelo nosso laboratório, apresentando escassez de dados referentes a características de IMC, LDL, HDL e Triglicerídeos. Para DM1 não foi realizada análise considerando pacientes e controles, pois para os controles não estavam disponíveis dados de IMC, LDL, HDL e Triglicerídeos.

## 7 DISCUSSÃO

Por se tratar de uma doença multifatorial o *Diabetes Mellitus* tem sua susceptibilidade relacionada com características genéticas complexas, incluindo vários genes e grande influência de fatores ambientais. Quando falamos em *Diabetes mellitus* tipos 1 e 2 estamos tratando de uma das mais bem estudadas doenças complexas, onde o maior número de informações genéticas certamente contribui para um mapa geral de fatores possíveis para o desenvolvimento da mesma. As variantes -116A e 1615A do gene *BCHE* já foram associadas em diversos trabalhos ao *Diabetes Mellitus* (HASHIN *et al.*, 2001; LEPIENSKI *et al.*, 2006; OLIVEIRA, 2006), seja ele do tipo 1 ou 2. Além desses achados, nosso grupo de pesquisa também demonstrou associação de variantes a jusante do gene *BCHE* com *diabetes mellitus* tipo 1 (FERNANDES, 2010). No mesmo cromossomo 3 onde está localizado o gene *BCHE*, também foi descrito um loco de susceptibilidade ao DM1 (*loco IDDM9*) que abrange a região 3q22-q25 (LAINE *et al.*, 2004). Apesar da associação encontrada por OLIVEIRA (2006), esta autora sugere que as variantes nos sítios -116 e 1615 não parecem ser os verdadeiros fatores predisponentes à doença. Ela sugere ainda que outro gene em desequilíbrio de ligação com estas variantes do gene *BCHE* seja o responsável por esta associação. FERNANDES (2010) e GUIMARÃES (2011) demonstraram que o rs7624915, localizado a jusante do gene *BCHE*, difere entre casos e controles para DM1 e DM2 respectivamente, reafirmando a suspeita de OLIVEIRA (2006). Assim, pôde-se supor que algum gene a jusante do gene *BCHE* e pertencente ao loco IDDM9 pudesse conter a real variação funcional. Esses achados contribuíram para a decisão de pesquisar tag-SNPs dentro do gene da *Sucrase-Isomaltase (SI)*, em amostras dos três tipos de diabetes, por ser o gene mais próximo ao *BCHE* a estar fisiologicamente relacionado ao metabolismo de açúcar.

Existem relativamente poucos trabalhos de associação do gene *SI* com *diabetes mellitus* e o que se sabe é que a enzima codificada pelo gene *SI* possui maior atividade em pacientes com DM1 e DM2 (ADACHI *et al.*, 2003; TENO *et al.*, 2000; TANDON *et al.*, 1975; MATSUO *et al.*, 1992;), entretanto o motivo pelo qual a atividade da *Sucrase-Isomaltase* é aumentada ainda não

está esclarecido (TAKENOSHITA *et al.*, 1998). Nenhum estudo de atividade desta enzima foi realizado com amostras de Diabetes Gestacional, porém por se tratar de uma doença fisiopatologicamente semelhante ao DM2, acredita-se que esse também pode ser um resultado presente neste terceiro tipo de diabetes. Porém, os estudos com variantes neste gene descritos até o momento são os de variantes que diminuem a atividade da enzima, ocasionando a Deficiência da Sucrese-Isomaltase Congênita (CSID) (JACOB *et al.*, 2000; OUWENDIJK *et al.*, 1996; RITZ *et al.*, 2003; SANDER, *et al.*, 2006) e nenhum estudo de variantes que resultem no aumento da atividade foi descrita até o momento.

A grande questão é, causa ou consequência? Entra-se agora em uma discussão interessante, já que podemos dizer que alguma variante dentro do gene *SI* possa ser a causa da atividade enzimática aumentada pelas evidências acima citadas, porém, também sabemos que o diabetes ocasiona mudanças morfológicas no intestino delgado podendo ocasionar uma resposta fisiológica diferente da enzima, ou ainda suspeitarmos de uma ação supressora da insulina que quando na ausência dela a atividade da *SI* é diretamente induzida a subir (TAKENOSHITA *et al.*, 1998). Quando olhamos para nossos resultados referentes às frequências genotípicas e alélicas parece que teríamos que concordar com a segunda hipótese: atividade enzimática aumentada devido a uma resposta fisiológica, isso porque não se encontrou diferenças significativas nas frequências genotípicas e alélicas entre paciente e controle em todas as variantes analisadas, porém os dados de frequências haplotípicas revelam alguns resultados interessantes onde não se pode descartar a primeira possibilidade, de que alguma variante próxima à região estudada possa sim ser a responsável por essa mudança na atividade enzimática, como será comentado mais adiante.

Através do banco de dados *NCBI* é possível verificar as frequências alélicas dessas variações em outras populações já descritas. O banco inclui dados do *HAPMAP* e Projeto *1000 Genomas* que tem como objetivo seqüenciar 1000 genomas fornecendo um catálogo profundo da variação genética humana, sendo que o seqüenciamento é feito apenas em regiões codificadoras, incluindo amostras Europeias, Africanas e Asiáticas. Em

comparação do presente estudo com algumas populações disponíveis nesses bancos encontramos semelhanças nas frequências alélicas para os três SNPs estudados (rs4557160, rs7626281, rs13095976). Por exemplo, quando comparamos nossa população controle para o rs4557160 com amostras da população Européia e Mexicana encontramos frequências alélicas semelhantes ( $\chi^2= 0,88$  e  $\chi^2= 0,02$  respectivamente – Tabela 30). Para o rs7626281 encontramos frequências alélicas semelhantes na população Africana ( $\chi^2= 0,41$ ) e para o rs13095976 encontramos semelhanças com as populações Mexicana e Africana ( $\chi^2= 0,10$  e  $\chi^2= 0,23$  respectivamente – Tabela 30). Porém, nossas frequências alélicas para os três SNPs diferiram da população Asiática (rs4557160  $\chi^2= 12,15$ ; rs7626281  $\chi^2= 8,27$ ; rs13095976  $\chi^2= 42,68$ ). Este fato pode ser explicado pelo fato da população desse estudo ser relativamente pequena e com componente asiático inexistente.

**Tabela 30** – COMPARAÇÃO ENTRE AS FREQUÊNCIAS ALÉLICAS EM DIFERENTES POPULAÇÕES E EM AMOSTRAS CONTROLE DE DM1 E DM2 DO PRESENTE ESTUDO.\*POP. GLOBAL REFERE-SE AO PROJETO 1000 GENOMAS QUE INCLUI POPULAÇÕES EUROPÉIAS, AFRICANAS E ASIÁTICAS (DISPONÍVEL EM: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/snp>). Os espaços em branco correspondem a dados não disponíveis. (GL=1).

Populações	rs4557160			rs7626281			rs13095976		
	T(%)	C(%)	$\chi^2_{(1)}(p)$	T (%)	C(%)	$\chi^2_{(1)}(p)$	T (%)	C(%)	$\chi^2_{(1)}(p)$
Pop. Controle	52,3	47,7	-	77,2	22,8	-	57,2	42,8	-
Pop. Global*	48,7	51,3	0,88 (p=0,39)	80,2	19,8	0,27 (p=0,73)	-	-	-
Pop. Européia	50,0	50,0	0,16 (p=0,78)	-	-	-	-	-	-
Pop. Mexicana	52,0	48,0	0,002 (p=0,94)	-	-	-	59,4	40,6	0,10 (p=0,86)
Pop. Africana	70,0	30,0	<b>7,48</b> <b>(p=0,01)</b>	73,3	26,7	0,41 (p=0,63)	60,5	39,5	0,23 (p=0,74)
Pop. Asiática	74,0	26,0	<b>12,15</b> <b>(p=0,00)</b>	91,7	8,3	<b>8,27</b> <b>(p=0,01)</b>	14,6	85,4	<b>42,68</b> <b>(p=0,00)</b>

\*Os valores de  $\chi^2$  foram calculados a partir da comparação da população controle do presente estudo com cada uma das populações disponíveis com o auxílio do programa *Bioestat 3.0*.

**Tabela 31** – COMPARAÇÃO ENTRE AS FREQUÊNCIAS ALÉLICAS EM DIFERENTES POPULAÇÕES E EM AMOSTRAS CONTROLE DE DMG DO PRESENTE ESTUDO.\*POP. GLOBAL REFERE-SE AO PROJETO *1000 GENOMAS* QUE INCLUI POPULAÇÕES EUROPEÍAS, AFRICANAS E ASIÁTICAS (DISPONÍVEL EM: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP>). Os espaços em branco correspondem a dados não disponíveis. (GL=1).

Populações	rs4557160			rs7626281			rs13095976		
	T(%)	C(%)	$\chi^2_{(1)}(p)$	T (%)	C(%)	$\chi^2_{(1)}(p)$	T (%)	C(%)	$\chi^2_{(1)}(p)$
Pop. Controle	47,5	52,5	-	74,6	25,4	-	55,9	44,1	-
Pop. Global*	48,7	51,3	0,03 (p=0,98)	80,2	19,8	0,90 (p=0,44)	-	-	-
Pop. Européia	50,0	50,0	0,13 (p=0,83)	-	-	-	-	-	-
Pop. Mexicana	52,0	48,0	0,41 (p=0,62)	-	-	-	59,4	40,6	0,32 (p=0,66)
Pop. Africana	-	-	-	73,3	26,7	0,03 (p=0,99)	60,5	39,5	0,98 (p=0,37)

\*Os valores de  $\chi^2$  foram calculados a partir da comparação da população controle do presente estudo com cada uma das populações disponíveis com o auxílio do programa *Bioestat 3.0*.

Os SNPs estudados nos grupos caso/controle de DM2 e DMG encontram-se em desequilíbrio de ligação. Para a amostra de DM1 o rs4557160 e o rs13095976 não apresentaram desequilíbrio de ligação, entretanto entre os demais pares de SNPs foi detectado desequilíbrio. De acordo com Gabriel et al (2002), blocos haplotípicos são regiões nas quais o desequilíbrio de ligação é encontrado para quase todos os pares de marcadores dentro da região, considerando  $p < 0,05$ . No mesmo trabalho, os autores estimam que para marcadores que caracterizem um bloco haplotípico, o número de haplótipos que abrange aproximadamente 80% de todos os cromossomos não deve exceder  $n+1$ , onde  $n$  é o número de SNPs em questão. A análise dos dados apresentados nas tabelas 16, 17 e 18 mostra que nos grupos de pacientes de DM1, DM2 e DMG, no máximo quatro haplótipos

correspondem a mais de 80% da variação haplotípica, ou seja, dos cromossomos estudados. Considerando os dados apresentados acima e o valor de  $r^2 = 0,929$  (<http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov>), os três SNPs genotipados no presente estudo permitem uma investigação confiável da associação do gene SI com o *diabetes mellitus*.

Com relação às análises de haplótipos algumas diferenças consideráveis foram encontradas. Para a discussão a seguir, os nucleotídeos representados estarão sempre nesta ordem: rs4557160, rs7626281 e rs13095976. O haplótipo TTT foi significativamente maior no grupo de diabéticos do tipo 2 do que no grupo controle (21,48% e 5,84% respectivamente;  $p = 0,00$ ) e o OR correspondente a esta relação é de 4,31 (IC 95%;  $p < 0,05$ ), indicando um efeito de predisposição ao *diabetes mellitus* tipo 2. Este mesmo haplótipo também diferiu no estudo referente a diabetes gestacional, apresentando uma frequência de 4,14% nos casos e 12,35% nos controles ( $p = 0,00$  e OR= 0,30; IC 95%( $p < 0,05$ )), porém ao contrário do que ocorreu no DM2 aqui este haplótipo apresenta um efeito protetor ao *diabetes mellitus* gestacional. O haplótipo TTT apresentou uma tendência a diferir entre casos e controles como efeito de predisposição ao *diabetes mellitus* tipo 1 ( $p = 0,08$ ).

O haplótipo TCT apresentou um efeito protetor ao diabetes tipos 1 e 2 apresentando maior frequência nos grupos controles (DM1 caso = 22,3% controle= 31,6% OR= 0,62; DM2 caso= 3,51% controle= 18,79% OR= 0,16). Este mesmo haplótipo não apresentou diferença significativa entre casos e controles no diabetes gestacional.

A frequência do haplótipo TCC foi maior em casos do que em controles no DM1 (25,6% e 19,2% respectivamente; OR= 1,46) apresentando um efeito de predisposição ao *diabetes mellitus* tipo 1. Já nas análises de DM2 este haplótipo só foi encontrado no grupo controle com uma frequência de 2,56% e não diferiu entre casos e controles do DMG (1,75% e 4,60% respectivamente). Por ser um haplótipo de frequência muito baixa nas análises de DM2 e DMG estima-se que ele não apareceu nos casos de diabetes tipo 2 devido ao pequeno tamanho da amostra.

No haplótipo TTC houve um efeito de predisposição ao diabetes tipo 2 e ao diabetes gestacional pois apresentou uma frequência significativa maior em casos do que em controles em ambas as análises (DM2 41,22% e 20,74% respectivamente OR= 2,69; DMG 32,15% e 19,2% OR= 1,84) , já nas análises do grupo de casos e controles de diabetes tipo 1 este haplótipo não apareceu.

Os haplótipos CTT e CTC apresentaram um efeito protetor ao diabetes tipo 2 com uma frequência de 23,49% e 31,76% e 6,06% e 18,97% respectivamente, em casos e controles. Nos demais grupos não houve diferença significativa entre casos e controles.

No grupo de diabéticos do tipo 2 houve uma frequência muito maior em casos do que em controles do haplótipo CCT (22,42% e 1,33% respectivamente;  $p= 0,00$ ) e o OR correspondente a esta relação é de 22,11 o que indica um alto efeito de predisposição ao DM2. Porém não houve qualquer diferença significativa nos outros grupos caso/controle estudados de DM1 e DMG.

Outro haplótipo que não apresentou diferença significativa no grupo caso/controle de DM1 foi o CCC, porém este haplótipo apareceu com uma frequência muito baixa em casos de DM2 (1,16%) e não apareceu em controles. Já no DMG apareceu em 2,76% dos controles e não apareceu nos casos, o que se justifica pelo fato do pequeno tamanho amostral.

Em síntese, foram encontrados três haplótipos possíveis de predisposição ao *diabetes mellitus* tipo 2 (TTT; TTC; CCT). Obtendo-se como base o haplótipo TTT observa-se que a presença da variante rs4557160 e rs7626281 quando aparecem juntas não ocasionam mudança no efeito de predisposição assim como a presença isolada da variante rs13095976, porém a presença da variante rs7626281 quando sozinha determina um efeito protetor ao DM2 (TCT) assim como a variante rs4557160 sozinha (CTT) também desenvolve um efeito protetor ao DM2. O conjunto das variantes rs4557160 e rs13095976 (CTC) determina um efeito protetor à doença. Assim se tem duas hipóteses para esse feito: 1) Como esses SNPs estão em forte desequilíbrio de ligação entre eles e apresentam diferenças em suas combinações haplotípicas entre casos e controles pode-se dizer que alguma variante entre esses SNPs ou em torno deles possa ser a responsável por alguma variação na atividade

da enzima Sucrase-Isomaltase que esteja associada ao DM2; 2) Outra hipótese pode ser um efeito regulatório da presença concomitante de alguns dos SNPs que leve a alguma alteração na expressão do gene *SI* que esteja associado ao DM2.

No grupo caso/controle de diabéticos tipo 1 foi encontrado dois haplótipos de predisposição a doença (TTT e TCC), sendo que apenas a presença do rs7626281 isoladamente permitiu um efeito protetor ao DM1 (TCT), nos demais haplótipos possíveis não houve diferença significativa entre casos e controles. Assim pode-se deduzir que o rs7626281 quando presente isoladamente promova um efeito de inibição a alguma variante presente nesta região que esteja associada ao DM1.

Para o estudo com diabetes gestacional foi encontrado apenas um haplótipo de predisposição, o TTC que também foi caracterizado como haplótipo de predisposição em DM2, o que é plausível, pois essas duas doenças apresentam fisiopatologia semelhante. Porém quando há uma troca do rs13095976 C pelo T há um efeito protetor ao DMG (TTT) ao contrário do que ocorre em DM2, onde lá este haplótipo apresenta efeito de predisposição, levando-se a pensar que alguma variante ao entorno dessa região possa estar inibindo ou ativando o efeito do haplótipo TTT em DMG e DM2 respectivamente.

As diferenças observadas no efeito dos haplótipos podem sugerir uma etiologia diferenciada para os três tipos de *diabetes*, pelo menos no que se refere a um possível papel do gene *SI*. De modo geral, o efeito parece ser mais representativo para DM2.

Com relação às análises de regressão, não foi encontrada nenhuma associação das demais variáveis (HDL, LDL, Triglicerídeos e IMC) com a idade de início do diabetes tipo 1. Já nas amostras de diabetes gestacional houve maiores valores para IMC, triglicerídeos e LDL o que já era esperado, confirmando os dados encontrados no trabalho de GUIMARÃES (2011). Para o grupo caso/controle de diabetes tipo 2 não foi possível realizar análise de regressão por falta de dados de IMC, LDL, HDL e triglicerídeos, pois essas amostras foram coletadas em estudo anterior onde não foram recolhidos esses dados.

## 8 CONCLUSÃO

Conclui-se que os SNPs estudados (rs4557160, rs7626281 e rs13095976) isoladamente não estão associados a nenhum dos tipos de *diabetes mellitus* (DM1, DM2 e DMG). Não houve associação de outras variáveis como HDL, LDL, IMC e triglicerídeos com idade de início do *diabetes mellitus* tipo 1 e houve uma associação, já esperada, de LDL, triglicerídeo e IMC em grávidas diabéticas. As análises haplotípicas apresentaram três haplótipos de predisposição ao DM2, dois haplótipos de predisposição ao DM1 e um haplótipo de predisposição ao DMG. Podendo representar um efeito regulatório na expressão do gene *Sf* que esteja associado aos três tipos de diabetes, ou que alguma variante localizada entre esses SNPs seja a variante funcional que esteja alterando a atividade da enzima, ou ainda indicando alguma variante de outro gene, próximo ao gene *Sf*, em desequilíbrio de ligação com esses haplótipos.

## 9 REFERÊNCIAS

ADACHI, T.; MORI, C.; SACURAI, K.; SHIHARA, N.; TSUDA, K.; YASUDA, K. Morphological Changes and Increased Sucrase and Isomaltase Activity in Small Intestines of Insulin-Deficient and Type 2 Diabetic Rats. **Endocrine Journal**, 50, p. 271-279, 2003.

ADACHI, T.; TAKENOSHITA, M.; KATSURA, H.; YASUDA, K.; TSUDA, K.; SEINO, Y.; ENOMOTO, T.; YAMAJI, R.; MIYATAKE, K.; INUI, H.; NAKANO, Y. Disordered expression of the sucrase-isomaltase complex in the small intestine in Otsuka Long-Evans Tokushima fatty rats, a model of non insulin-dependent diabetes mellitus with insulin resistance. **Biochimica et Biophysica Acta** 1426, p.126-132, 1999.

ALIZADEH, B.Z., KOELEMAN, B.P.C, Genetic polymorphisms in susceptibility to Type 1 Diabetes. **Clinica Chimica Acta**, 387, p.9-17, 2008.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. **Diabetes Care**, 25, p.5–20, 2002.

ATKINSON, M.A., EISENBARTH G.S. Type 1 diabetes: new perspectives on disease pathogenesis and treatment. **Lancet.**, p. 358:221-9, 2001.

BUCHANAN, T.A., XIANG A., KJOS S.L., Watanabe R. What is gestational diabetes? **Diabetes Care** 30: S105-111, 2007.

CARR, D. B.; UTZSCHNEIDER, K. M.; HULL, R.L.; TONG, J.; WALLACE, T. M.; KODAMA, K.; SHOFER, J. B.; HECKBERT, S.; BOYKO, E. J.; FUJIMOTO, W. Y.; KAHN, S.E. Gestational *Diabetes Mellitus* increases the risk of cardiovascular disease in women with a family history of type 2 diabetes. **Diabetes Care**, 29, p.2078-2083, 2006.

CLAUSEN, T.D.; MATHIESEN, E.R.; HANSEN, T.; PEDERSEN, O.; JENSEN D.M.; LAUENBORG J.; DAMM P. High prevalence of type 2 diabetes and pre-

diabetes in adult offspring of women with gestational diabetes mellitus or type 1 diabetes: the role of intrauterine hyperglycemia. **Diabetes Care** 31: 340-346, 2008.

CORRADINI, E. *et al.*,. Estudo comparativo de amidos termoplásticos derivados do milho com diferentes teores de amilose. **Polímeros** [online],15, p. 268-273, 2005.

DIB, A.S.; TSCHIEDEL, B. e NERY, M. Diabetes Melito Tipo 1: da Pesquisa à Clínica. **Arq Bras Endocrinol Metab.** 52/2, p.142-145, 2008.

DODE, M.; SANTOS, I.S. Fatores de risco para diabetes mellitus gestacional na coorte de nascimentos de Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil, 2004. **Cad Saúde Pública** 25: 1141-1152, 2009.

ELBEIN, S. C. The genetics of human noninsulin-dependent (type 2) *Diabetes Mellitus*. **J. Nutr.**, 127:S1891-1896, 1997.

FERNANDES, A. B. **Associação entre o gene da butirilcolinesterase e diabete melito tipo 1**. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, 2010.

FLOREZ, J.C.; HIRSCHHORN, J.; ALTSCHULER, D. The inherited basis of diabetes mellitus: implications for the genetic analysis of complex traits. **Annu. Rev. Genomics Hum Genet**, 4, p. 257-291, 2003.

FOX, S.I. **FISIOLOGIA HUMANA**. 7ª ED. SÃO PAULO: EDITORA MANOLE, P. 613-620, 2007.

GABRIEL S.B; SCHAFFNER S.F.; NGUYEN H.; MOORE J.M.; ROY J.; BLUMENSTIEL B.; HIGGINS J.; DEFELICE M.; LOCHNER A.; FAGGART M.; LIU-CORDERO S.N.; ROTIMI C.; ADEYEMO A.; COOPER R.; WARD R.;

LANDER E.S.; DALY M.J.; ALTSHULER D. The structure of haplotype blocks in the human genome. **Science** 296:2225–2229, 2002.

GROSS, J. L.; SILVEIRO, S. P.; CAMARGO, J. L.; REICCHELT, A. J.; DE AZEVEDO, M. J. Diabetes Melito: Diagnóstico, Classificação e Avaliação do Controle Glicêmico. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab**, **46**, p.16-26, 2002.

GUIMARÃES, L. O. **Associação entre o Diabetes Mellitus Gestacional, variantes do gene da *Butirilcolinesterase (BCHE)* e Tag SNPs próximos.** Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, 2011.

HARTMANN, E.; GORLICH, D.; KOSTKA, S.; OTTO, A.; KRAFT, R.; KNESPEL, S.; BURGER, E.; RAPOPORT, T. A.; PREHN, S. A tetrameric complex of membrane proteins in the endoplasmic reticulum. **Eur. J. Biochem.****214**, p. 375-381, 1993.

HASHIN, Y.; SHEPHERD, D.; WILTSHIRE, S.; HOLMAN, R.R.; LEVY, J.C.; CLARK, A.; CULL, C.A. Butyrylcholinesterase K variant on chromosome 3q is associated with Type II diabetes in white Caucasian subjects. **Diabetologia** **44**: 2227-2230, 2001.

HUNZIKER, W.; SPIESS, M.; SEMENZA, G.; LODISH, H.F. The sucrase-isomaltase complex: Primary structure, membrane-orientation, and evolution of a stalked, intrinsic brush border protein. **Cell**, **46**, p. 227-234, 1986.

JACOB, R.; PURSCHEL, B.; NAIM, H. Sucrase Is an Intramolecular Chaperone Located at the C-terminal End of the Sucrase-Isomaltase Enzyme Complex. **The journal of biological chemistry**, **277**, p. 32141–32148, 2002

JACOB, R.; ZIMMER, K. P.; SCHMITZ, J.; NAIM, H. Y. Congenital sucrase-isomaltase deficiency arising from cleavage and secretion of a mutant form of the enzyme. **J. Clin. Invest.** **106**, p. 281-287, 2000.

KNIP, M.; SILJANDER, H. Autoimmune mechanisms in type 1 diabetes. **Autoimmunity Reviews**,7, p.550–557, 2008.

KYVIK, K.O., GREEN A., BECK-NIELSEN, H. Concordance rates of insulin dependent diabetes mellitus: a population based study of young Danish twins. **Bmj**, 311, p.913–7, 1995.

LAHIRI, D.K.; NURNBERGER, J.L. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. **Nucleic Acids Res** 19: 5444, 1991.

LAINÉ, A. P.; NEJENTSEV, S.; VEIJOLA, R.; KORPINEN, E.; SJOROOS, M.; SIMELL, O.; KNIP, O.; AKERBLUM, M.; ILONEN, J. A linkage study of 12 IDDM susceptibility loci in the Finnish population. **Diabetes Metab Res Rev**, 20, p.144-149, 2004.

LEPIENSKI, L. M. **Variante K da Butirilcolinesterase e Diabetes Mellitus**. Curitiba,2004. Dissertação (Mestrado em Genética) – Setor de Ciências Biológicas,Universidade Federal do Paraná.

LIBMAN, I.M. e BECKER D.J. Coexistence of type 1 and type 2 diabetes: “double” diabetes? **Pediatr Diabetes**, 4, p.110-3, 2003.

LOBATO G. **Screening do Diabetes Gestacional**, 2002. Disponível em: [http://www.medcenter.com/Medscape/content.aspx?LangType=1046&menu\\_id=945&id=557#](http://www.medcenter.com/Medscape/content.aspx?LangType=1046&menu_id=945&id=557#). Acessado em 21/08/2010.

MAGANHA, C. A.; VANNI, D. G. B. S.; BERNARDINI, M. A.; ZUGAIB, M. Tratamento do diabetes melito gestacional. **Rev. Assoc. Med. Bras.**, 49, p.330-334, 2003.

MATSUO, T.; ODAKA, H.; IKEDA H. Effect of na intestinal disaccharidase inhibitor on obesety and diabetes. **Am J Clin Nutr**,55, p.314-317, 1992.

MEIN, C.A.; ESPOSITO, L.; DUNN M.G.; JOHNSON, G.C.L.; TIMMS, A.E.; GOY, J.V.; SMITH, A.N.; SEBAG-MONTEFIORE, L.; MERRIMAN, M.E.; WILSON, A.J.; PRITCHARD, L.E.; CUCCA, F.; BARNETT, A.H.; BAIN, S.C.; TODD, J.A. A search for type 1 diabetes susceptibility genes in families from the United Kingdom. **Nature Genetics**, 19, p. 297-300, 1998.

MERRIMAN, T. R. Type 1 diabetes, the A1 milk hypothesis and vitamin D deficiency. **Diabetes research and clinical practice**, 83, p.149 – 156, 2009.

**National Center For Biotechnology Information (NCBI)**. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/224589815?report=genbank&from=166973395&to=167037952&strand=true>.

OLIVEIRA, L.C. **Investigação de associação das variantes do nucleotídeo - 116 do gene BCHE da butirilcolinesterase em diabetes mellito 1**. 64 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, 2006.

OUWENDIJK, J.; MOOLENAAS, C. E. C.; PETERS, W. J., HOLLENBERG, C. P., GINSEL, L. A., FRANSEN, J. A. M.; NAIM, H. Y. Congenital sucrase-isomaltase deficiency: identification of a glutamine to proline substitution that leads to a transport block of sucrase-isomaltase in a pre-Golgi compartment. **J. Clin. Invest.** 97, p.633-641, 1996.

REICHEL, A.J.; OPPERMAN, M.L.R.; SCHMIDT, M.I. Recomendações da 2ª reunião do grupo de trabalho em diabetes e gravidez. **Arq Bras Endocrinol Metab** 46: 574-581, 2002.

REIS, A. F.; VELHO, G. Bases genéticas do *Diabetes mellitus* tipo 2. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.**, 46(4):426-432, 2002.

RETNAKARAN, R.; OI, Y.; SERMER, M.; CONNELLY, P.W.; HANLEY, A.J.G.; ZINMAN, B. Glucose intolerance in pregnancy and future risk of pre-diabetes or diabetes. **Diabetes Care** 31: 2026-2031, 2008.

RITZ, V.; ALFALAH, M.; ZIMMER, K. P.; SCHMITZ, J.; JACOB, R., NAIM, H.Y. Congenital sucrase-isomaltase deficiency because of an accumulation of the mutant enzyme in the endoplasmic reticulum. **Gastroenterology** **125**, p.1678-1685, 2003.

SANDER, P.; ALFALAH, M.; KEISER, M.; KORPONAY-SZABO, I.; KOVACS, J. B.; LEEB, T.; NAIM, H. Y. Novel mutations in the human sucrase-isomaltase gene (SI) that cause congenital carbohydrate malabsorption. **Hum. Mutat.** **27**, p.119, 2006.

SANGHERA, D. K.; BEEN, L.; ORTEGA, L.; WANDER, G. S.; MEHRA, N. K.; ASTON, C. E.; MULVIHILL, J. J.; RALHAN, S. Testing the association of novel meta-analysis-derived diabetes risk genes with type II diabetes and related metabolic traits in Asian Indian Sikhs. **J. Hum. Genet.**, **54**, p.162-168, 2009.

SCHMIDT, M. I.; DUNCAN, B. B.; REICHELT, A. J.; BRANCHTEIN, L.; MATOS, M. C.; E FORTI, A. C.; SPICHLER, E. R.; POUSADA, J. M. D. C.; TEIXEIRA, M.M.; YAMASHITA, T. Gestational *Diabetes Mellitus* diagnosed with a 2-h 75-g oral glucose tolerance test and adverse pregnancy outcomes. **Diabetes Care**, 24, p.1151-1155, 2001.

SCHNEIDER, S.; ROESSLI, D. e EXCOFFIER, L. Arlequin ver. 2.000: A software for population genetics data analysis. **Genetics and Biometry Laboratory**, University of Geneva, Switzerland, 2000.

SLATKIN, M.; EXCOFFIER L. Testing for linkage disequilibrium in genotypic data using the Expectation-Maximization algorithm. **Heredity**. v. 4, p.377-383, 1996.

SHAAT, N.; LERNMARK, Å.; KARLSSON, E.; IVARSSON, S.; PARIKH, K.; BERNTORP, K.; GROOP, L. A variant in the transcription factor 7-like 2 (TCF7L2) gene is associated with an increased risk of gestational diabetes mellitus. **Diabetologia**, 50, p. 972-979, 2007.

SHAAT, N.; EKELUND, M.; LERNMARK, Å.; IVARSSON, S.; ALMGREN, P.; BERNTORP, K.; GROOP, L. Association of the E23K polymorphism in the KCNJ11 gene with gestational diabetes mellitus. **Diabetologia**, **48**, p. 2544-2551, 2005.

SILVA, M.R.G.; CALDERON, I.M.P.; GONÇALVES, L.C.; ARAGON, F.F.; PADOVANI, C.R.; PIMENTA, W.P. Ocorrência de diabetes melito em mulheres com hiperglicemia em gestação prévia. **Rev Saúde Públ** 37: 345-350, 2003.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. Diagnóstico e Classificação do Diabetes Mellitus – Manual de Diabetes na Prática Clínica. Disponível em: <http://www.diabetes.org.br>, acesso em 02/08/2010.

SPODSBERG, N.; JACOB, R.; ALFALAH, M.; ZIMMER, K. P.; NAIM, H. Y. Molecular basis of aberrant apical protein transport in an intestinal enzyme disorder. **J. Biol. Chem.** **276**, p.23506-23510, 2001.

TAKENOSHITA, M.; YAMAJI, R.; INUI, H.; MIYATAKE, K.; NAKANO, Y. Suppressive effect of insulin on the synthesis of sucrase-isomaltase complex in small intestinal epithelial cells, and abnormal increase in the complex under diabetic conditions. **Biochemistry Journal** **329**, p. 597-600, 1998.

TANDON, R. K.; SRIVASTAVA, L. M.; PANDEY, S. C. Increased disaccharidase activity in human diabetics. **Am J Clin Nutr.**, **28**, p. 621-625, 1975.

TENO, S.; NAKAJIMA-UTO, Y.; NAGAY, K.; SHIMIZU-SAITOH, M.; OZU, H.; OMORI, Y.; TAKIZAWA, T. Treatment with alpha-glucosidase inhibitor for severe reactive hypoglycemia: a case report. **Endocr J**,**47**, p. 437-442, 2000.

TODD, J.A. Genetic control of autoimmunity in type 1 diabetes. **Immunol Today**,**11**, p.122–9, 1990.

TRABER, P. G. Control of gene expression in intestinal epithelial cells. **The Royal Society** **353**, p. 911-914, 1998.

VELHO, G.; FROGUEL, P. Genetic determinants of non-insulin-dependent diabetes mellitus: strategies and recent results. **Diabetes Metab.**, **23**, p.7-17, 1997.

VOGEL, F.; MOTULKY, A. G. **Genética Humana. Problemas e abordagens.** 3ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 199-200, 2000.

WATANABE, R. M.; BLACK, M. H.; XIANG, A. H.; ALLAYEE, H.; LAWRENCE, J.M.; BUCHANAN, T. A. Genetics of Gestational Diabetes Mellitus and Type 2 Diabetes. **Diabetes Care**, **30**, p.134-140, 2007.

WITTER, C.T.; KUSUKAWA, N. Nucleic acid techniques. In: Burtis CA, Ashwood ER, Bruns DE. Tietz textbook of clinical chemistry and molecular diagnostics. **Elsevier** 1407-1449, 2006.

World Health Organization - WHO. Guidelines for the prevention, management and care of *Diabetes mellitus*. **Geneva: World Health Organization** 32: 1-82, 2006.