

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

HENRIQUE RAVANHOL FRIGERI

**Variabilidade do Gene da Glucoquinase no
Diabetes Gestacional**

CURITIBA

2011

HENRIQUE RAVANHOL FRIGERI

**Variabilidade do Gene da Glucoquinase no
Diabetes Gestacional**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Geraldo Picheth.
Co-orientadores: Profa. Dra. Fabiane G. de M. Rego.
Prof. Dr. Emanuel M. de Souza.

CURITIBA

2011

**Dedico este trabalho às pessoas que
tanto amo: Paulo Ravanhol Frigeri,
Marcia Ravanhol Fonteque Frigeri e
Luiz Henrique Fonteque Frigeri.**

AGRADECIMENTOS

ACADEMIA

À Universidade Federal do Paraná e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas pelo espaço físico, por toda a estrutura cedida a mim, bem como a oportunidade.

A todos os colegas de outros laboratórios, em especial a todos os mestrandos e doutorandos da Bacteriologia, pelo espírito de equipe nesses dois anos.

A duas pessoas muito importantes por toda a disposição e prontidão no processamento final das sequências para minhas análises dos resultados. São elas: Valter Baura e Vinícius Almir Weiss, profissional técnico e aluno de doutorado do Departamento de Bioquímica, respectivamente.

À profa Dra. Tania Maria Bordin Bonfim por me propiciar livre acesso ao seu laboratório (Enzimologia e Tecnologia das Fermentações).

À profa. Dra. Vanessa Sotomaior, coordenadora do curso de Biotecnologia da PUCPR, por todo apoio e compreensão no ano que passou (2010).

À profa. Dra. Cyntia Maria Telles Fadel-Picheth também por me propiciar livre acesso ao seu laboratório para que eu pudesse realizar e analisar alguns experimentos, adquirir reagentes e fazer a esterilização do meu material. Professora, resumidamente, obrigado por tudo.

À colega de mestrado Bruna Carla Agustini com a qual falarei diretamente. Bruh, obrigado por todo apoio em todos os momentos nesses dois anos. Pela paciência e companhia, principalmente aos sábados, domingos e feriados em que passamos trabalhando juntos, porém em laboratórios diferentes.

A todos os colegas de bancada, por todos os momentos compartilhados. Em especial a Rafaela Rocha, aluna de IC, e a Izabella Castilhos Ribeiro dos Santos, aluna de doutorado, com as quais conversarei informal e pessoalmente. Rafa, obrigado pela ajuda. Sábado é um bom dia para se fazer reação de sequenciamento e purificar sequências, não é mesmo!? Iza, obrigado por todos os momentos, todas as conversas, todas as risadas, toda a ajuda e, principalmente, pelas amostras. Sem elas eu não poderia ter realizado este trabalho.

Aos membros convidados da banca examinadora profa. Dra. Giseli Klassen (Departamento de Patologia Básica) e ao prof. Dr. Ricardo Lehtonen Rodrigues de Souza (Departamento de Genética) por ter aceitado avaliar este trabalho.

Aos meus Co-orientadores prof. Dr. Emanuel Maltempi de Souza (Departamento de Bioquímica) e Profa. Dra. Fabiane Gomes de Moraes Rego (Departamento de Patologia Médica) aos quais sou extremamente grato por todo apoio material, braçal, psicológico, moral e intelectual nos momentos precisos.

Ao meu orientador prof. Dr. Geraldo Picheth por todo o ensinamento, principalmente nessas duas últimas semanas que fizeram valer e compensar esses dois anos. Professor, sou grato pelas conversas, dicas e sugestões Geraldianas e pela total liberdade cedida a mim em ambiente laboratorial. Essa foi muito importante para que eu pudesse trabalhar da melhor forma possível e tentar, de forma curiosa, neurótica e perfeccionista, realizar um bom trabalho. Ah, nunca deixe de contar “aquelas” piadas. *PS: Leitor. Caso tenha ficado intrigado/curioso com o destaque na palavra “aquelas”, meu objetivo foi atingido. As piadas são apenas engraçadas.

FAMÍLIA

Agradeço aos meus familiares: avôs, avós, tios, tias, primos e primas. Vó Dita e Vó Dete, obrigado por tudo, mas principalmente, pelas orações. A todos os outros agradeço por todo carinho, compreensão, força, apoio e proteção direcionados a mim tanto aqui na terra, quanto do céu (Vô Didi e Vô Nute).

Às pessoas que mais amo: Meu irmão Paulo Ravanhol Frigeri. Paulo, obrigado pela companhia e por ficar me ouvindo em momentos de pouca ou muita alegria, mesmo não estando muito interessado em ouvir (acha que não percebo? Mas continuarei falando, pois preciso cumprir com a minha função de irmão mais velho). Minha mãe e meu pai (Marcia Ravanhol Fonteque Frigeri e Luiz Henrique Fonteque Frigeri), obrigado pelas cobranças, pela paciência nesses dois anos, pelo carinho, apoio, pelas conversas, risadas de sempre e, principalmente, por acreditar em mim. Isso tudo não seria possível sem vocês.

A Deus, por nossas conversas em qualquer momento, mas principalmente, matutinas e noturnas. Pai, obrigado por tornar isso tudo possível.

“Só a Educação Liberta”.

Epicteto.

RESUMO

O *Diabetes mellitus* Gestacional (DMG) é definido como qualquer grau de intolerância à glicose com primeira detecção durante a gravidez. A patologia tem prevalência em cerca de 7% das gestações e pode promover complicações para gestante e feto. A Glucoquinase (GCK) é uma enzima que fosforila a glicose na posição 6 e atua como sensor para liberação de insulina do pâncreas. Polimorfismos no gene da GCK estão associados ao diabetes monogênico do tipo MODY-2 (*Maturity-Onset Diabetes of the Young Type 2*). O objetivo deste trabalho foi procurar polimorfismos no gene da GCK em exons e suas regiões flanqueadoras. O estudo tem a aprovação do Comitê de Ética e Pesquisa da Universidade Federal do Paraná (UFPR). Foram analisadas por PCR-SSCP (polimorfismo de conformação de fita simples) e sequenciamento de DNA em 200 amostras de gestantes classificadas em grupo controle (Saudáveis, n=100, CTRL) e diabéticas gestacionais (DMG, n=100). Os grupos apresentaram idade média de $24,9 \pm 6,2$, $31,7 \pm 6,3$, respectivamente para CTRL e DMG. Enquanto o grupo CTRL foi composto apenas por Euro-Brasileiras, o grupo DMG contempla 10% de Afrodescendentes. As gestantes diabéticas apresentaram IMC superior ao grupo controle, respectivamente, $33,5 \pm 6,3$ e $25,2 \pm 4,2$. As concentrações de glicose em jejum, perfil lipídico foram significativamente maiores no grupo com diabetes exceto para o LDL-colesterol que não diferiu. As determinações de ureia e creatinina apontam que ambos os grupos não demonstram evidência de lesão renal. A análise molecular obtida de 14 amplicons que cobriram as regiões gênicas em estudo mostrou variações, todas do tipo transição, em quatro regiões intrônica em 13 das amostras estudadas (6,5%). As variações identificadas foram: c.43441A>G (Intro3, não descrita), c.44702T>C (Intron6, rs2268574), c.48935C>T (Intron9, rs2908274) e c.49620G>A (Exon10, região não codificadora, rs13306388). As frequências estimadas, bem como 95% de Intervalo de Confiança (95% IC) para os alelos raros das variantes descritas foram: alelo-G, 0,3% (0-1%); alelo-C, 3,3% (2-5%), alelo-T, 0,8% (0-2%) e alelo-A, 1% (0-2%), respectivamente para as variantes detectadas nos Introns4, 6, 9 e Exon10. Para nenhuma das variantes foi observado associação com processos patológicos. Em síntese, o gene da Glucoquinase não apresentou variante do tipo “hotspot” associada com o diabetes gestacional na população em estudo e uma nova variante, no Intron3 (c.43441A>G), foi identificada no presente estudo.

Palavras-chave: *Diabetes mellitus* Gestacional, SNPs, Glucoquinase, Variabilidade Genética.

ABSTRACT

Gestational *Diabetes mellitus* (GDM) is defined as any degree of glucose intolerance with first detection during pregnancy. The disease is prevalent in about 7% of pregnancies and may lead to complications for mother and fetus. Glucokinase (GCK) is an enzyme that phosphorylates glucose in position 6 and acts as a sensor for the release of insulin from the pancreas. GCK gene polymorphisms are associated with monogenic diabetes type MODY-2 (Maturity Onset Diabetes of the Young Type 2). The aim of this study was investigate for GCK gene polymorphisms in exons and their flanking regions. The study was approved by the Ethics Committee by Federal University of Parana (UFPR). Were analyzed by PCR-SSCP (single strand conformation polymorphism) and DNA sequencing 200 samples from pregnant women classified in control group (healthy, n=100, CTRL) and gestational diabetes (GDM, n=100). The groups had a mean age of 24.9 ± 6.2 , 31.7 ± 6.3 , respectively for CTRL and DMG. While the CTRL group was composed only of Euro-Brazilian, DMG group has 10% for Afro-descendants. Diabetic women had a BMI (kg/m^2) greater than the control group, respectively, 33.5 ± 6.3 and 25.2 ± 4.2 . The concentrations of fasting glucose and lipid levels were significantly higher in the group with diabetes except for LDL-cholesterol that did not differ. Measurements of urea and creatinine showed that in both groups there was no evidence of renal failure. Molecular analysis obtained from 14 amplicons that comprehends the genetic regions studied showed variations, all in transition form, in four noncoding regions in 13 of the studied samples (6.5%). The variations were identified: c.43441A>G (intron3, not described), c.44702T>C (Intron6, rs2268574), c.48935C>T (Intron9, rs2908274) and c.49620G>A (Exon10 noncoding region, rs13306388). Estimated frequencies and 95% confidence interval (95% CI) for the rare alleles of the variants described were: G-allele, 0.3% (0-1%), C-allele, 3.3% (2-5%), T-allele, 0.8% (0-2%) and allele-A, 1% (0-2%) respectively for the variants found in Introns 3, 6, 9 and Exon10. For none of the variants were observed association with disease processes. In summary, the Glucokinase gene variant did not show associated-"hotspot" variant with gestational diabetes in the study population and a new variant in Intron3 (c.43441A>G) was identified in this study.

Keyword: Gestational *Diabetes mellitus*, SNPs, Glucokinase, Genetic Variability.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. EVOLUÇÃO ANUAL DO DIABETES NO BRASIL.	25
FIGURA 2. CRITÉRIO DE DIAGNÓSTICO DO DMG NA POPULAÇÃO BRASILEIRA.....	28
FIGURA 3. MECANISMO DE AÇÃO PANCREÁTICO DA GLUCOQUINASE.....	32
FIGURA 4. MECANISMO DE AÇÃO HEPÁTICO DA GLUCOQUINASE.	33
FIGURA 5. SEQUÊNCIA DE AMINOÁCIDOS DA GLUCOQUINASE.	34
FIGURA 6. LOCALIZAÇÃO DO GENE DA GCK NO CROMOSSOMO 7.....	35
FIGURA 7. MAPA DO GENE E ESTRUTURA DOS EXONS DA GCK EM <i>HOMO SAPIENS SAPIENS</i>	36
FIGURA 8. FLUXOGRAMA DAS PRINCIPAIS ETAPAS DO PROJETO DE PESQUISA.....	39
FIGURA 9. PERFIL ELETROFORÉTICO TÍPICO DE PRODUTOS DE PCR DO GCKE1A1 DO GENE DA GCK.....	49
FIGURA 10. PERFIL ELETROFORÉTICO TÍPICO DA REAÇÃO DE PCR-SSCP DO GCKE1A1 DO GENE DA GCK.....	50
FIGURA 11. PERFIL ELETROFORÉTICO DE PARTE DA REAÇÃO DE SEQUENCIAMENTO DO GCKE1A1 DO GENE DA GCK.	50
FIGURA 12. PERFIL ELETROFORÉTICO TÍPICO DE PRODUTOS DE PCR DO GCKE1A2 DO GENE DA GCK.....	51
FIGURA 13. PERFIL ELETROFORÉTICO TÍPICO DA REAÇÃO DE PCR-SSCP DO GCKE1A2 DO GENE DA GCK.....	51
FIGURA 14. PERFIL ELETROFORÉTICO DE PARTE DA REAÇÃO DE SEQUENCIAMENTO DO GCKE1A2 DO GENE DA GCK.	51
FIGURA 15. PERFIL ELETROFORÉTICO TÍPICO DE PRODUTOS DE PCR DO GCKE1A3 DO GENE DA GCK.....	52
FIGURA 16. PERFIL ELETROFORÉTICO TÍPICO DA REAÇÃO DE PCR-SSCP DO GCKE1A3 DO GENE DA GCK.....	52
FIGURA 17. PERFIL ELETROFORÉTICO DE PARTE DA REAÇÃO DE SEQUENCIAMENTO DO GCKE1A3 DO GENE DA GCK.	53
FIGURA 18. PERFIL ELETROFORÉTICO TÍPICO DE PRODUTOS DE PCR DO GCKE2 DO GENE DA GCK.	53
FIGURA 19. PERFIL ELETROFORÉTICO TÍPICO DA REAÇÃO DE PCR-SSCP DO GCKE2 DO GENE DA GCK.	54
FIGURA 20. PERFIL ELETROFORÉTICO DE PARTE DA REAÇÃO DE SEQUENCIAMENTO DO GCKE2 DO GENE DA GCK.	54

FIGURA 21. PERFIL ELETROFORÉTICO TÍPICO DE PRODUTOS DE PCR DO GCKE3 DO GENE DA GCK.	55
FIGURA 22. PERFIL ELETROFORÉTICO TÍPICO DA REAÇÃO DE PCR-SSCP DO GCKE3 DO GENE DA GCK.	55
FIGURA 23. PERFIL ELETROFORÉTICO DE PARTE DA REAÇÃO DE SEQUENCIAMENTO DO GCKE3 DO GENE DA GCK.	56
FIGURA 24. PERFIL ELETROFORÉTICO TÍPICO DE PRODUTOS DE PCR DO GCKE4 DO GENE DA GCK.	56
FIGURA 25. PERFIL ELETROFORÉTICO TÍPICO DA REAÇÃO DE PCR-SSCP DO GCKE4 DO GENE DA GCK.	57
FIGURA 26. PADRÕES ENCONTRADOS, FREQUÊNCIAS E ANÁLISES DE SEQUENCIAMENTO DAS VARIANTES ENCONTRADAS NOS PERFIS DE PCR-SSCP DO GCKE4 DO GENE DA GCK.	58
FIGURA 27. PERFIL ELETROFORÉTICO TÍPICO DE PRODUTOS DE PCR DO GCKE5e6 DO GENE DA GCK.	59
FIGURA 28. PERFIL ELETROFORÉTICO TÍPICO DA REAÇÃO DE PCR-SSCP DO GCKE5e6 DO GENE DA GCK.	59
FIGURA 29. PADRÕES, FREQUÊNCIAS E ANÁLISES DE SEQUENCIAMENTO DAS VARIANTES ENCONTRADAS NOS PERFIS DE PCR-SSCP DO GCKE5e6 DO GENE DA GCK.	60
FIGURA 30. PERFIL ELETROFORÉTICO TÍPICO DE PRODUTOS DE PCR DO GCKE7 DO GENE DA GCK.	61
FIGURA 31. PERFIL ELETROFORÉTICO TÍPICO DA REAÇÃO DE PCR-SSCP DO GCKE7 DO GENE DA GCK.	61
FIGURA 32. PERFIL ELETROFORÉTICO DE PARTE DA REAÇÃO DE SEQUENCIAMENTO DO GCKE7 DO GENE DA GCK.	62
FIGURA 33. PERFIL ELETROFORÉTICO TÍPICO DE PRODUTOS DE PCR DO GCKE8 DO GENE DA GCK.	62
FIGURA 34. PERFIL ELETROFORÉTICO TÍPICO DA REAÇÃO DE PCR-SSCP DO GCKE8 DO GENE DA GCK.	63
FIGURA 35. PERFIL ELETROFORÉTICO DE PARTE DA REAÇÃO DE SEQUENCIAMENTO DO GCKE8 DO GENE DA GCK.	63
FIGURA 36. PERFIL ELETROFORÉTICO TÍPICO DE PRODUTOS DE PCR DO GCKE9 DO GENE DA GCK.	64
FIGURA 37. PERFIL ELETROFORÉTICO TÍPICO DA REAÇÃO DE PCR-SSCP DO GCKE9 DO GENE DA GCK.	64

FIGURA 38. PADRÕES ENCONTRADOS, FREQUÊNCIAS E ANÁLISES DE SEQUENCIAMENTO DAS VARIANTES ENCONTRADAS NOS PERFIS DE PCR-SSCP DO GCKE9 DO GENE DA GCK.....	65
FIGURA 39. PERFIL ELETROFORÉTICO TÍPICO DE PRODUTOS DE PCR DO GCKE10A1 DO GENE DA GCK.....	66
FIGURA 40. PERFIL ELETROFORÉTICO TÍPICO DA REAÇÃO DE PCR-SSCP DO GCKE10A1 DO GENE DA GCK.....	67
FIGURA 41. PERFIL ELETROFORÉTICO DE PARTE DA REAÇÃO DE SEQUENCIAMENTO DO GCKE10A1 DO GENE DA GCK.....	67
FIGURA 42. PERFIL ELETROFORÉTICO TÍPICO DE PRODUTOS DE PCR DO GCKE10A2 DO GENE DA GCK.....	68
FIGURA 43. PERFIL ELETROFORÉTICO TÍPICO DA REAÇÃO DE PCR-SSCP DO GCKE10A2 DO GENE DA GCK.....	68
FIGURA 44. PADRÕES ENCONTRADOS, FREQUÊNCIAS E ANÁLISES DE SEQUENCIAMENTO DAS VARIANTES ENCONTRADAS NOS PERFIS DE PCR-SSCP DO GCKE10A2 DO GENE DA GCK.	69
FIGURA 45. PERFIL ELETROFORÉTICO TÍPICO DE PRODUTOS DE PCR DO GCKE10A3 DO GENE DA GCK.....	70
FIGURA 46. PERFIL ELETROFORÉTICO TÍPICO DA REAÇÃO DE PCR-SSCP DO GCKE10A3 DO GENE DA GCK.....	70
FIGURA 47. PERFIL ELETROFORÉTICO DE PARTE DA REAÇÃO DE SEQUENCIAMENTO DO GCKE10A3 DO GENE DA GCK.....	70
FIGURA 48. PERFIL ELETROFORÉTICO TÍPICO DE PRODUTOS DE PCR DO GCKE10A4 DO GENE DA GCK.....	71
FIGURA 49. PERFIL ELETROFORÉTICO TÍPICO DA REAÇÃO DE PCR-SSCP DO GCKE10A4 DO GENE DA GCK.....	71
FIGURA 50. PERFIL ELETROFORÉTICO DE PARTE DA REAÇÃO DE SEQUENCIAMENTO DO GCKE10A4 DO GENE DA GCK.....	72
FIGURA 51. LOCALIZAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DAS VARIANTES GENÉTICAS OBSERVADAS NO ESTUDO.....	73
FIGURA 52. RELAÇÃO ENTRE OS GENÓTIPOS DO POLIMORFISMO rs2268574 DO AMPLICON 5e6 COM A CONCENTRAÇÃO SÉRICA DE ÁCIDO ÚRICO.....	74

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. CATEGORIAS DE RISCO PARA O DIABETES GESTACIONAL.....	27
TABELA 2. EXEMPLOS DE POLIMORFISMOS NO GENE DA GCK.....	37
TABELA 3. OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES E SUAS CARACTERÍSTICAS.....	42
TABELA 4. CONDIÇÕES PARA A REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE.....	43
TABELA 5. PREPARO DOS GÉIS PARA PCR-SSCP.....	44
TABELA 6. CONDIÇÕES PARA OS ENSAIOS DE PCR-SSCP.....	45
TABELA 7. DADOS ANTROPOMÉTRICOS E LABORATORIAIS DOS GRUPOS EM ESTUDO.	48

LISTA DE ANEXOS

ANEXO I. Termo de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa do Setor de Ciências da Saúde da UFPR.....	96
ANEXO II. Protocolo de Extração de DNA pelo método de <i>salting out</i>	97

LISTA DE ABREVIATURAS

ADA	<i>American Diabetes Association</i> - Associação Americana de Diabetes.
CTRL	Controle
DAC	Doença Arterial Coronariana.
DM	<i>Diabetes mellitus</i> .
DMG	<i>Diabetes mellitus</i> Gestacional.
DNA	Ácido desoxirribonucléico.
GCK	Glucoquinase.
GCKE1	Exon1 do gene da Glucoquinase.
GCKE10A1	Exon10Amplicon1 do Gene da Glucoquinase.
GCKE10A2	Exon10Amplicon2 do Gene da Glucoquinase.
GCKE10A3	Exon10Amplicon3 do Gene da Glucoquinase.
GCKE10A4	Exon10Amplicon4 do Gene da Glucoquinase.
GCKE1A1	Exon1Amplicon1 do Gene da Glucoquinase.
GCKE1A2	Exon1Amplicon2 do Gene da Glucoquinase.
GCKE1A3	Exon1Amplicon3 do Gene da Glucoquinase.
GCKE2	Exon2 do gene da Glucoquinase.
GCKE3	Exon3 do gene da Glucoquinase.
GCKE4	Exon4 do gene da Glucoquinase.
GCKE5e6	Exon5e6 do gene da Glucoquinase.
GCKE7	Exon7 do gene da Glucoquinase.
GCKE8	Exon8 do gene da Glucoquinase.
GCKE9	Exon9 do gene da Glucoquinase.
GCKRP	Proteína Reguladora da Glucoquinase.
GGCK	Gene da Glucoquinase
HbA1C	Hemoglobina glicada.
HK	Hexoquinase
HK-D	Hexoquinase D - Glucoquinase.
HK-IV	Hexoquinase tipo IV - Glucoquinase.
HPLC	Coromatografia Líquida de Alta Eficiência.
IMC	Índice de Massa Corpórea.
LMC	Laboratório da Prefeitura Municipal de Curitiba.
MODY	<i>Maturity-onset Diabetes of the young</i> - Diabetes Monogênico.

MODY-2	<i>Maturity-onset Diabetes of the young type 2</i> - Diabetes Monogênico da Glucoquinase.
PCR	<i>Polimerase Chain Reaction</i> - Reação em Cadeia da Polimerase.
PCR-SSCP	<i>Single Strand Conformation Polimorphism</i> - Polimorfismo Conformacional de Fita Simples.
PNPH	Programa Nacional de Padronização de Hemoglobina Glicada.
RAGE	Produtos de Glicação Avançada.
SBD	Sociedade Brasileira de Diabetes
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i> - Polimorfismo de único nucleotídeo.
TOTG	Teste Oral de Tolerância à Glucose.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
2	OBJETIVOS	20
2.1	OBJETIVO GERAL	20
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
3	REVISÃO DA LITERATURA	21
3.1	SINTOMAS DO <i>DIABETES MELLITUS</i>	21
3.2	CLASSIFICAÇÃO E DIAGNÓSTICO DO <i>DIABETES MELLITUS</i>	22
3.3	EPIDEMIOLOGIA DO <i>DIABETES MELLITUS</i>	23
3.4	<i>DIABETES MELLITUS</i> GESTACIONAL.....	25
3.5	DIAGNÓSTICO DO <i>DIABETES MELLITUS</i> GESTACIONAL	27
3.6	TRATAMENTO DO <i>DIABETES MELLITUS</i> GESTACIONAL.....	29
3.7	VARIAÇÕES GENÉTICAS ASSOCIADAS AO <i>DIABETES</i>	29
3.8	A PROTEÍNA GLUCOQUINASE.....	29
3.8.1	Mecanismo de Ação da Glucoquinase	30
3.8.2	Isoformas da Glucoquinase.....	33
3.9	O GENE DA GLUCOQUINASE	35
3.9.1	Polimorfismos no Gene da Glucoquinase	36
4	MATERIAL E MÉTODOS	38
4.1	AMOSTRAS	38
4.1.1	Parâmetros Analisados nas amostras.....	40
4.2	OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES (<i>PRIMERS</i>).....	41
4.3	PCR (<i>Polimerase Chain Reaction</i>).....	43
4.4	PCR-SSCP (<i>Single Strand Conformation Polymorphism</i>).....	44
4.5	SEQUENCIAMENTO DE DNA.....	45
4.5.1	Purificação de produtos de PCR	45
4.5.2	Reação de sequenciamento.....	45
4.5.3	Purificação do produto de sequenciamento	46
4.5.4	Análise das sequências.....	46
4.5.5	Pesquisa e Identificação dos SNPs	46
4.6	ANÁLISES ESTATÍSTICAS	47
5	RESULTADOS	48
5.1	AMOSTRA	48

5.2	EXON1 DO GENE DA GLUCOQUINASE (GCKE1)	49
5.2.1	Exon1Aplicon1 do Gene da Glucoquinase (GCKE1A1).....	49
5.2.2	Exon1Aplicon2 do Gene da Glucoquinase (GCKE1A2)	50
5.2.3	Exon1Aplicon3 do Gene da Glucoquinase (GCKE1A3)	52
5.3	EXON2 DO GENE DA GLUCOQUINASE (GCKE2)	53
5.4	EXON3 DO GENE DA GLUCOQUINASE (GCKE3)	54
5.5	EXON4 DO GENE DA GLUCOQUINASE (GCKE4)	56
5.5.1	Varição Genética do GCKE4 do gene da Glucoquinase.	57
5.6	EXON5e6 DO GENE DA GLUCOQUINASE (GCKE5e6)	58
5.6.1	Varição Genética do GCKE5e6 do gene da Glucoquinase.	59
5.7	EXON7 DO GENE DA GLUCOQUINASE (GCKE7)	61
5.8	EXON8 DO GENE DA GLUCOQUINASE (GCKE8)	62
5.9	EXON9 DO GENE DA GLUCOQUINASE (GCKE9)	63
5.8.1	Varição Genética do GCKE9 do gene da Glucoquinase.	64
5.10	EXON10 DO GENE DA GLUCOQUINASE (GCKE10)	66
5.10.1	Exon10Aplicon1 do Gene da Enzima Glucoquinase (GCKE10A1) ...	66
5.10.2	Exon10Aplicon2 do Gene da Enzima Glucoquinase (GCKE10A2) ...	67
5.10.2.1	Varição Genética do GCKE10A2 do gene da Glucoquinase.....	68
5.10.3	Exon10Aplicon3 do Gene da Enzima Glucoquinase (GCKE10A3) ...	69
5.10.4	Exon10Aplicon4 do Gene da Enzima Glucoquinase (GCKE10A4) ...	71
6	DISCUSSÃO	75
6.1	PARÂMETROS ANTROPOMÉTRICOS E OUTROS	75
6.2	PARÂMETROS LABORATORIAIS (BIOMARCADORES)	79
6.3	ANÁLISES MOLECULARES.....	81
6.3.1	Reação de SSCP e Sequenciamento de DNA.....	81
6.3.2	Sítios sem alteração.....	83
6.3.3	Sítios apresentando variabilidade	83
6.3.4	Análise com biomarcadores	85
6.4	CONSIDERAÇÕES FINAIS E FUTURAS	86
7	CONCLUSÕES	87
	REFERÊNCIAS.....	88
	ANEXOS.....	96

1 INTRODUÇÃO

O *Diabetes mellitus* (DM) constitui uma síndrome de frequência crescente na população mundial. As causas do DM não são conhecidas, contudo múltiplos fatores estão associados ao diabetes como o hábito de vida, a alimentação hipercalórica (obesidade) e a variabilidade genética, sendo postulado que estes fatores contribuam de forma significativa para o desenvolvimento e expressão (fenótipo) da patologia.

As técnicas de mapeamento genético abriram a era da identificação de genes de suscetibilidade às doenças. A fonte mais abundante de variação genética no genoma humano é representada pelo polimorfismo de único nucleotídeo (SNP), o qual pode ser responsável pelas diferenças inter-individuais em fenótipos complexos. Os estudos de identificação e associação de SNPs podem contribuir para a identificação da origem ou do mecanismo molecular da susceptibilidade ou mesmo de proteção para doenças, podendo assim propiciar informação diagnóstica acurada o que resultaria no diagnóstico precoce, prevenção, e tratamento de doenças humanas. Estudos de associação genética envolvendo a detecção de SNPs são considerados uma abordagem eficiente para identificar efeitos moderados destas variantes genéticas, em doenças multifatoriais e complexas.

O DM pode ser classificado em vários tipos, sendo que neste trabalho será abordado o *Diabetes mellitus* Gestacional e sua relação com a variabilidade genética da enzima Glucoquinase (GCK). Esta enzima é um sensor pancreático da glicemia para a liberação de insulina. Poucos estudos na população brasileira estão disponíveis e mutações no gene da GCK estão associadas a um tipo de diabetes monogênico (MODY-2). Desta forma, propomos estudar variações genéticas do gene GCK associadas ao *Diabetes mellitus* Gestacional (DMG) ou suas complicações como a obesidade; controle glicêmico e processos inflamatórios na busca de novos marcadores genéticos para esta patologia ou suas complicações.

Justificado pelo baixo número de estudos realizados com a população brasileira em relação a este tema, e sabido a sua importância, este trabalho permitiu conhecer o perfil desta população quanto aos fatores genéticos associados ao diabetes gestacional, possibilitando futuras intervenções de prevenção em pacientes de risco e mesmo o aconselhamento genético quando pertinente.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar as variações genéticas associadas às regiões codificadoras e flanqueadoras dos exons do gene da Glucoquinase na busca de marcadores moleculares para o *Diabetes mellitus* Gestacional na população brasileira.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

2.2.1 Amplificar todos os exons e regiões flanqueadoras do gene da Glucoquinase através da reação em cadeia da polimerase (PCR).

2.2.2 Otimizar as condições da reação de PCR-SSCP (polimorfismo de conformação de fita simples) para cada amplicon em estudo, para triagem das variações genéticas.

2.2.3 Identificar as variações genéticas através da reação de sequenciamento de DNA e respectivas frequências genotípicas e alélicas.

2.2.4 Associar as variações genéticas do gene da Glucoquinase com biomarcadores laboratoriais e dados clínicos no *Diabetes mellitus* gestacional.

3 REVISÃO DA LITERATURA

O *Diabetes mellitus* (DM) é um grupo de doenças metabólicas caracterizadas por hiperglicemia resultante de defeitos na secreção da insulina, na ação da insulina, ou em ambos. A hiperglicemia crônica do diabetes leva, em longo prazo, à disfunção e falência de vários órgãos, especialmente os olhos, rins, sistema nervoso e vasos sanguíneos (ADA, 2010a).

Muitos processos patológicos estão envolvidos no desenvolvimento do diabetes vão desde a destruição autoimune das células beta do pâncreas com consequente deficiência de insulina, até anomalias que resultam na resistência à ação da insulina. A causa das anormalidades no metabolismo dos carboidratos, dos lipídios e das proteínas nos diabéticos, é a ação deficiente da insulina nos tecidos alvos. A ação deficiente da insulina resulta da secreção inadequada da mesma e/ou da diminuição da resposta à insulina pelo tecido (WILD *et al.*, 2004). As complicações do diabetes a longo prazo incluem: retinopatia com potencial perda da visão; nefropatia podendo chegar à falência renal; neuropatia periférica com risco de úlceras nos pés; amputações; doença de *Charcot*; e neuropatia autônoma causando sintomas gastrointestinais, geniturinários e cardiovasculares, além de disfunção sexual. Pacientes com diabetes têm uma incidência maior de doença cardiovascular e cerebrovascular. Hipertensão e anormalidades no metabolismo lipídico são frequentemente encontradas em pessoas com diabetes (SBD, 2007; ADA, 2010a). Além disso, vale salientar que com mudanças no estilo de vida, com o advento da industrialização e urbanização, verifica-se o aumento da obesidade e do sedentarismo, os quais constituem importantes fatores de risco para inúmeras doenças, dentre elas o diabetes (CESSE *et al.*, 2009).

3.1 SINTOMAS DO DIABETES MELLITUS

Os sintomas clássicos que caracterizam o diabetes incluem a hiperglicemia, ou seja, o aumento das concentrações de glucose no sangue acima de 126mg/dL, poliúria (aumento do volume urinário), polidipsia (sede excessiva persistente), perda

de peso e em alguns casos, polifagia (fome excessiva) e visão embaçada (FOWLER, 2007).

A maioria dos pacientes com diabetes, principalmente aqueles pertencentes ao tipo 2, grupo que representa cerca de 90% do total de diabéticos, são assintomáticos (DIB, 2008). Nestes, o diabetes é detectado por determinações de glicemia associadas à prevenção ou de forma esporádica devido às manifestações tais como redução rápida da acuidade visual, infecções repetidas, dificuldade na cicatrização de feridas ou outras comuns a múltiplos processos patológicos (BEN-HAROUSH; YOGEV; HOD, 2004).

3.2 CLASSIFICAÇÃO E DIAGNÓSTICO DO *DIABETES MELLITUS*

A Associação Americana de Diabetes (ADA, 2010a) propõe uma classificação baseada na etiologia das várias formas do diabetes amplamente aceita na comunidade científica. As quatro grandes categorias do diabetes são:

- Diabetes Tipo 1: resultante de uma deficiência absoluta de insulina causada pela destruição autoimune das células beta pancreáticas (Ilhotas de *Langerhans*). Essa condição é comumente designada como “insulinodependente” ou “diabetes juvenil”.
- Diabetes Tipo 2: causado pela combinação da resistência à insulina e a deficiência de produção deste hormônio, com o aumento da produção hepática de glucose. Muitos pacientes com esta forma de diabetes são obesos (~85%), e sabe-se que a obesidade *per se* causa resistência à insulina. Esta forma de diabetes é usualmente designada como “diabetes da maturidade” ou “diabetes não-insulino dependente”.
- Diabetes *mellitus* Gestacional é definido como qualquer grau de intolerância à glucose com início ou primeiro reconhecimento durante a gravidez.
- Outras formas específicas de diabetes: são reconhecidos mais de 56 tipos específicos de diabetes. Como principais grupos destacam-se: os defeitos genéticos na função das células beta pancreáticas (diabetes

tipo MODY, *Maturity-Onset Diabetes of the Young*); defeitos genéticos que alteram a ação da insulina; doenças do pâncreas; endocrinopatias; indução química ou por drogas; infecções; formas incomuns de diabetes mediados pelo sistema imune; síndromes genéticas associadas ao diabetes em alguns casos.

Segundo o *Executive Summary: Standards of Medical Care in Diabetes – 2010*, foram admitidos os seguintes critérios para o diagnóstico de *diabetes mellitus* (ADA, 2010b):

- Hemoglobina glicada (HbA1C) $\geq 6,5\%$: Aprovado recentemente. O teste deve ser realizado em laboratório utilizando o método certificado e padronizado pelo Programa Nacional de Padronização de Hemoglobina Glicada (PNPH).
- Glicemia de Jejum $\geq 126\text{mg/dL}$ ($7,0\text{mMol/L}$). O Jejum é definido como nenhuma ingestão calórica por pelo menos 8 horas antes do teste.
- Glicemia de 2 horas $\geq 200\text{mg/dL}$ ($11,1\text{mMol/L}$) após o teste oral de tolerância a glicose (TOTG). Esse teste deve ser executado segundo descrito pela Organização Mundial de Saúde (OMS) usando o equivalente a 75g de glicose anidra solubilizada em água.
- Glicemia ao acaso de 200mg/dL ($11,1\text{mMol/L}$) em pacientes com sintomas clássicos de hiperglicemia ou crises hiperglicêmicas.

Sendo que, na ausência de hiperglicemia inequívoca, os 3 primeiros critérios devem ser confirmados, repetindo-se o teste.

3.3 EPIDEMIOLOGIA DO DIABETES MELLITUS

Segundo as diretrizes publicadas pela Sociedade Brasileira de Diabetes, no final da década de 1980, a prevalência de DM na população adulta brasileira estaria em torno de 7,6%. A Sociedade Brasileira de Diabetes, no ano de 2004, estimou que, no Brasil, cerca de 50% dos pacientes com diabetes não estão diagnosticados, e que em 2005 um número expressivo de brasileiros diabéticos comporia aproximadamente 8 milhões de indivíduos. O número de pessoas com diabetes está

crescendo devido ao crescimento da população, à maior expectativa de vida, à urbanização, à obesidade e à falta de atividade física (WILD *et al.*, 2004). A influência da idade na prevalência de DM e na tolerância à glucose diminuída também é relatada. Uma variação de 2,7% para a faixa etária de 30-59 anos e de 17,4% para a de 60-69 anos, compreendendo um aumento que corresponde a 6,4 vezes. As diretrizes da SBD também expressam a existência de marcantes diferenças na prevalência do DM entre diversos países e grupos étnicos. As taxas mais elevadas foram descritas para *Nauru*, na Oceania, e para os índios *Pima*, no Arizona, EUA, onde praticamente metade da população adulta apresenta DM (SBD, 2007). A primeira campanha nacional de triagem para diabetes realizada em 2001 patrocinada pelo governo brasileiro identificou 2,9 milhões de pessoas com suspeita de *Diabetes mellitus*, correspondendo a 14,6% da população. Cerca de 39 milhões de reais no ano de 2.000 foram gastos pelo Sistema Único de Saúde com a hospitalização por *Diabetes mellitus*, sendo justificados os elevados valores pela alta permanência hospitalar e a severidade das complicações destes pacientes, o que demanda procedimentos de elevada complexidade. (<http://www.saude.gov.br/sps/areastecnicas/cnhd/publicacoes/home.htm>).

No mundo, em projeções realizadas sobre a expansão do DM, acredita-se que o número de pessoas irá dobrar entre os anos 2.000 e 2.030, passando de 171 milhões em 2.000 para 366 milhões em 2.030 (WILD *et al.*, 2004). Estima-se haver, no Brasil, cerca de 370.000 indivíduos adultos com diabetes diagnosticados e catalogados (DATASUS, 2010). A Figura 1 apresenta a evolução do diabetes no Brasil nos últimos 10 anos (janeiro de 2.000 a dezembro de 2.010).

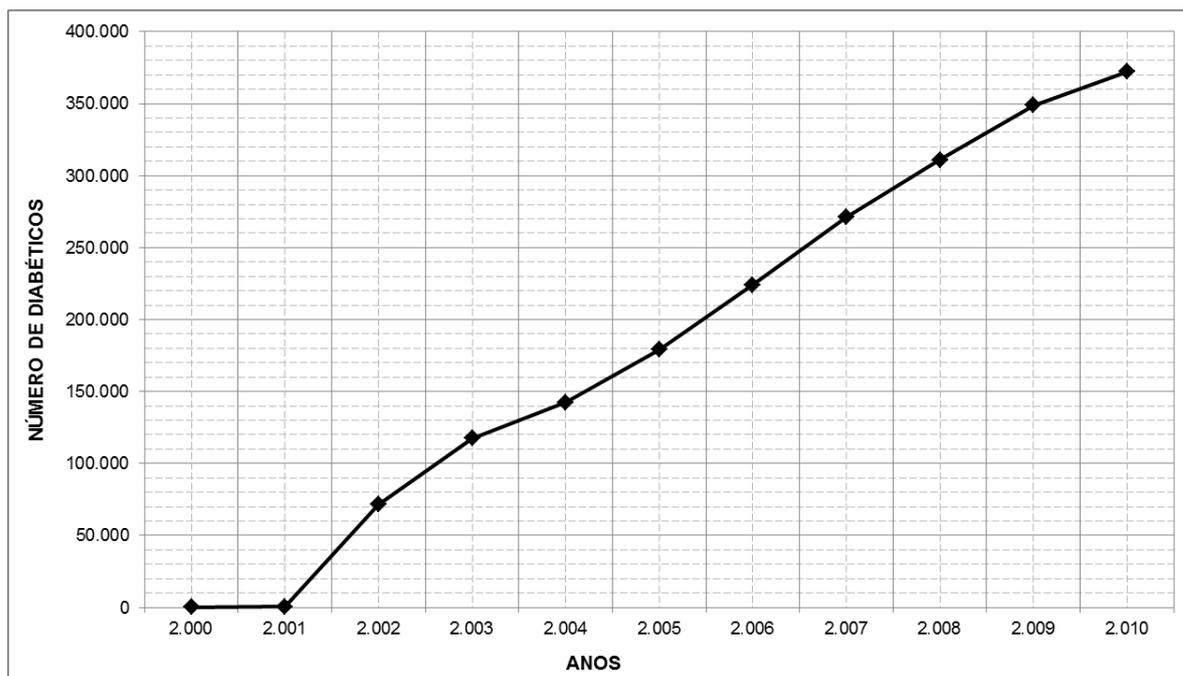


FIGURA 1. EVOLUÇÃO ANUAL DO DIABETES NO BRASIL.

Fonte: Adaptado de DATASUS, 2010

(<http://hiperdia.datasus.gov.br/hiperelhhiperrisco.asp>).

Para os anos de 2000 a 2001, o número de indivíduos catalogados foi 225 e 635, respectivamente.

3.4 DIABETES MELLITUS GESTACIONAL

O *Diabetes mellitus* Gestacional (DMG) é definido como a intolerância a glucose com início ou primeiro reconhecimento durante a gravidez (ADA, 2010a). É uma intolerância por carboidrato de diversos graus de severidade, sendo recomendado que se faça uma triagem entre 24 e 28 semanas de gestação (FORCE, 2003; SESHIAH *et al.*, 2007). Até 40% das mulheres com diabetes gestacional podem ser diagnosticadas no início da gravidez (SESHIAH *et al.*, 2008). Anualmente, são diagnosticados, aproximadamente, 200.000 casos de diabetes gestacional. Sua frequência é de aproximadamente 7% de todas as gestações, variando de 1-14%, dependendo da população e dos testes usados para o diagnóstico (ADA, 2010a).

Mulheres com história de DMG têm maior probabilidade de desenvolver diabetes tipo 2 e doenças cardiovasculares após a gravidez, em comparação com mulheres que permaneceram normoglicêmicas durante a gravidez. Os fatores de

risco incluem idade materna avançada, alta paridade, história familiar de diabetes, sobrepeso e obesidade, os quais têm sido utilizados para fins de triagem no diabetes gestacional (ENQUOBAHRIE *et al.*, 2005).

O estilo de vida também pode influenciar no diabetes gestacional. Mulheres com peso normal, comumente, têm uma alimentação mais saudável do que as mulheres com excesso de peso antes e após a gravidez. Mulheres com história clínica de DMG, apesar do seu alto risco futuro para desenvolver diabetes tipo 2, não são capazes de mudar o estilo de vida após a gravidez (STAGE; RONNEBY; DAMM, 2004). Sabe-se também que o ganho de peso durante os anos, após o período de gestação, é considerado como fator primário para o surgimento do diabetes tipo 2 (LINNE; BARKELING; ROSSNER, 2002). Um estudo publicado no Brasil evidenciou que além dos fatores já conhecidos (idade superior a 25 anos, deposição central excessiva de gordura, obesidade ou ganho excessivo de peso na gravidez em curso e história familiar de *Diabetes mellitus*), a etnia diferente da caucasiana deveria ser incluída entre os fatores de risco para DMG (DODE; SANTOS IDA, 2009).

A severidade da doença é variável, sendo o DMG considerado uma das mais importantes complicações associadas à gravidez. Como em todas as formas de hiperglicemia, o diabetes gestacional resulta de uma inadequada oferta de insulina endógena para a demanda tecidual (MEYER *et al.*, 1996).

A gravidez é usualmente acompanhada de resistência à insulina progressiva, que inicia na metade da gestação e progride até o terceiro trimestre para níveis que se aproximam dos observados nos indivíduos com diabetes tipo 2 (BUCHANAN; XIANG, 2005). Estes mesmos autores apresentaram categorias de risco para o diabetes gestacional que podem ser observadas na Tabela 1.

TABELA 1. CATEGORIAS DE RISCO PARA O DIABETES GESTACIONAL.

CATEGORIAS DE RISCO	CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS
Risco Alto	Obesidade marcante Diabetes em familiares de primeiro grau História pessoal de intolerância à glucose Gestação anterior com neonato macrossômico Presença de glicosúria
Risco Médio	Características intermediárias que não se enquadram com risco baixo ou alto
Risco Baixo	Idade < que 25 anos Etnia associada a baixo risco Ausência de Diabetes em familiares de primeiro grau Ganho de peso antes e durante a gravidez normal Ausência de história de concentrações de glucose séricas anormais Ausência de intercorrências obstétricas prévias

Adaptado de BUCHANAN E XIANG, 2005.

3.5 DIAGNÓSTICO DO *DIABETES MELLITUS* GESTACIONAL

Avaliação de risco para DMG deve ser realizada na primeira consulta pré-natal. As mulheres com características clínicas compatíveis com um elevado risco DMG (elevado IMC, histórico pessoal do DMG, glicosúria, ou um histórico familiar expressivo de diabetes), devem fazer uma dosagem de glucose sanguínea, logo que possível. Se não forem classificadas como DMG na triagem inicial, devem fazer uma nova dosagem entre as 24^a e 28^a semanas de gestação. Este procedimento também deverá ser feito para mulheres que apresentarem risco médio de diabetes gestacional (ADA, 2010a).

Além disso, segundo *Executive Summary: Standards of Medical Care in Diabetes – 2010*, (Resumo: Padrões de Cuidados Médicos em Diabetes - 2010) foram admitidos os seguintes critérios para a detecção e o diagnóstico do *Diabetes mellitus* gestacional (ADA, 2010b):

Uma triagem analisando os fatores de risco e, se necessário, TOTG (Teste Oral de Tolerância à Glucose). Para as mulheres com DMG, uma triagem para o

diabetes em 6 a 12 semanas após o parto e acompanhamento com exames posteriores para o desenvolvimento de pré-diabetes ou diabetes.

A Sociedade Brasileira de Diabetes, com base no Estudo Brasileiro de Diabetes Gestacional (Ministério da Saúde) indica como triagem inicial a glicemia de jejum na primeira consulta, considerando positiva uma glicemia igual ou superior a 85mg/dl. Glicemia de jejum igual ou superior a 110mg/dL deverá ser repetida antes do início da dieta alimentar; um segundo valor igual ou superior a 110mg/dL caracteriza o diagnóstico de diabetes gestacional. Glicemia de jejum entre 85 e 110mg/dL, indica necessidade de encaminhamento para o TOTG.

Crianças nascidas de mães diabéticas possuem uma chance maior de serem obesas e terem intolerância à glucose ou diabetes na adolescência (KIM; NEWTON; KNOPP, 2002).

A Sociedade Brasileira de Diabetes (2007) bem como o Ministério da Saúde propõe o fluxograma apresentado na Figura 2 para ser utilizado como critério de diagnóstico do DMG na população brasileira.

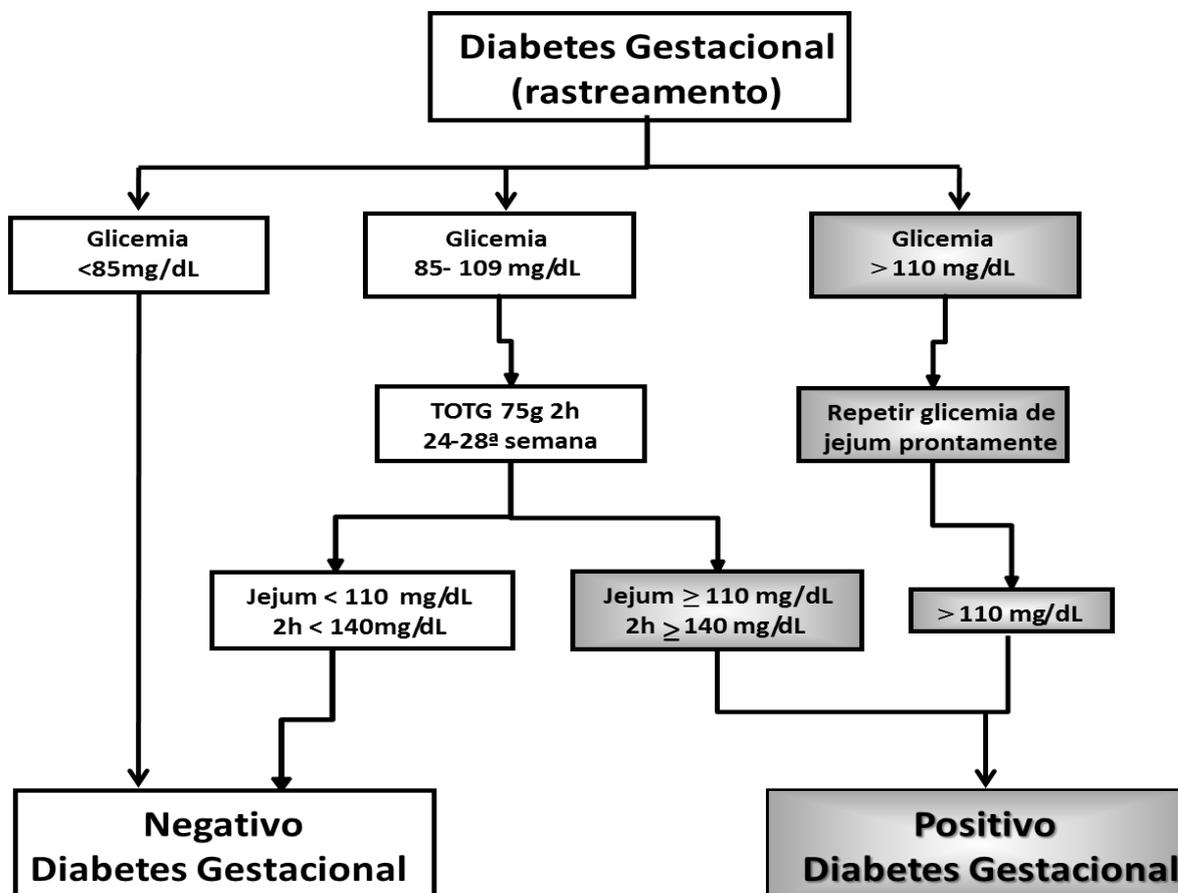


FIGURA 2. CRITÉRIO DE DIAGNÓSTICO DO DMG NA POPULAÇÃO BRASILEIRA.

Fonte: Adaptado de BRASIL. Ministério da Saúde, 2001 e SBD, 2007.

3.6 TRATAMENTO DO *DIABETES MELLITUS* GESTACIONAL

É frequente o retorno à normoglicemia nas mulheres com diabetes gestacional após o parto. Entretanto, devido ao risco aumentado de desenvolverem diabetes tipo 2 mais tarde, devem ser monitoradas. Para reduzir o risco de desenvolver diabetes no futuro, as mulheres devem adotar um estilo de vida saudável, devem regularmente ser submetidas a exame de glicemia para avaliar o possível desenvolvimento de diabetes tipo 2 ou intolerância à glucose (pré-diabetes). Também é recomendada a consulta médica periódica quando estiverem planejando a próxima gestação para monitorar a glicemia (ADA, 2010a).

3.7 VARIAÇÕES GENÉTICAS ASSOCIADAS AO *DIABETES*

Vários genes candidatos têm sido associados ao diabetes e excluindo o diabetes monogênico (MODY), porém até o presente não foi encontrado um locus gênico responsável pela patologia (METZGER *et al.*, 2007). As associações do diabetes com variações genéticas foram primariamente reportadas entre as complicações do diabetes e polimorfismos de único nucleotídeo (SNPs, *Single Nucleotide Polymorphism*). Estudos mostram que mutações no gene da Glucoquinase (MODY-2) podem explicar cerca de 5% do diabetes gestacional (ELLARD *et al.*, 2000; GLOYN, 2003).

Embora amplamente reconhecida a importância do diabetes gestacional na sociedade, surpreendentemente poucos trabalhos na área de genética estão disponíveis para esta patologia (WATANABE *et al.*, 2007).

3.8 A PROTEÍNA GLUCOQUINASE

Descoberta há aproximadamente 40 anos por dois laboratórios independentes, a Glucoquinase possui uma importante função na regulação da glicemia pós-prandial (MATSCHINSKY, F. M.; *et al.*, 2006). Esta enzima possui ponto isoelétrico de 4,85 e massa molecular de 51.919 Da, enquanto que as outras

isoformas de hexoquinases possuem, aproximadamente, o dobro de seu tamanho (IYNEDJIAN, 1993). Uma hipótese que visa justificar esse fato, apesar da grande homologia que apresentam, seria uma possível duplicação do gene da Glucoquinase, em um ancestral distante e não conhecido ao longo da evolução, que daria origem ao gene que codifica para as diferentes isoformas da hexoquinase. Além disso, quando comparada às hexoquinases, apresenta uma menor afinidade pela glucose quando esta se encontra em concentração fisiológica entre 5 e 7mM (DE LA IGLESIA *et al.*, 1999; BALTRUSCH; TIEDGE, 2006). Vale ressaltar que a GCK não é inibida pelas concentrações fisiológicas de glucose 6-fosfatase ao contrário das isoformas de hexoquinases (I, II e III). Estas, também conhecidas por ATP:D-hexose 6-fosfotransferases, estruturalmente, são constituídas por uma cadeia polipeptídica simples e se encontram distribuídas nas células de diferentes tecidos dos mamíferos. Catalisam – em um processo dependente de ATP – a primeira etapa do metabolismo da glucose, convertendo-a em glucose 6-fostato (RUZZO; ANDREONI; MAGNANI, 1998) e possuem um valor de *Km* que varia de 20-130µM (MAHALINGAM *et al.*, 1999).

3.8.1 Mecanismo de Ação da Glucoquinase

A Glucoquinase (GCK, HK-IV, HK-D), ATP:D-hexose 6-fosfotransferase, ou ainda, hexoquinase do tipo IV, EC 2.7.1.1 (http://www.genome.jp/dbget-bin/www_bget?ec:2.7.1.1) é uma enzima monomérica com função dupla proposta por Matschinsky e Ellerman (1968). A GCK 1) catalisa a reação de fosforilação da glucose nas células beta pancreáticas e nos hepatócitos de mamíferos (MATSCHINSKY, F. M.; ELLERMAN, 1968; IYNEDJIAN, 1993; TAKEDA *et al.*, 1993; MATSCHINSKY, F. M.; *et al.*, 2006) e 2) serve como um “sensor” deste monossacarídeo para a secreção de insulina pelo pâncreas. Dessa forma, essa enzima contribui na regulação do metabolismo da glucose (MATSCHINSKY, F. M.; ELLERMAN, 1968; MATSCHINSKY, F. M.; *et al.*, 2006). Antes de ser fosforilada, a molécula de glucose é internalizada pela célula beta pancreática através de um transportador de membrana designado de GLUT2 (PEDELINI *et al.*, 2005).

Nos hepatócitos, a atividade catalítica da GCK é regulada por uma proteína de 68kDa denominada Proteína Reguladora da Glucoquinase (GCKRP) (DE LA IGLESIA *et al.*, 1999). Esta se encontra ligada à GCK dentro do núcleo, tornando a GCK inativa. Quando as concentrações de glucose plasmáticas se elevam, a GCKRP se desliga da GCK que passa à forma livre e ativa no citoplasma para fosforilar a glucose internalizada. Após desempenhar sua função, volta à forma inativa ligada na GCKRP (ARDEN *et al.*, 2004). Além da concentração de glucose, as concentrações de frutose 1-fosfato e frutose 6-fosfato, no meio intracelular, também estão envolvidas no mecanismo de ativação/inativação da GCK. Concentrações aumentadas da primeira favorece a ativação desta enzima e concentrações aumentadas da segunda favorecem a sua inativação (VAN SCHAFTINGEN; VEIGA-DA-CUNHA; NICULESCU, 1997).

A homeostase da glucose é regulada pela secreção dos hormônios insulina, glucagon, cortisol, epinefrina e hormônio do crescimento (ZELENT *et al.*, 2006). Além disso, uma deficiência completa da atividade da Glucoquinase tem sido relacionada ao desenvolvimento de *Diabetes mellitus* permanente do neonato (PNDM). Estes pacientes necessitam de administração de insulina exógena para controlar a hiperglicemia (NJOLSTAD *et al.*, 2003).

A Figura 3 apresenta, de forma detalhada, o mecanismo de ação pancreático da Glucoquinase.

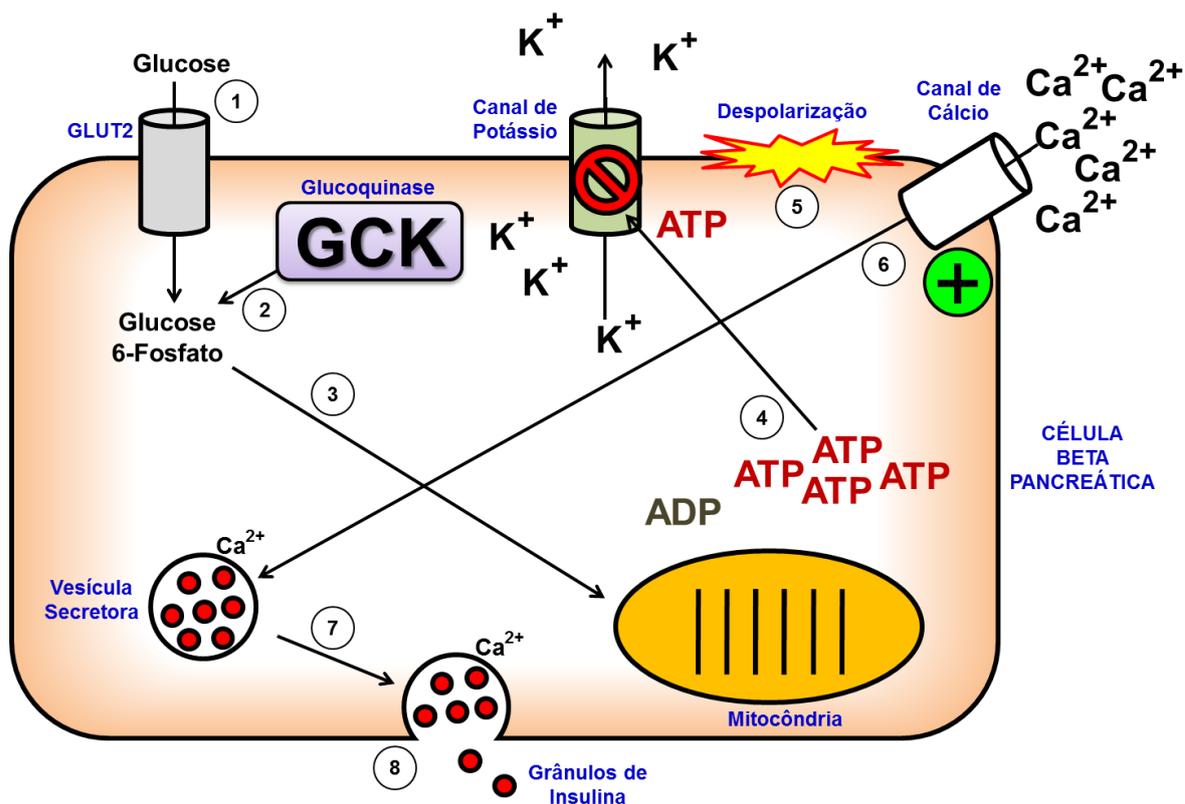


FIGURA 3. MECANISMO DE AÇÃO PANCREÁTICO DA GLUCOQUINASE.

A glucose é internalizada pelo transportador GLUT2 (1) nas células beta pancreáticas. A enzima GCK fosforila a glucose (2), processo inicial da glicolítica, que produz substratos para o ciclo do ácido cítrico na mitocôndria (3). A utilização da glucose aumenta a produção de ATP (4) resultando em bloqueio de canais de potássio ATP-dependentes. O bloqueio desses canais induz uma despolarização da membrana (5) e abertura de canais de cálcio sensíveis à voltagem (6). Como a concentração de íons cálcio livre, no interior das células, é menor que no exterior, observa-se o influxo desses íons. Estes promovem a mobilização de vesículas secretoras (7) contendo grânulos de insulina, resultando na liberação deste hormônio (8) (CHAKRAVARTHY; SEMENKOVICH, 2007; LEHNINGER; NELSON; COX, 2008).

Além do mecanismo de ação pancreático, outro mecanismo que contribui, significativamente, para a homeostase da glucose, no organismo humano, é o mecanismo de ação hepático da Glucoquinase. Este se encontra, de forma detalhada, na Figura 4.

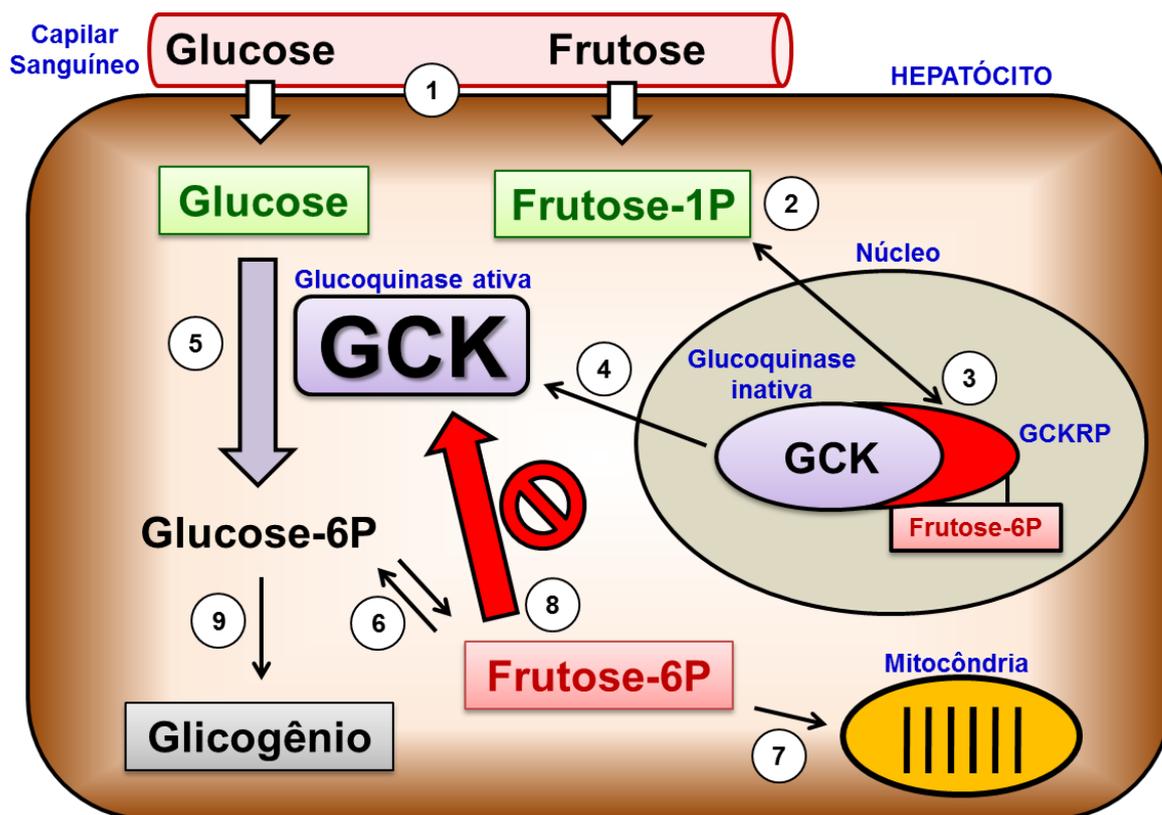


FIGURA 4. MECANISMO DE AÇÃO HEPÁTICO DA GLUCOQUINASE.

Após uma dieta rica em carboidratos, as concentrações de glucose e frutose se elevam na corrente sanguínea e, dessa forma, esses monossacarídeos são internalizados no hepatócito (1). Por um mecanismo de ação paralelo à via glicolítica a enzima frutoquinase (2) adiciona um grupamento fosfato em C1 da frutose resultando em frutose-1-fosfato. Quando as concentrações de glucose e frutose-1P se elevam no citoplasma do hepatócito, a alta afinidade da Proteína Reguladora da Glucoquinase (GCKRP) pela frutose-1P faz com que a GCKRP se desligue da frutose-6-fosfato e da GCK, no interior do núcleo do hepatócito, para se ligar à frutose-1P em excesso (3). Esse processo promove o deslocamento (4) da GCK para o citoplasma do hepatócito seguido de sua ativação. A GCK ativada (5) catalisa, em condições fisiológicas, a reação irreversível de fosforilação da glucose em C6 produzindo glucose-6-fosfato. Na sequência, por um mecanismo catalítico reversível, em condições fisiológicas, a enzima fosfohexose-isomerase converte a glucose-6P no isômero frutose-6P (6). A frutose-6P pode ser consumida na via glicolítica para fins energéticos (7), e, quando em excesso, inibe a GCK (8), pois esta é inibida com elevadas concentrações de frutose-6P ao contrário das outras hexoquinases, as quais são inibidas por elevadas concentrações de glucose-6P. Se a ingestão de carboidratos for excessiva, haverá uma produção aumentada de glucose-6P que poderá ser utilizada para a síntese de glicogênio hepático (9) (VAN SCHAFTINGEN; VEIGA-DA-CUNHA; NICULESCU, 1997; AGIUS; STUBBS, 2000; ARDEN *et al.*, 2004; LEHNINGER; NELSON; COX, 2008).

3.8.2 Isoformas da Glucoquinase

A Glucoquinase possui três isoformas, Isoforma I, Isoforma II e Isoforma III. Quando alinhadas, duas regiões são observadas (Figura 5, seção A): uma fixa e

outra variável na porção N-terminal. As três isoformas apresentam a porção variável N-terminal com aminoácidos diferentes (Figura 5, seção B). A primeira isoforma, também conhecida como isoforma pancreática, possui 465 aminoácidos e sua porção N-terminal possui 15 aminoácidos (MAGNUSON; SHELTON, 1989). A segunda e a terceira isoformas (466 e 464 aminoácidos) são conhecidas como isoformas hepáticas e, em suas porções variáveis N-terminais, apresentam 16 e 14 aminoácidos respectivamente.

A

MLDDRARMEAAKKEKVEQILAEFQLQEEDLKKVMRRMQKEMDRGLRLETHEEASV
KMLPTYVRSTPEGSEVGDFLSLDLGGTNFRVMLVKVGEEGEQWSVKTKHKMYSIPEDAM
TGTAEMLFDYISECISDFLDKHQMKHKKLPLGFTFSFPVRHEDIDKGILLNWTGFKASGAEG
NNVVGLLRDAIKRRGDFEMDVVAMVNDTVATMISCYYEDHQCEVGMIVGTGCNACYMEEM
QNVELVEGDEGRMCVNTEWGAFGDSGELDEFLLLEYDRLVDESSANPGQQLYEKLIGGKYM
GELVRLVLLRLVDENLLFHGEASEQLRTRGAFETRFVSQVESDTGDRKQIYNILSTLGLRPST
TDCDIVRRACESVSTRAAHMCSAGLAGVINRMRESRSEDVMRITVGVGDGSVYKLPSPFKER
FHASVRRRLTPSCEITFIESEEGSGRGAALVSAVACKKACMLGQ

B

ISOFORMAS	NUMERAÇÃO E PORÇÃO VARIÁVEL DOS AMINOÁCIDOS															
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
Isoforma I (Pancreática)	M	L	D	D	R	A	R	M	E	A	A	K	K	E	K	-
Isoforma II (Hepática)	M	A	M	D	V	T	R	S	Q	A	Q	T	A	L	T	L
Isoforma III (Hepática)	M	P	R	P	R	S	Q	L	P	Q	P	N	S	Q	-	-

FIGURA 5. SEQUÊNCIA DE AMINOÁCIDOS DA GLUCOQUINASE.

A seção “A” mostra a sequência de aminoácidos da Isoforma I (Pancreática) da Glucoquinase. A região de destaque (15 aminoácidos para a Isoforma I) corresponde à posição da região variável encontrada nas três isoformas (Figura 5, seção B). Os aminoácidos subsequentes à região de destaque, embora não mostrado para as isoformas II e III, estão na mesma sequência para as três isoformas.

Na seção “B”, a porção variável N-terminal das três isoformas encontra-se alinhada. Em ordem alfabética, os aminoácidos: A (Ala, Alanina), D (Asp, Ácido Aspártico), E (Glu, Ácido Glutâmico), K (Lys, Lisina), L (Leu, Leucina), M (Met, Metionina), N (Asn, Asparagina), P (Pro, Prolina), Q (Gln, Glutamina), R (Arg, Arginina), S (Ser, Serina), T (Thr, Treonina) e V (Val, Valina). Como base nas características destes aminoácidos, os que possuem cadeia lateral apolar (A, L, M e P), os que possuem cadeias laterais neutras (N, Q, S e T), os que apresentam a cadeia lateral carregada positivamente (K e R) e carregada negativamente (D e E).

3.9 O GENE DA GLUCOQUINASE

O gene da Glucoquinase (GGCK) está localizado no braço curto do cromossomo 7, região 7p15.3-p15.1, e codifica uma proteína de 465 aminoácidos (TINTO *et al.*, 2008). Este gene possui, aproximadamente, 52.000pb (pares de base) e contém 10 exons segundo a sequência de referência NCBI NG_008847.1.

Stoffel e colaboradores (1992) atribuem ao gene da GCK 12 exons, pois consideram todas as possibilidades de transcritos ao subdividirem a fração inicial do Exon1 em dois exons (1a, controlado pelo promotor pancreático e 1b e 1c pelo promotor hepático). Essas regiões se encontram ativas nas células destes tecidos específicos. Em células do pâncreas, o promotor pancreático encontra-se ativado e o transcrito é constituído do Exon1a e dos exons 2-10. Em células hepáticas, nas quais o promotor hepático está ativado, o transcrito é constituído dos exons 1b e 1c e dos exons 2-10. Magnuson e Shelton (1989) mencionam que o promotor ativo em células beta do pâncreas está localizado a 12.000 bases acima (*upstream*) do promotor ativo em células do fígado. A utilização desses promotores alternativos, aparentemente, permite que o gene da GCK seja regulado pela insulina no fígado e pela glucose na célula beta pancreática. Dessa forma, ambos desempenham uma importante função na homeostase da glucose.

Sítios de *splicing* podem ser encontrados nas sequências das regiões promotoras pancreática e hepática de mamíferos humanoides. Uma hipótese para esses *splicings* e a de eles estarem envolvidos em um mecanismo de controle celular para a atividade enzimática da GCK, pois quando esta se encontra exposta a concentrações médias e baixas de glucose, sua atividade encontra-se reduzida (IYNEDJIAN, 1993).

A Figura 6 destaca a localização do gene em seu cromossomo correspondente em seres humanos. A Figura 7 representa o mapa do gene e os exons da enzima GCK.



FIGURA 6. LOCALIZAÇÃO DO GENE DA GCK NO CROMOSSOMO 7.

Fonte: Disponível em <<http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=GCK&search=GCK>>. Acesso em 14/10/2010.

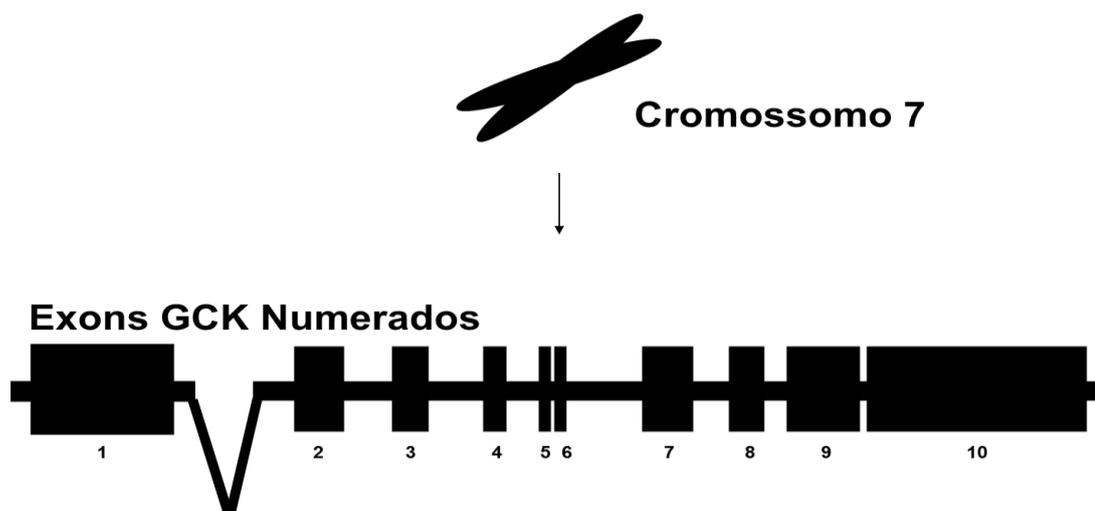


FIGURA 7. MAPA DO GENE E ESTRUTURA DOS EXONS DA GCK EM *HOMO SAPIENS SAPIENS*.

As caixas, numeradas de 1 a 10, representam os exons e a barra central os introns.

3.9.1 Polimorfismos no Gene da Glucoquinase

Mais de 200 polimorfismos no gene da GCK foram descritos e apresentam uma elevada frequência em caucasianos de origem europeia (TINTO *et al.*, 2008). Esses polimorfismos correspondem ao dobro de polimorfismos conhecidos há aproximadamente dez anos (MAHALINGAM *et al.*, 1999). Esses polimorfismos estão associados ao diabetes tipo 2 e, principalmente, ao monogênico MODY-2 (Diabetes da Maturidade na Juventude tipo 2, *Maturity-onset Diabetes of the Young type 2*).

Enquanto que uma mutação heterozigótica, em sítios importantes no gene da Glucoquinase, leva ao MODY-2, uma mutação homozigótica leva à completa perda da atividade dessa enzima, originando o *Diabetes mellitus* Permanente do Neonato (BARROSO, 2005; TURKKAHRAMAN *et al.*, 2008; GREELEY *et al.*, 2010).

O polimorfismo -30G>A do gene da Glucoquinase, encontrado na região promotora, foi associado ao aumento da glicemia em jejum e pós-sobrecarga (75g) em uma população europeia. Essa mutação também está relacionada ao aumento da hemoglobina glicada (glicosilada) e da glicemia de jejum (ROSE *et al.*, 2005; WEEDON *et al.*, 2005). Embora esse polimorfismo tenha uma associação com uma elevação branda da glicemia de jejum, não houve associação com o DMG na população brasileira estudada (SANTOS *et al.*, 2010). A Tabela 2 mostra exemplos polimorfismos encontrados no gene da GCK já descritos na literatura.

TABELA 2. EXEMPLOS DE POLIMORFISMOS NO GENE DA GCK.

EXON (Amplicon)	POLIMORFISMO (Aminoácidos)	Mutações MODY-2/DMG	REFERÊNCIAS
Promotor 1a	-30G>A	DMG	(ZOUALI <i>et al.</i> , 1993; SHAAT <i>et al.</i> , 2006; HOLMKVIST <i>et al.</i> , 2008)
GCKE1	M8I	MODY-2	(JOHANSEN <i>et al.</i> , 2005)
GCKE2	83delA	MODY-2	(MARKS; COUCH, 2010)
	Y108C	MODY-2	(BARRIO <i>et al.</i> , 2002)
	E70K	MODY-2	(TAKEDA <i>et al.</i> , 1993)
GCKE3	T82A	MODY-2	(MARKS; COUCH, 2010)
	A188T	MODY-2	(GIDH-JAIN <i>et al.</i> , 1993; BOUTIN <i>et al.</i> , 1997; LEHTO <i>et al.</i> , 1999; LINDNER; COCKBURN; BELL, 1999; BARRIO <i>et al.</i> , 2002)
	A188E	MODY-2	(BARRIO <i>et al.</i> , 2002)
GCKE4	K161N	MODY-2	(MANTOVANI <i>et al.</i> , 2003).
	M238fsdelT	MODY-2	(BARRIO <i>et al.</i> , 2002).
	F150S	DMG	(ELLARD <i>et al.</i> , 2000)
Intron4	K161 + 2del15	DMG	(ELLARD <i>et al.</i> , 2000)
GCKE5	F171L	MODY-2	(MANTOVANI <i>et al.</i> , 2003).
	L165F	MODY-2	(GALAN <i>et al.</i> , 2006).
	N180K	DMG	(ELLARD <i>et al.</i> , 2000)
	R191W		
GCKE6	T206M	MODY-2	(GALAN <i>et al.</i> , 2006).
	Y215X	DMG	(ELLARD <i>et al.</i> , 2000)
GCKE7	T228R	MODY-2	(MANTOVANI <i>et al.</i> , 2003).
	G258C		
	Glu265K	MODY-2	(GALAN <i>et al.</i> , 2006).
	M238fsdelT	MODY-2	(GIDH-JAIN <i>et al.</i> , 1993; BOUTIN <i>et al.</i> , 1997; LEHTO <i>et al.</i> , 1999; LINDNER; COCKBURN; BELL, 1999; BARRIO <i>et al.</i> , 2002).
	C252Y	MODY-2	(BARRIO <i>et al.</i> , 2002).
	T228M	MODY-2	(STOFFEL <i>et al.</i> , 1992)
	G261R		
	A259T	DMG	(ELLARD <i>et al.</i> , 2000)
	T228A	MODY-2	(KHALIL <i>et al.</i> , 2009)
Intron7	L288-1G > A	DMG	(ELLARD <i>et al.</i> , 2000)
GCKE8	M298K	MODY-2	(BARRIO <i>et al.</i> , 2002)
	G299R	MODY-2	(KHALIL <i>et al.</i> , 2009)
GCKE9	R369P	MODY-2	(BARRIO <i>et al.</i> , 2002)
	S383L		
	S411F		
	A384T	DMG	(ELLARD <i>et al.</i> , 2000)
	R403fsdelC		
	C382Y		
	S383Y	MODY-2	(KHALIL <i>et al.</i> , 2009)
GCKE10	E442K	MODY-2	(BARBETTI <i>et al.</i> , 2009)
	S441W		
	E440G		

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 AMOSTRAS

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Setor de Ciências da Saúde da UFPR sob o Registro CEP/SD: 925.050.10.05 e CAAE: 1925.0.000.091-10. As amostras de DNA foram separadas do banco de amostras do Laboratório de Bioquímica Clínica da UFPR.

A amostra em estudo compreende duzentas pacientes gestantes classificadas em dois grupos: portadoras de diabetes gestacional (DMG, n=100) e um grupo controle saudável (CTRL, n=100). O grupo com diabetes gestacional foi coletado 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). Essa coleta foi supervisionada pelas professoras Dra. Rosângela Roginski Réa e Dra. Ana Cristina Ravazzani de Almeida que são as responsáveis pelo ambulatório de diabetes gestacional do Hospital de Clínicas.

Para caracterização das pacientes com DMG foram utilizados os critérios da Associação Americana de Diabetes (*American Diabetes Association*) publicados em 2010 (ADA, 2010b).

As amostras do grupo controle foram coletadas no Laboratório Municipal de Curitiba, sendo o projeto aprovado pelo Comitê de Ética da Prefeitura sob o Registro 97/2008.

O DNA genômico das amostras do presente estudo foi extraído de leucócitos de sangue periférico (*Buffy Coat*) pelo método *salting out*, com modificações, de Lahiri e Nurberger (1991), para a execução das técnicas de PCR, PCR-SSCP e análise de sequenciamento. O Protocolo desta técnica consta em maiores detalhes no Anexo II.

Foram sequenciadas cerca de 20% das amostras que apresentaram padrão usual nas análises de PCR-SSCP e todas as amostras com perfil eletroforético diferente do usual. Foram coletados os dados antropométricos e laboratoriais, analisados e comparados com base nos resultados encontrados ao longo de todo o processo. A Figura 8 mostra o fluxograma deste projeto, como forma de facilitar a compreensão e organização dos processos empregados.

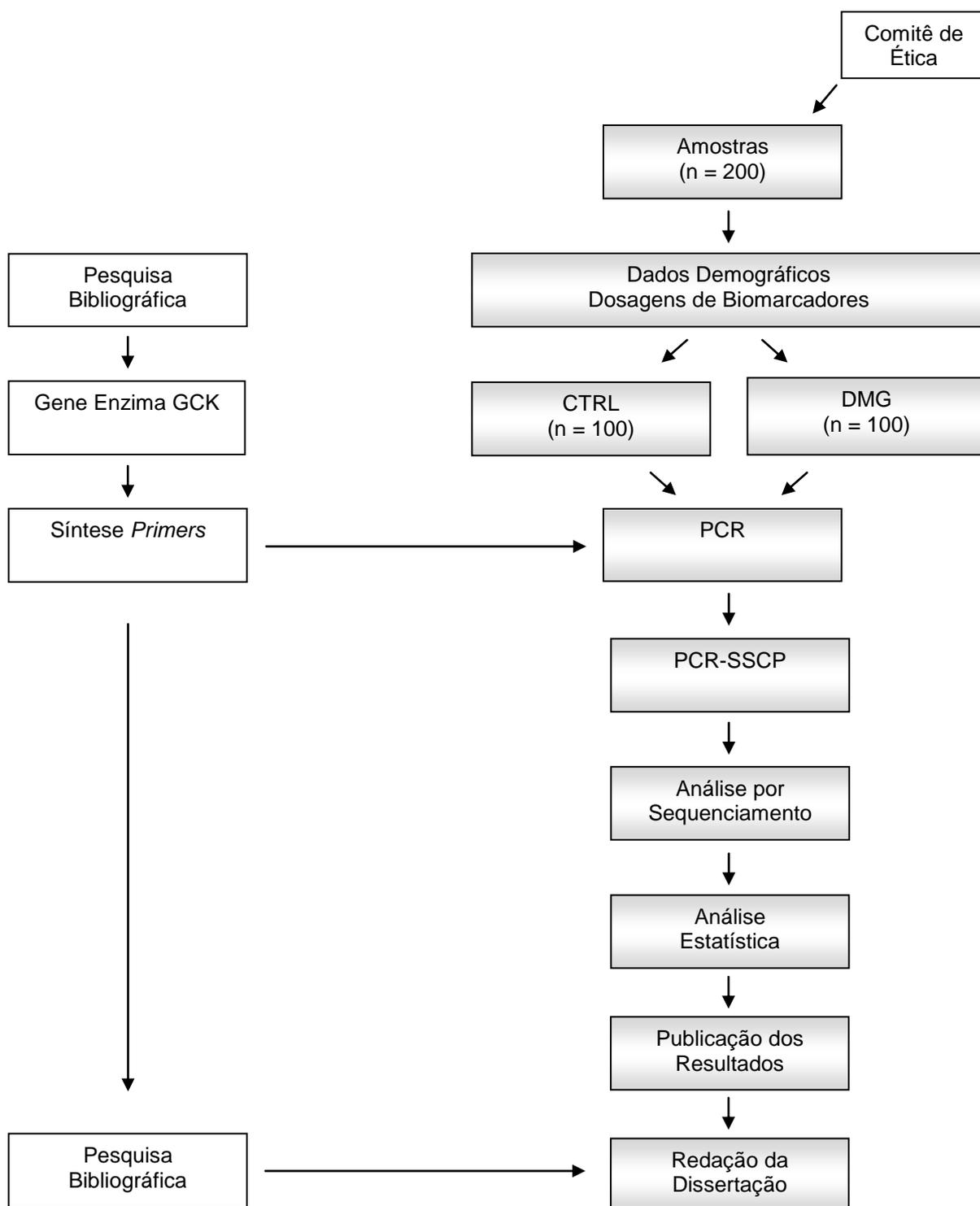


FIGURA 8. FLUXOGRAMA DAS PRINCIPAIS ETAPAS DO PROJETO DE PESQUISA.

Estão mostrados, por ordem sequencial, as principais etapas e organização do projeto.

4.1.1 Parâmetros Analisados nas amostras

4.1.1.1 Parâmetros Bioquímicos

Foram analisadas as determinações séricas de glicemia em jejum, colesterol total, HDL-colesterol, LDL-colesterol, triglicérides, ureia, creatinina, ácido úrico, proteína total e albumina. Os parâmetros bioquímicos foram quantificados em sistema automatizado *Architect Ci 8200 (Abbott Diagnostics)* utilizando reagentes, calibradores e controles fornecidos pelo fabricante.

A hemoglobina glicada (HbA1C) foi quantificada nas diabéticas gestantes utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) com coluna catiônica (*Varian II, Biorad*), seguindo as recomendações do fabricante.

4.1.1.2 Parâmetros Laboratoriais

Foram coletados dados demográficos dos componentes da amostra como: idade, peso, altura, semana de gestação no momento da coleta, etnia (euro-, afro-, índio-, oriental-brasileira), pressão arterial, dados clínicos das pacientes diabéticas gestantes.

O índice de massa corpórea (IMC) foi obtido pela razão entre o peso (kg) e o quadrado da altura (m).

Foram considerados tabagistas usuários de tabaco acrescido de ex-fumantes e considerados não fumantes aqueles que nunca tiveram contato com o tabaco.

A história familiar de diabetes foi caracterizada pela presença de parentes de primeiro grau (pelo menos um dos pais ou um irmão) apresentando qualquer tipo de *Diabetes mellitus*.

A história familiar positiva para a DAC (Doença Arterial Coronariana) foi definida como a presença do evento coronariano no pai antes dos 55 anos de idade e na mãe antes dos 65 anos de idade (IV Diretrizes Brasileiras em Dislipidemia, 2007).

4.2 OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES (*PRIMERS*)

A sequência depositada no banco de dados GenBank NG_008847.1 foi utilizada como referência para o desenho de oligonucleotídeos iniciadores (*primers*). Esta sequência reporta a isoforma pancreática.

Os oligonucleotídeos iniciadores foram desenhados, *in silico*, utilizando o programa *Primer3Plus* (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>). Estes foram alinhados com o genoma humano pelo programa *BlastN* disponível em (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&BLAST_SPEC=SNP&BLAST_PROGRAMS=megaBlast&PAGE_TYPE=BlastSearch).

Os oligonucleotídeos iniciadores que amplificaram os exons 2, 5e6, 8 e 9 do gene da Glucoquinase foram descritos por Tinto e colaboradores (2008). Com exceção deles, os oligonucleotídeos iniciadores que restaram foram desenhados e analisados com as ferramentas acima descritas.

Os resultados da análise destes oligonucleotídeos, bem como suas características, encontram-se na Tabela 3.

TABELA 3. OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES E SUAS CARACTERÍSTICAS.

EXONS/Amplicons/Primers	BASES (pb, 5' → 3')	Tm (°C)	G/C (%)
EXON 01	515		
Amplicon GCKE1A1	337		
GCKE1F1 (20 pb)	5'-ggtcaccatgacaaccacag-3'	59,8	55,0
GCKE1R1 (20 pb)	5'-ttctggacccttctcactg-3'	60,2	55,0
Amplicon GCKE1A2	337		
GCKE1F2 (18 pb)	5'-cctgcctggagaacatcc-3'	59,1	61,1
GCKE1R2 (19 pb)	5'-gcaaacactcccagaatgc-3'	59,2	52,6
Amplicon GCKE1A3	233		
GCKE1F3 (22 pb)	5'-gccttgatattccactcag-3'	60,0	45,5
GCKE1R3 (20 pb)	5'-ccttcaagagcctgtgc-3'	60,1	55,0
EXON 02	163		
Amplicon GCKE2	290		
GCKE2F1 (20 pb)	5'-tgcagatgctgtgacagc-3'	66,0	60,0
GCKE2R1 (20 pb)	5'-cacagctctctggatgag-3'	59,7	55,0
EXON 03	155		
Amplicon GCKE3	242		
GCKE3F1 (22 pb)	5'-tgaggctgacacacttctct-3'	59,3	50,0
GCKE3R1 (18 pb)	5'-ggccctgagatcctgcat-3'	61,2	61,1
EXON 04	120		
Amplicon GCKE4	251		
GCKE4F1 (20 pb)	5'-gtccctgaggaaatagcttg-3'	65,9	60,0
GCKE4R1 (20 pb)	5'-cccctcatctgccttctg-3'	60,5	55,0
EXON 05 e 06	96 e 100		
Amplicon GCKE5e6	505		
GCKE5e6F1 (20 pb)	5'-tctgagcctgttctcagc-3'	60,7	55,0
GCKE5e6R1 (20 pb)	5'-ggccctgaagcctgtgta-3'	62,4	55,0
EXON 07	184		
Amplicon GCKE7	286		
GCKE7F1 (20 pb)	5'-agtgcagctctgctgacag-3'	62,1	60,0
GCKE7R1 (20 pb)	5'-catctgccgtgcaccagag-3'	67,8	65,0
EXON 08	156		
Amplicon GCKE8	400		
GCKE8F1 (20 pb)	5'-tggctattaacgagggaaa-3'	60,6	45,0
GCKE8R1 (20 pb)	5'-ctgagaccaagtctgcagtg-3'	57,1	55,0
EXON 09	234		
Amplicon GCKE9	411		
GCKE9F1 (19 pb)	5'-cctccctggagaacgagag-3'	63,5	65,0
GCKE9R1 (20 pb)	5'-aatctggagcttgggaacc-3'	60,4	50,0
EXON 10	1010		
Amplicon GCKE10A1	347		
GCKE10F1 (20 pb)	5'-cagccctgcttctctctg-3'	62,7	60,0
GCKE10R1 (21 pb)	5'-ccgaaaaactgaggaagagg-3'	62,3	52,4
Amplicon GCKE10A2	278		
GCKE10F2 (18 pb)	5'-cataccgctgggaacag-3'	60,1	61,1
GCKE10R2 (19 pb)	5'-cccacacaggatgagtcc-3'	58,9	57,9
Amplicon GCKE10A3	289		
GCKE10F3 (20 pb)	5'-atcctgtgtggcctcactt-3'	62,2	55,0
GCKE10R3 (21 pb)	5'-ctctgtcttgcacctgtg-3'	61,3	57,1
Amplicon GCKE10A4	299		
GCKE10F4 (21 pb)	5'-gcttgtattctggatggac-3'	61,8	52,4
GCKE10R4 (21 pb)	5'-cccacagtctaatgcacaga-3'	61,1	52,4

Temperatura de hibridação/melting em °C (Tm), Porcentagem de Guanina/Citosina (G/C).

4.3 PCR (*Polimerase Chain Reaction*)

A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) foi utilizada para amplificar os 10 exons do gene da enzima GCK (TINTO *et al.*, 2008). A técnica foi realizada em volume de 20 μ L e otimizada para temperatura de hibridação/anelamento (T_m), concentrações de Mg²⁺ e tempos de ciclagem de acordo com cada experimento. O equipamento *Eppendorf Mastercycler Gradient (Eppendorf)* foi utilizado para a realização dos ensaios de PCR (Tabela 4).

A eletroforese dos produtos de PCR em gel de agarose 1,5% foi corada com brometo de etídeo (fotodocumentação UV) e utilizada para confirmar a amplificação dos produtos de PCR e avaliar a qualidade dos amplicons.

TABELA 4. CONDIÇÕES PARA A REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE.

REAGENTES	CONCENTRAÇÃO FINAL	VOLUME
Água reagente estéril	-----	12,2 μ L
Tampão Taq 10X	1X	2,0 μ L
Oligonucleotídeos iniciadores Forward (10 pmol/ μ L)	10 pMol	1,0 μ L
Oligonucleotídeos iniciadores Reverse (10 pmol/ μ L)	10 pMol	1,0 μ L
MgCl ₂ 25 mM	1,5 mM	1,2 μ L
dNTP 5 mM	0,2 mM	0,8 μ L
Taq DNA polimerase (5 U/ μ L)	4U	0,8 μ L
DNA molde (100 ng/ μ L)	100ng/20 μ L	1,0 μ L
TERMOCICLADOR - ETAPAS DA PCR	TEMPERATURA (T °C)	TEMPO (t) (segundos)
1 - Desnaturação inicial	95	120
2 - Desnaturação	94	30
3 - Hibridação (anelamento) dos primers	X	40
4 - Extensão	72	40
5 - Repetir 34 vezes as etapas 2, 3 e 4	-----	-----
6 - Extensão final	72	600
7 - Hold (resfriamento)	4	∞
EXONS (AMPLICONS)	TEMPERATURA DE ANELAMENTO (T °C)	
GCKE1A1, GCKE2, GCKE3, GCKE5e6, GCKE7, GCKE10A1, GCKE10A3, GCKE10A4	65	
GCKE9	63	
GCKE1A3, GCKE4 e GCKE10A2	62	
GCKE1A2	61	
GCKE8	58	

X (Temperatura de Anelamento em °C que se encontra descrita abaixo para os diferentes amplicons).
Tampão Taq 10X concentrado: 750mM Tris-HCl (pH 8,8 a 25°C); 200mM (NH₄)₂SO₄; 0,1% Tween 20.

4.4 PCR-SSCP (*Single Strand Conformation Polymorphism*)

A metodologia de Polimorfismo Conformacional de Fita Simples (PCR-SSCP), primeiramente descrita por Orita e colaboradores (1989), foi utilizada nos ensaios de triagem das variantes genéticas do gene em estudo sendo as condições da técnica otimizadas em laboratório.

A desnaturação foi realizada em volume final de 15µL contendo 10µL de Reagente de Formamida (95% formamida, 2mM EDTA, 0,05% azul de bromofenol e 0,05% de xileno cianol) e 5µL de produtos de PCR, aquecidos a 98°C por 10 min, seguido de resfriamento rápido em gelo. Os ensaios de PCR-SSCP foram realizados no equipamento *Eppendorf Mastercycler Gradient (Eppendorf)*.

Os produtos de fitas simples obtidos pela desnaturação foram separados por eletroforese em gel de poliacrilamida com pH ácido preparado conforme descrito na Tabela 5 (SOUZA *et al.*, 2005). Esta etapa foi otimizada, para cada fragmento de DNA analisado, utilizando diferentes concentrações de acrilamida, presença de aditivos como glicerol, diferentes tipos e concentrações de tampões.

Os géis foram corados com brometo de etídeo e fotodocumentados com transiluminador UV e fotografia digital com filtro amarelo.

TABELA 5. PREPARO DOS GÉIS PARA PCR-SSCP.

REAGENTES	Gel a 09 % (~5 mL)	Gel a 10 % (~5 mL)	Gel a 12 % (~5 mL)	Gel a 13 % (~5 mL)
Solução Ácida de TRIS	3,88 mL	3,75 mL	3,50 mL	3,38 mL
Acrilamida 29:1 (40 %)	1,12 mL	1,25 mL	1,50 mL	1,62 mL
TEMED	5,00 µL	5,00 µL	5,00 µL	5,00 µL
APS 10 %	40,00 µL	40,00 µL	40,00 µL	40,00 µL

Volume para 01 gel de aproximadamente 5mL.

Solução ácida de TRIS (Hidroxymethylaminomethane) pH 3,66.

TEMED (N, N, N', N'-tetramethylethylenediamine USB Corporation).

APS (Ammonium persulfate USB Corporation - Persulfato de Amônio).

As condições de ensaio de PCR-SSCP utilizadas, no presente estudo, foram otimizadas para cada amplicon de interesse e estão descritas na Tabela 6.

TABELA 6. CONDIÇÕES PARA OS ENSAIOS DE PCR-SSCP.

EXON (Amplicons)	AMPLICON (Tamanho, pb)	GEL DE POLIACRILAMIDA CONCENTRAÇÃO (%)	CORRIDA (horas)	VOLTAGEM (V)	AMPERAGEM (mA)
Exon1A1	337	12	3:00	300	7
Exon1A2	337	12	3:00	300	7
Exon1A3	233	12	3:00	300	7
Exon2	290	10	3:15	190	5
Exon3	242	10	3:00	190	5
Exon4	251	10	3:15	190	5
Exon5e6	505	10	5:00	190	5
Exon7	286	10	4:00	190	5
Exon8	400	10	5:00	210	6
Exon9	411	9	4:40	300	7
Exon10A1	347	10	2:00	300	7
Exon10A2	278	13	2:45	300	7
Exon10A3	289	13	3:30	300	7
Exon10A4	299	9	2:30	300	7

Géis (5mL) para a cuba *TetraCell* (BioRad, 100x75x0,75mm).

As voltagens e amperagens registradas nesta tabela estão calculados para 1 gel.

Para todos os géis foram feitas pré-corridas de 30 minutos em sistema *TetraCell* com placas.

4.5 SEQUENCIAMENTO DE DNA

4.5.1 Purificação de produtos de PCR

Após a reação de PCR, prévia à reação sequenciamento, os produtos de PCR foram purificados pelo sistema de micro coluna (*GFX PCR DNA and Gel band Purification kit, GE Healthcare, cat. 28-9034-71*).

4.5.2 Reação de sequenciamento

O reagente *ET terminator* (didesoxirribonucleotídeos acoplados a cromóforos fluorescentes – *GE Healthcare*) foi utilizado na reação de sequenciamento das variantes encontradas por PCR-SSCP e em 20% das amostras que não apresentaram um perfil que diferia do usual. As reações de sequenciamento foram realizados no equipamento *Eppendorf Mastercycler Gradient* (*Eppendorf*). Os oligonucleotídeos iniciadores em um único sentido (*Forward*, Direto, no sentido 5'→3') foram utilizados na reação de sequenciamento de todos os amplicons, com exceção dos amplicons do Exon2 para o qual foi utilizado o oligonucleotídeo (*Reverse*, Reverso, no sentido 5'→3').

4.5.3 Purificação do produto de sequenciamento

Para a purificação do produto de sequenciamento foi utilizado etanol absoluto, acetato de amônio 7,5mM e etanol a 70% com subsequente secagem em estufa a 37^oC. Após a secagem, os produtos de sequenciamento foram levados para o departamento de Bioquímica e Biologia Molecular do Politécnico, UFPR, para a aplicação em sistema automatizado ABI377 (*Applied Biosystems*).

4.5.4 Análise das sequências

Foi utilizado o sistema automático de sequenciamento ABI377 (*Applied Biosystems*) para a identificação das variações genéticas (*SNPs – Single Nucleotide Polymorphism – Polimorfismo de único nucleotídeo, deleções e inserções*).

As sequências obtidas foram comparadas com a sequência consenso presente no banco de dados GenBank NG_008847.1. Para a análise dos eletroferogramas das sequências foram utilizados os programas *BioEdit v7.0.8.0* e *CodonCode Aligner v3.7.1*.

4.5.5 Pesquisa e Identificação dos SNPs

Os sítios de pesquisa e identificação dos SNPs encontrados foram:

PubMed

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>)

ScienceDirect

(<http://www.sciencedirect.com/>)

SNP Bank (BlastSNP)

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>).

Alinhamento de sequências para encontrar os SNPs – BLASTn

(http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&BLAST_SPEC=SNP&BLAST_PROGRAMS=megaBlast&PAGE_TYPE=BlastSearch)

4.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As frequências e outras características estatísticas das variantes genéticas foram analisadas no sítio (<http://ihg2.helmholtz-muenchen.de/cgi-bin/hw/hwa1.pl>).

Para variáveis descontínuas, o teste Exato de *Fischer* bidirecional foi utilizado nas comparações.

As variáveis contínuas foram analisadas para verificação da normalidade pelos testes de *Kolmogorov-Smirnov* e *Lilliefors*. As variáveis: idade, ureia, colesterol, LDL-colesterol e proteínas totais mostraram distribuição “normal”. As demais variáveis (glucose, HbA1C, creatinina, ácido úrico, triglicérides, HDL-colesterol, albumina) não apresentaram distribuição normal ($P < 0,01$).

Variáveis com distribuição normal foram analisadas com os testes “t” de *Student* para variáveis independentes ou ANOVA (*one-way*). Variáveis sem distribuição normal foram analisadas pelo teste U de *Mann-Whitney* ou quando possível normalizadas por transformação logarítmica.

As análises foram realizadas com o pacote estatístico *Statistica v.8.0* (*StatSoft, Tulsa, CA*).

Uma probabilidade (P) inferior a 0,05 ($P < 0,05$) foi considerada significativa em todas as análises.

5 RESULTADOS

5.1 AMOSTRA

A Tabela 7 mostra as características demográficas e laboratoriais da amostra.

TABELA 7. DADOS ANTROPOMÉTRICOS E LABORATORIAIS DOS GRUPOS EM ESTUDO.

PARÂMETROS	GRUPOS		P
	CONTROLE n = 100	DMG n = 100	
Idade (anos)	24,9±6,2 24,0[13-42]	31,7±6,3 31,0[18-46]	<0,001*
Etnia (Euro-/Afro-Brasileiros)	100/0	90/10	<0,002***
IMC (kg/m ²)	25,2±4,2 24,5[17,7-40,6]	33,5±6,3 32,7[21,9-49,3]	<0,001*
Semana de Gestação	19,6±7,9 18,0[8,0-39,0]	30,2±5,3 31,0[13,0-38,0]	<0,001*
Tabagismo (%)	2	44	<0,001***
Historia Familiar de Diabetes (%)	-	69	-
História para DAC (%)	-	38	-
Uso de insulina (%)	-	30	-
Glicemia (mg/dL)	83,2±6,8 83[60-99]	94,3±19,4 89[69-189]	<0,001**
HbA1C (%)	-	5,6±0,8 5,0[4,0-10,0]	-
Colesterol total (mg/dL)	193,9±47,1 189,5[107-404]	224,8±48,4 221[125-335]	<0,001*
HDL-colesterol (mg/dL)	40,3±8,5 39[25-66]	54,3±13,5 52,5[27-106]	<0,001**
LDL-colesterol (mg/dL)	130,6±39,7 125[59-295]	126,3±43,5 123[34-234]	<0,437*
Triglicérides (mg/dL)	114,8±45,4 105[48-329]	220,5±74,6 213[88-254]	<0,001**
Uréia (mg/dL)	20,5±5,2 20[9-34]	15,8±4,1 15,5[6-32]	<0,001*
Creatinina (mg/dL)	0,84±0,09 0,8[0,6-1,1]	0,76±0,09 0,8[0,6-1,0]	<0,001**
Ácido Úrico (mg/dL)	3,4±0,8 3,4[2,3-8,7]	4,5±0,9 4,6[1,8-7,8]	<0,001**
Proteína total (g/dL)	7,1±0,8 7,2[3,3-8,9]	6,2±0,4 6,2[5,2-7,2]	<0,001*
Albumina (g/dL)	4,4±0,5 4,5[2,2-5,3]	3,7±0,2 3,7[3,2-4,2]	<0,001**

Os valores são apresentados como: médias±desvio padrão ou mediana [amplitude de variação].

* Probabilidade, teste "T" para variáveis independentes.

** Probabilidade, teste não paramétrico U de *Mann-Whitney*.

*** Probabilidade, teste exato de *Fisher* bidirecional.

5.2 EXON1 DO GENE DA GLUCOQUINASE (GCKE1)

Para a amplificação do Exon1 foram utilizados 3 pares de oligonucleotídeos iniciadores para gerar amplicons de tamanhos compatíveis com a sensibilidade da PCR-SSCP. Dessa forma, foram gerados 3 amplicons deste exon denominados Exon1Amplicon1 (GCKE1A1), Exon1Amplicon2 (GCKE1A2) e Exon1Amplicon3 (GCKE1A3) do Gene da Glucoquinase.

5.2.1 Exon1Amplicon1 do Gene da Glucoquinase (GCKE1A1)

As Figuras 9, 10 e 11 mostram, respectivamente, os perfis eletroforéticos de PCR, PCR-SSCP e Sequenciamento do Exon1Amplicon1 do gene da Glucoquinase.

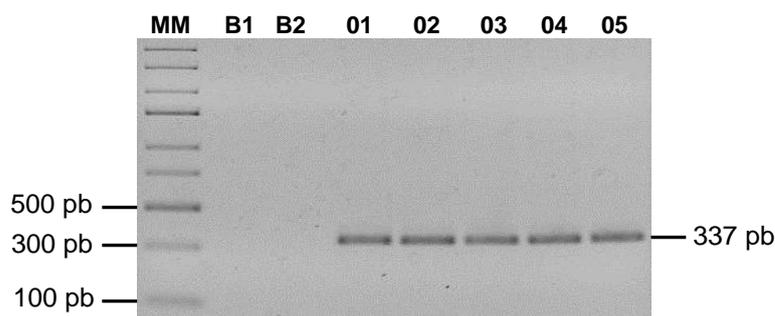


FIGURA 9. PERFIL ELETROFORÉTICO TÍPICO DE PRODUTOS DE PCR DO GCKE1A1 DO GENE DA GCK.

Eletroforese em gel de agarose 1,5% em tampão TBE 1X. O produto de PCR (2 μ L) acrescido de 3 μ L de solução de aplicação (glicerol 30%, xileno cianol 0,025% e azul de bromofenol 0,025%) foi aplicado no gel. A corrida eletroforética foi realizada 50 minutos 60V (~25 mA). O gel foi corado com brometo de etídeo.

As linhas B1 e B2 representam os controles da reação, na ausência de DNA. As linhas 01 a 05 são amostras de DNA amplificadas. À esquerda do gel a indicação da massa molecular do marcador de 300 pares de base (GeneRuller Express DNA Ladder, Fermentas) da linha MM. À direita do gel a indicação do tamanho do produto de PCR.

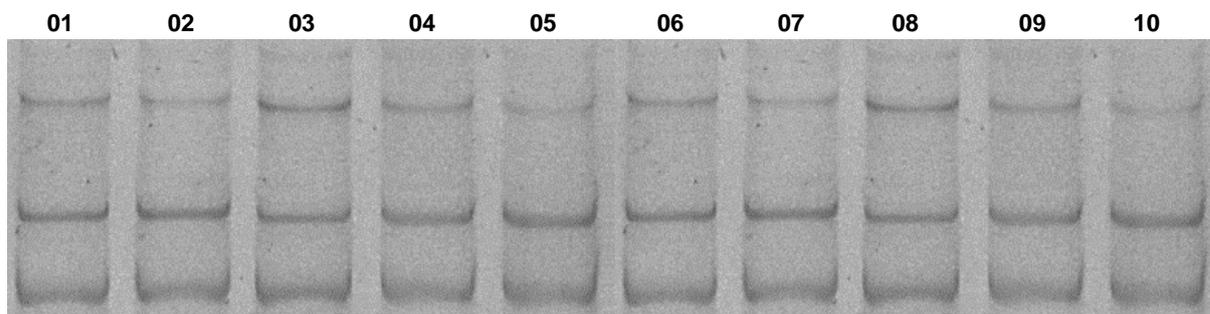


FIGURA 10. PERFIL ELETROFORÉTICO TÍPICO DA REAÇÃO DE PCR-SSCP DO GCKE1A1 DO GENE DA GCK.

Gel de poliacrilamida (29:1) a 12% em meio ácido, pH 3,66. A 5 μ L do produto de PCR foram acrescidos 10 μ L da solução de formamida seguido de incubação a 98 °C por 10 minutos, sendo o volume total aplicado no gel. As condições de corrida eletroforética estão descritas na Tabela 6. O gel foi corado com brometo de etídeo.

As linhas 1 a 10 mostram o padrão eletroforético observado sem presença de variação genética.

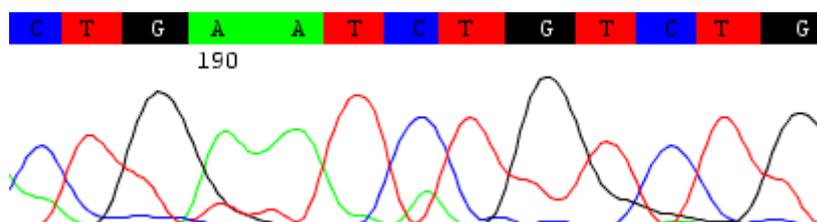


FIGURA 11. PERFIL ELETROFORÉTICO DE PARTE DA REAÇÃO DE SEQUENCIAMENTO DO GCKE1A1 DO GENE DA GCK.

Eletroferograma da reação de sequenciamento evidenciando parte da sequência do GCKE1A1 do gene da Glucoquinase sem a presença de variação genética.

5.2.2 Exon1Amplicon2 do Gene da Glucoquinase (GCKE1A2)

As Figuras 12, 13 e 14 mostram, respectivamente, os perfis eletroforéticos de PCR, PCR-SSCP e Sequenciamento do Exon1Amplicon2 do gene da Glucoquinase.

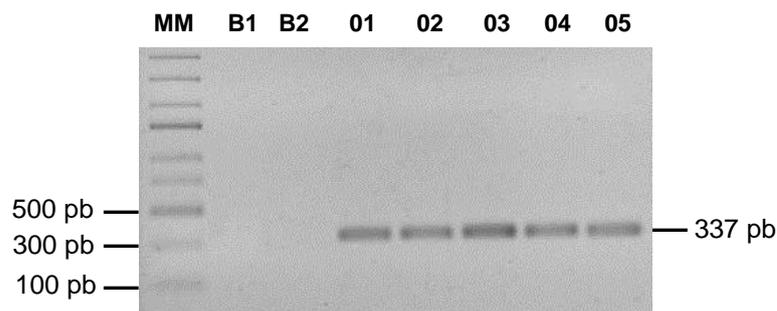


FIGURA 12. PERFIL ELETROFORÉTICO TÍPICO DE PRODUTOS DE PCR DO GCKE1A2 DO GENE DA GCK.

Eletroforese em gel de agarose 1,5% em tampão TBE 1X. O produto de PCR (2 μ L) acrescido de 3 μ L de solução de aplicação (glicerol 30%, xileno cianol 0,025% e azul de bromofenol 0,025%) foi aplicado no gel. A corrida eletroforética foi realizada 50 minutos 60V (~25mA). O gel foi corado com brometo de etídeo.

As linhas B1 e B2 representam os controles da reação, na ausência de DNA. As linhas 01 a 05 são amostras de DNA amplificadas. À esquerda do gel a indicação da massa molecular do marcador de 300 pares de base (GeneRuller Express DNA Ladder, Fermentas) da linha MM. À direita do gel a indicação do tamanho do produto de PCR.

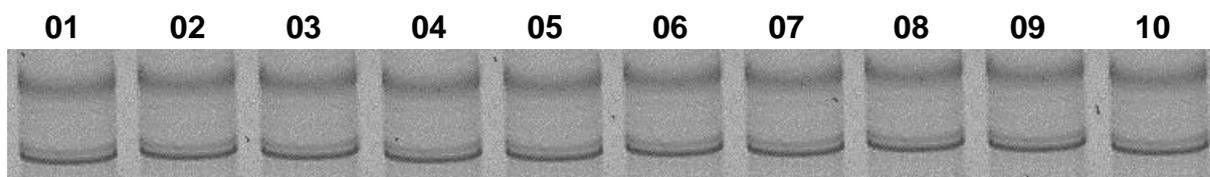


FIGURA 13. PERFIL ELETROFORÉTICO TÍPICO DA REAÇÃO DE PCR-SSCP DO GCKE1A2 DO GENE DA GCK.

Gel de poliacrilamida (29:1) a 12% em meio ácido, pH 3,66. A 5 μ L do produto de PCR foram acrescidos 10 μ L da solução de formamida seguido de incubação a 98 $^{\circ}$ C por 10 minutos, sendo o volume total aplicado no gel. As condições de corrida eletroforética estão descritas na Tabela 6. O gel foi corado com brometo de etídeo.

As linhas 1 a 10 mostram o padrão eletroforético observado sem presença de variação genética.

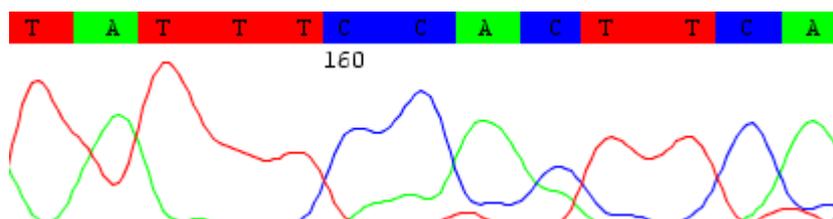


FIGURA 14. PERFIL ELETROFORÉTICO DE PARTE DA REAÇÃO DE SEQUENCIAMENTO DO GCKE1A2 DO GENE DA GCK.

Eletroferograma da reação de sequenciamento evidenciando parte da seqüência do GCKE1A2 do gene da Glucoquinase sem a presença de variação genética.

5.2.3 Exon1Amplicon3 do Gene da Glucoquinase (GCKE1A3)

As Figuras 15, 16 e 17 mostram, respectivamente, os perfis eletroforéticos de PCR, PCR-SSCP e Sequenciamento do Exon1Amplicon3 do gene da Glucoquinase.

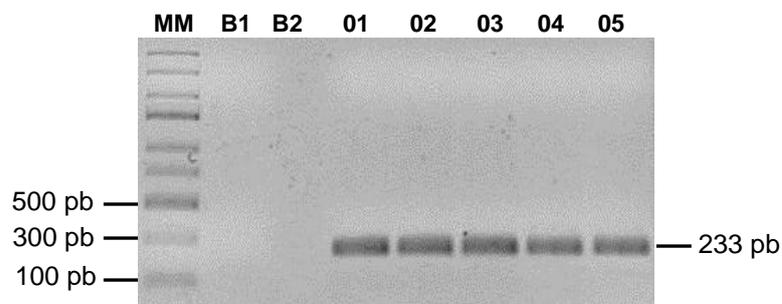


FIGURA 15. PERFIL ELETROFORÉTICO TÍPICO DE PRODUTOS DE PCR DO GCKE1A3 DO GENE DA GCK.

Eletroforese em gel de agarose 1,5% em tampão TBE 1X. O produto de PCR (2 μ L) acrescido de 3 μ L de solução de aplicação (glicerol 30%, xileno cianol 0,025% e azul de bromofenol 0,025%) foi aplicado no gel. A corrida eletroforética foi realizada 50 minutos 60V (~25mA). O gel foi corado com brometo de etídeo.

As linhas B1 e B2 representam os controles da reação, na ausência de DNA. As linhas 01 a 05 são amostras de DNA amplificadas. À esquerda do gel a indicação da massa molecular do marcador de 300 pares de base (GeneRuller Express DNA Ladder, Fermentas) da linha MM. À direita do gel a indicação do tamanho do produto de PCR.

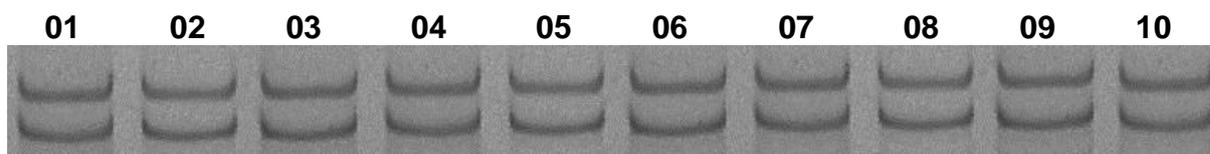


FIGURA 16. PERFIL ELETROFORÉTICO TÍPICO DA REAÇÃO DE PCR-SSCP DO GCKE1A3 DO GENE DA GCK.

Gel de poliacrilamida (29:1) a 12% em meio ácido, pH 3,66. A 5 μ L do produto de PCR foram acrescidos 10 μ L da solução de formamida seguido de incubação a 98 $^{\circ}$ C por 10 minutos, sendo o volume total aplicado no gel. As condições de corrida eletroforética estão descritas na Tabela 6. O gel foi corado com brometo de etídeo.

As linhas 1 a 10 mostram o padrão eletroforético observado sem presença de variação genética.

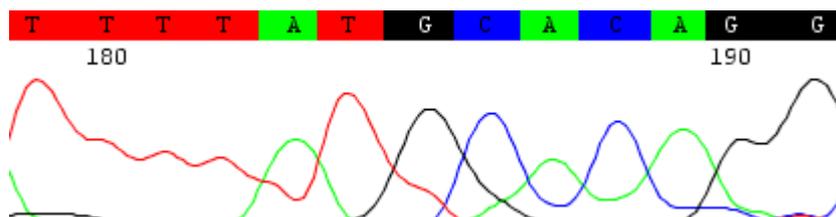


FIGURA 17. PERFIL ELETROFORÉTICO DE PARTE DA REAÇÃO DE SEQUENCIAMENTO DO GCKE1A3 DO GENE DA GCK.
Eletroferograma da reação de sequenciamento evidenciando parte da seqüência do GCKE1A3 do gene da Glucoquinase sem a presença de variação genética.

5.3 EXON2 DO GENE DA GLUCOQUINASE (GCKE2)

As Figuras 18, 19 e 20 mostram, respectivamente, os perfis eletroforéticos de PCR, PCR-SSCP e Sequenciamento do Exon2 do gene da Glucoquinase.

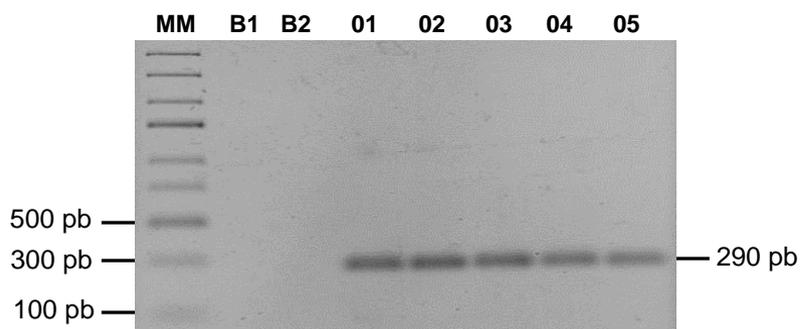


FIGURA 18. PERFIL ELETROFORÉTICO TÍPICO DE PRODUTOS DE PCR DO GCKE2 DO GENE DA GCK.

Eletroforese em gel de agarose 1,5% em tampão TBE 1X. O produto de PCR (2 μ L) acrescido de 3 μ L de solução de aplicação (glicerol 30%, xileno cianol 0,025% e azul de bromofenol 0,025%) foi aplicado no gel. A corrida eletroforética foi realizada 50 minutos 60V (~25mA). O gel foi corado com brometo de etídeo.

As linhas B1 e B2 representam os controles da reação, na ausência de DNA. As linhas 01 a 05 são amostras de DNA amplificadas. À esquerda do gel a indicação da massa molecular do marcador de 300 pares de base (GeneRuller Express DNA Ladder, Fermentas) da linha MM. À direita do gel a indicação do tamanho do produto de PCR.

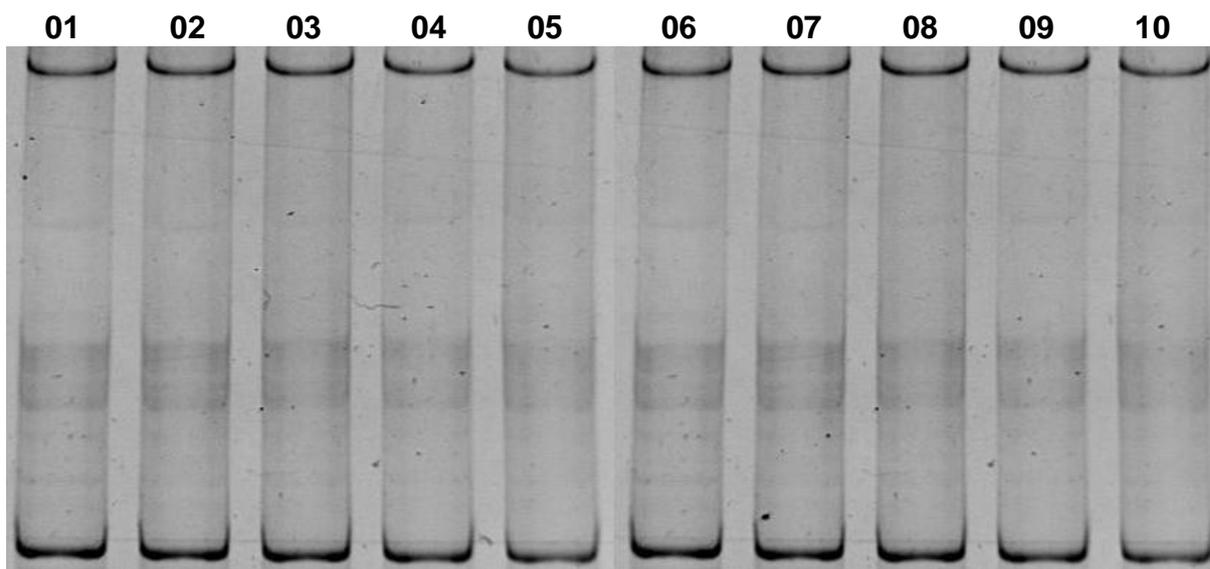


FIGURA 19. PERFIL ELETROFORÉTICO TÍPICO DA REAÇÃO DE PCR-SSCP DO GCKE2 DO GENE DA GCK.

Gel de poliacrilamida (29:1) a 10% em meio ácido, pH 3,66. A 5µL do produto de PCR foram acrescidos 10µL da solução de formamida seguido de incubação a 98°C por 10 minutos, sendo o volume total aplicado no gel. As condições de corrida eletroforética estão descritas na Tabela 6. O gel foi corado com brometo de etídeo.

As linhas 1 a 10 mostram o padrão eletroforético observado sem presença de variação genética.

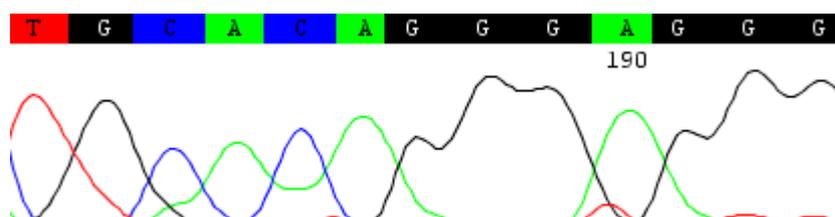


FIGURA 20. PERFIL ELETROFORÉTICO DE PARTE DA REAÇÃO DE SEQUENCIAMENTO DO GCKE2 DO GENE DA GCK.

Eletroferograma da reação de sequenciamento evidenciando parte da sequência do GCKE2 do gene da Glucoquinase sem a presença de variação genética.

5.4 EXON3 DO GENE DA GLUCOQUINASE (GCKE3)

As Figuras 21, 22 e 23 mostram, respectivamente, os perfis eletroforéticos de PCR, PCR-SSCP e Sequenciamento do Exon3 do gene da Glucoquinase.

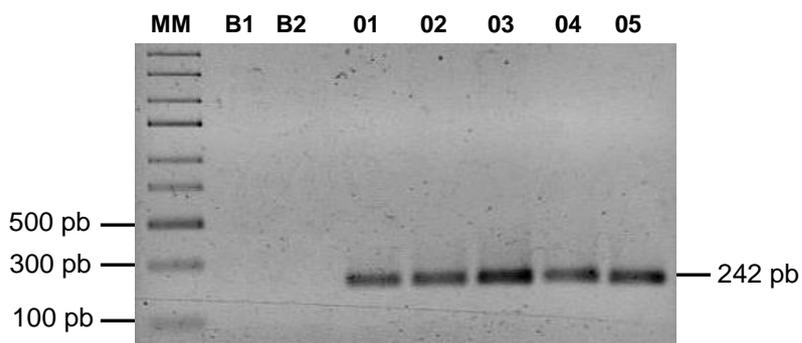


FIGURA 21. PERFIL ELETROFORÉTICO TÍPICO DE PRODUTOS DE PCR DO GCKE3 DO GENE DA GCK.

Eletroforese em gel de agarose 1,5% em tampão TBE 1X. O produto de PCR (2 μ L) acrescido de 3 μ L de solução de aplicação (glicerol 30%, xileno cianol 0,025% e azul de bromofenol 0,025%) foi aplicado no gel. A corrida eletroforética foi realizada 50 minutos 60V (~25mA). O gel foi corado com brometo de etídeo.

As linhas B1 e B2 representam os controles da reação, na ausência de DNA. As linhas 01 a 05 são amostras de DNA amplificadas. À esquerda do gel a indicação da massa molecular do marcador de 300 pares de base (GeneRuller Express DNA Ladder, Fermentas) da linha MM. À direita do gel a indicação do tamanho do produto de PCR.

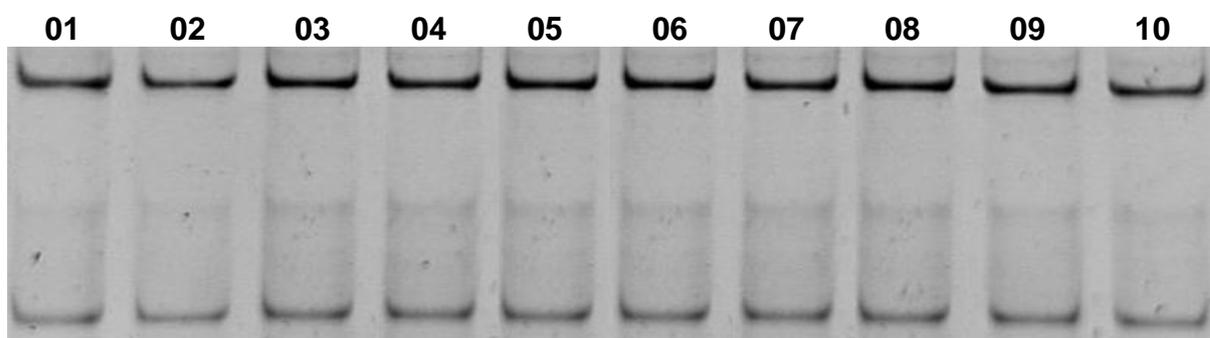


FIGURA 22. PERFIL ELETROFORÉTICO TÍPICO DA REAÇÃO DE PCR-SSCP DO GCKE3 DO GENE DA GCK.

Gel de poliacrilamida (29:1) a 10% em meio ácido, pH 3,66. A 5 μ L do produto de PCR foram acrescidos 10 μ L da solução de formamida seguido de incubação a 98°C por 10 minutos, sendo o volume total aplicado no gel. As condições de corrida eletroforética estão descritas na Tabela 6. O gel foi corado com brometo de etídeo.

As linhas 1 a 10 mostram o padrão eletroforético observado sem presença de variação genética.

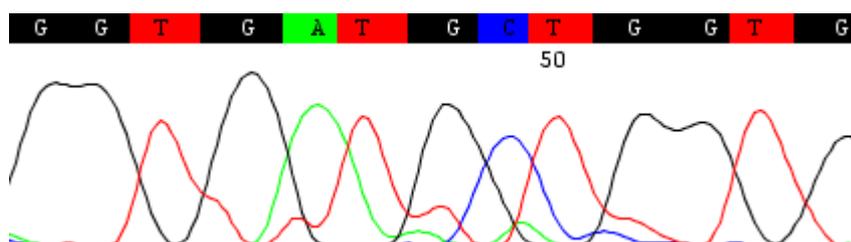


FIGURA 23. PERFIL ELETROFORÉTICO DE PARTE DA REAÇÃO DE SEQUENCIAMENTO DO GCKE3 DO GENE DA GCK.

Eletroferograma da reação de sequenciamento evidenciando parte da sequência do GCKE2 do gene da Glucoquinase sem a presença de variação genética.

5.5 EXON4 DO GENE DA GLUCOQUINASE (GCKE4)

As Figuras 24, 25 e 26 mostram, respectivamente, os perfis eletroforéticos de PCR, PCR-SSCP e Sequenciamento do Exon4 do gene da Glucoquinase.

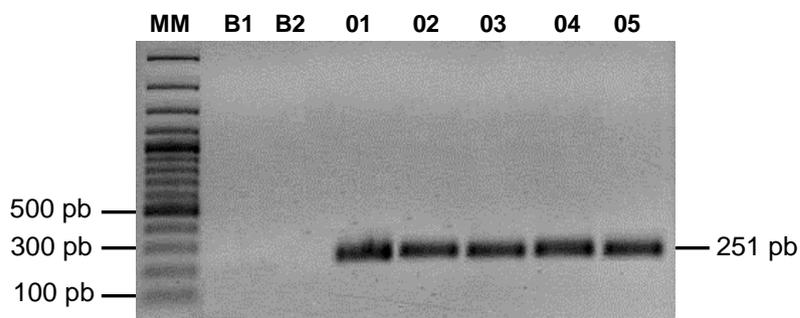


FIGURA 24. PERFIL ELETROFORÉTICO TÍPICO DE PRODUTOS DE PCR DO GCKE4 DO GENE DA GCK.

Eletroforese em gel de agarose 1,5% em tampão TBE 1X. O produto de PCR (2 μ L) acrescido de 3 μ L de solução de aplicação (glicerol 30%, xileno cianol 0,025% e azul de bromofenol 0,025%) foi aplicado no gel. A corrida eletroforética foi realizada 50 minutos 60V (~25mA). O gel foi corado com brometo de etídeo.

As linhas B1 e B2 representam os controles da reação, na ausência de DNA. As linhas 01 a 05 são amostras de DNA amplificadas. À esquerda do gel a indicação da massa molecular do marcador de 100 pares de base (GeneRuller Express DNA Ladder, Fermentas) da linha MM. À direita do gel a indicação do tamanho do produto de PCR.

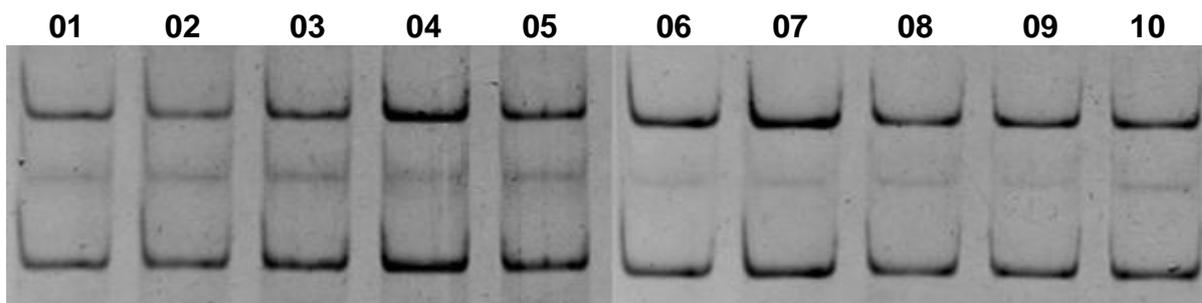


FIGURA 25. PERFIL ELETROFORÉTICO TÍPICO DA REAÇÃO DE PCR-SSCP DO GCKE4 DO GENE DA GCK.

Gel de poliacrilamida (29:1) a 10% em meio ácido, pH 3,66. A 5 μ L do produto de PCR foram acrescidos 10 μ L da solução de formamida seguido de incubação a 98 °C por 10 minutos, sendo o volume total aplicado no gel. As condições de corrida eletroforética estão descritas na Tabela 6. O gel foi corado com brometo de etídeo.

As linhas 1 a 10 mostram o padrão eletroforético observado sem a presença de variação genética.

5.5.1 Variação Genética do GCKE4 do gene da Glucoquinase.

Uma variação genética do tipo heterozigota foi encontrada em apenas uma amostra do amplicon do Exon4 na análise de sequenciamento. Essa variação genética, apresentada na Figura 26, não foi previamente identificada por um padrão de bandas que diferia do padrão usual observado nas amostras submetidas à técnica de triagem PCR-SSCP.

A

GTCCCTGAGGAATAGCTTGGCTTGAGGCCGTGGGGAGGGCTGCCGGCCAGCGCACCCCCCATGCCAGATGGTCA
CCATGGCGTGCATCTTCCAGCTCTTCGACTACATCTCTGAGTGCATCTCCGACTTCCTGGACAAGCATCAG
 ATGAAACACAAGAAGCTGCCCTGGGCTTCACCTTCTCCTTTCTGTGAGGCACGAAGACATCGATAAGGTGGGC
 CGGGTGGAGGGGCAGAAGGCAGATGAGGGG

B

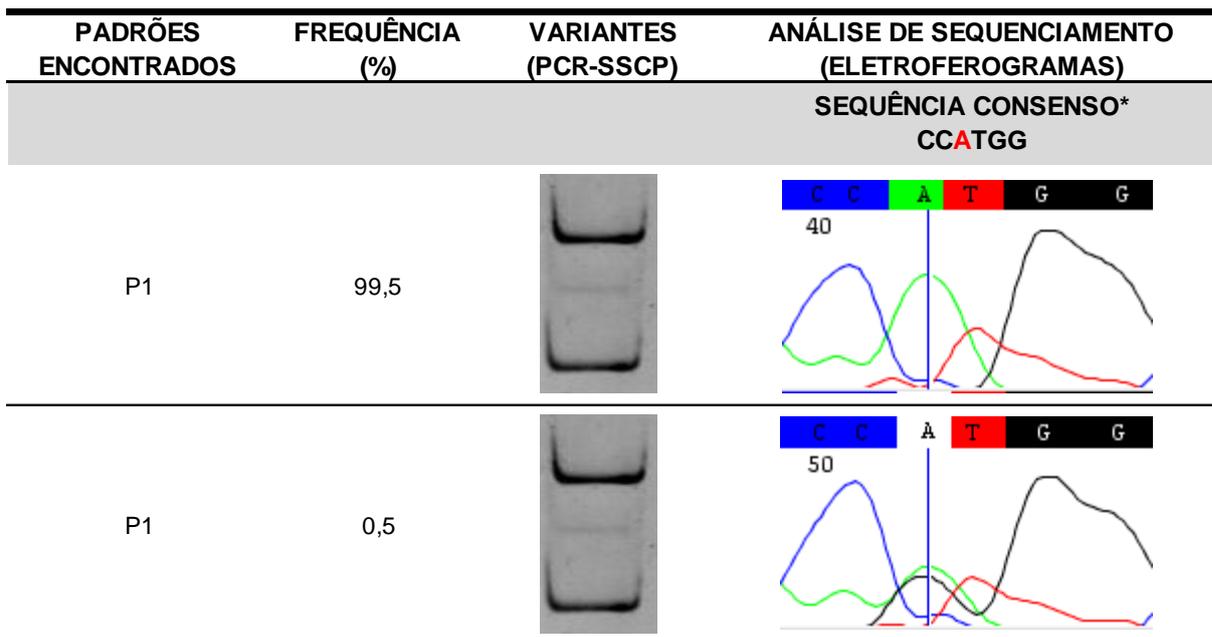


FIGURA 26. PADRÕES ENCONTRADOS, FREQUÊNCIAS E ANÁLISES DE SEQUENCIAMENTO DAS VARIANTES ENCONTRADAS NOS PERFIS DE PCR-SSCP DO GCKE4 DO GENE DA GCK.

A seção "A" mostra a sequência de nucleotídeos (5'→3') correspondente ao GCKE4 do gene da GCK. Em verde (a região de hibridação dos primers), em preto (Intron3 e Intron4, respectivamente), em azul (o Exon4); em caixa alta (a sequência apresentada no eletroferograma, seção B) e em vermelho (a posição da variação genética).

A seção "B" mostra os padrões, frequências, e perfis de variantes encontradas e confirmadas por reação de sequenciamento. P1 corresponde aos padrões usual e heterozigoto para a variação (substituição A→G). O número total de amostras analisadas (n) por PCR-SSCP foi de 200.

* Sequência consenso do GCKE4 do gene da GCK no sentido 5'→3'.

5.6 EXON5e6 DO GENE DA GLUCOQUINASE (GCKE5e6)

As Figuras 27, 28 e 29 mostram, respectivamente, os perfis eletroforéticos de PCR, PCR-SSCP e Sequenciamento do Exon5e6 do gene da Glucoquinase.

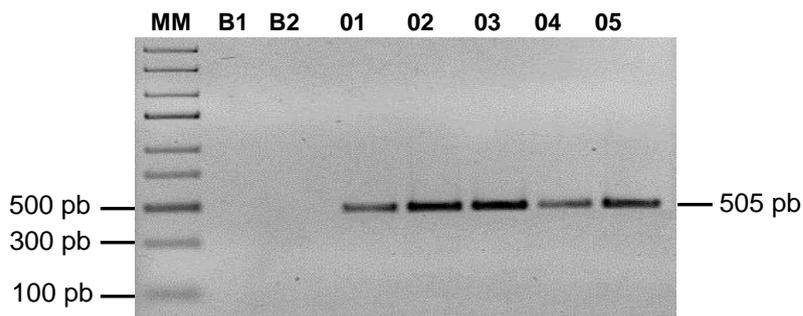


FIGURA 27. PERFIL ELETROFORÉTICO TÍPICO DE PRODUTOS DE PCR DO GCKE5e6 DO GENE DA GCK.

Eletroforese em gel de agarose 1,5% em tampão TBE 1X. O produto de PCR (2 μ L) acrescido de 3 μ L de solução de aplicação (glicerol 30%, xileno cianol 0,025% e azul de bromofenol 0,025%) foi aplicado no gel. A corrida eletroforética foi realizada 50 minutos 60V (~25mA). O gel foi corado com brometo de etídeo.

As linhas B1 e B2 representam os controles da reação, na ausência de DNA. As linhas 01 a 05 são amostras de DNA amplificadas. À esquerda do gel a indicação da massa molecular do marcador de 300 pares de base (GeneRuller Express DNA Ladder, Fermentas) da linha MM. À direita do gel a indicação do tamanho do produto de PCR.

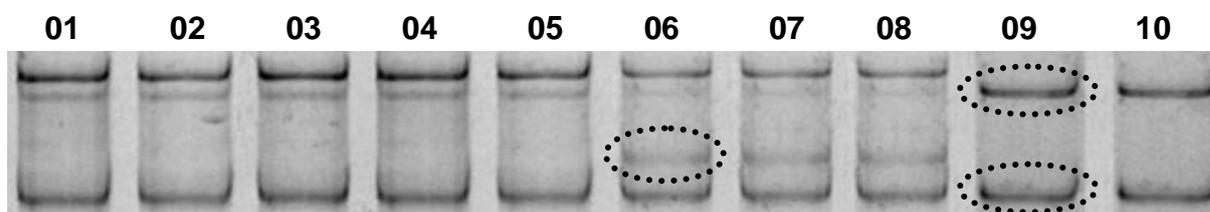


FIGURA 28. PERFIL ELETROFORÉTICO TÍPICO DA REAÇÃO DE PCR-SSCP DO GCKE5e6 DO GENE DA GCK.

Gel de poliacrilamida (29:1) a 10% em meio ácido, pH 3,66. A 5 μ L do produto de PCR foram acrescidos 10 μ L da solução de formamida seguido de incubação a 98 $^{\circ}$ C por 10 minutos, sendo o volume total aplicado no gel. As condições de corrida eletroforética estão descritas na Tabela 6. O gel foi corado com brometo de etídeo.

As linhas 1 a 10 mostram o padrão eletroforético observado com variação. As linhas 01 a 05 evidenciam o padrão usual, as linhas 06 a 08 o padrão heterozigoto e as linhas 09 e 10 o padrão de homozigotos encontrados e confirmados por análise de sequenciamento.

5.6.1 Variação Genética do GCKE5e6 do gene da Glucoquinase.

Uma variação genética do tipo heterozigota foi encontrada em 7 amostras e uma variação do tipo homozigota foi encontrada em 3 amostras do GCKE5e6 na análise de sequenciamento. Essas variações genéticas, bem como os seus perfis de banda, estão representados na Figura 29.

A

TCTGAGCCTGTTTCCTCAGCTGTAAAGTAGGGTGCATACTTTTATGGCCCTGTGCAGGAGGTAGTGACAGGCCCT
 AGCACCTGCCTCCAGTATATGTTAGCAGCCACGAGGCCATCTCTCCCCACAGGGCATCCTTCTCAACTGGACC
 AAGGGCTTCAAGGCCTCAGGAGCAGAAGGGAACAATGTCGTGGGGCTTCTGCGAGACGCTATCAAACGGAGAGGG
 GTGAGGGGGCACCTGTACCTGCCGGGGGGGCTGCCCTGGGCCACCCACCCAGCAC'TGCC'TGCC'TTCTCCTTGG
 CTTCCAGCACTGCAGCTTCTGTGCTTCTTGGCAGGACTTTGAAATGGATGTGGTGGCAATGGTGAATGACACGGT
 GGCCACGATGATCTCCTGCTACTACGAAGACCATCAGTGCAGGTCGGCATGATCGTGGGTAAGGGCTCCTTGCA
 CCCCTGCCCTTCCAGAC**TGCTGA**GGCTCCCTGTGTACAACAGGCTTCAAGGGCC

B

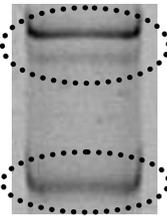
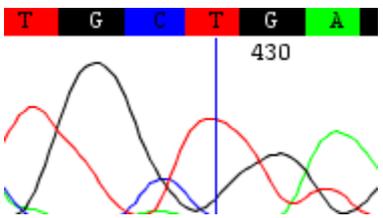
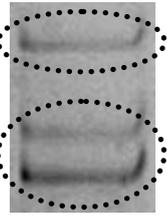
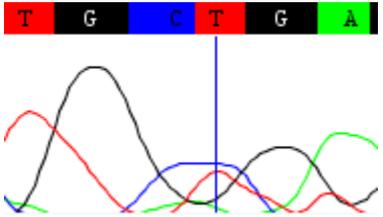
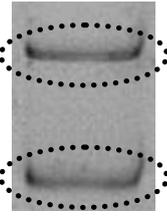
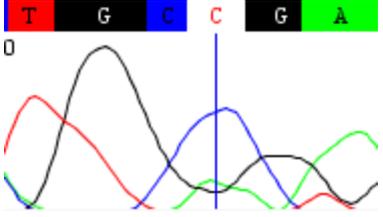
PADRÕES ENCONTRADOS	FREQUÊNCIA (%)	VARIANTES (PCR-SSCP)	ANÁLISE DE SEQUENCIAMENTO (ELETROFEROGRAMAS)
SEQUÊNCIA CONSENSO* TGCTGA			
P1	95,0		
P2	3,5		
P3	1,5		

FIGURA 29. PADRÕES, FREQUÊNCIAS E ANÁLISES DE SEQUENCIAMENTO DAS VARIANTES ENCONTRADAS NOS PERFIS DE PCR-SSCP DO GCKE5e6 DO GENE DA GCK.

A seção "A" mostra a sequência de nucleotídeos (5'→3') correspondente ao GCKE5e6 do gene da GCK. Em verde (a região de hibridação dos primers), em preto (os introns 4, 5 e 6 respectivamente), em azul (os Exons 5 e 6, respectivamente); em caixa alta (a sequência apresentada no eletroferograma, seção B) e em vermelho (a posição da variação genética).

A seção "B" mostra os padrões, frequências, e perfis de variantes encontradas e confirmadas por reação de sequenciamento. P1, P2 e P3 correspondem aos padrões usual, heterozigoto e homozigoto para a variação (substituição T→C), respectivamente. O número total de amostras analisadas (n) por PCR-SSCP foi de 200.

* Sequência consenso do GCKE5e6 do gene da GCK no sentido 5'→3'.

5.7 EXON7 DO GENE DA GLUCOQUINASE (GCKE7)

As Figuras 30, 31 e 32 mostram, respectivamente, os perfis eletroforéticos de PCR, PCR-SSCP e Sequenciamento do Exon7 do gene da Glucoquinase.

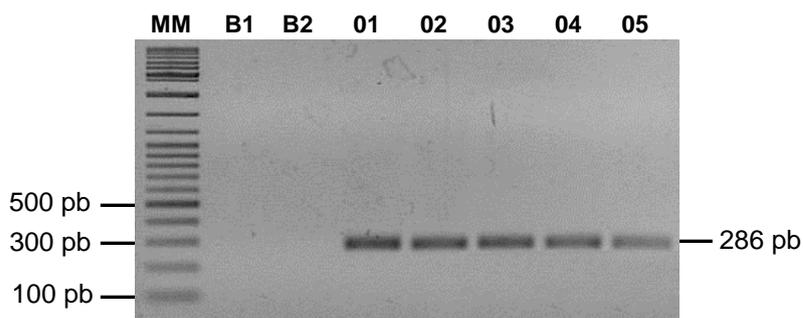


FIGURA 30. PERFIL ELETROFORÉTICO TÍPICO DE PRODUTOS DE PCR DO GCKE7 DO GENE DA GCK.

Eletroforese em gel de agarose 1,5% em tampão TBE 1X. O produto de PCR (2 μ L) acrescido de 3 μ L de solução de aplicação (glicerol 30%, xileno cianol 0,025% e azul de bromofenol 0,025%) foi aplicado no gel. A corrida eletroforética foi realizada 50 minutos 60V (~25mA). O gel foi corado com brometo de etídeo.

As linhas B1 e B2 representam os controles da reação, na ausência de DNA. As linhas 01 a 05 são amostras de DNA amplificadas. À esquerda do gel a indicação da massa molecular do marcador de 100 pares de base (GeneRuller Express DNA Ladder, Fermentas) da linha MM. À direita do gel a indicação do tamanho do produto de PCR.

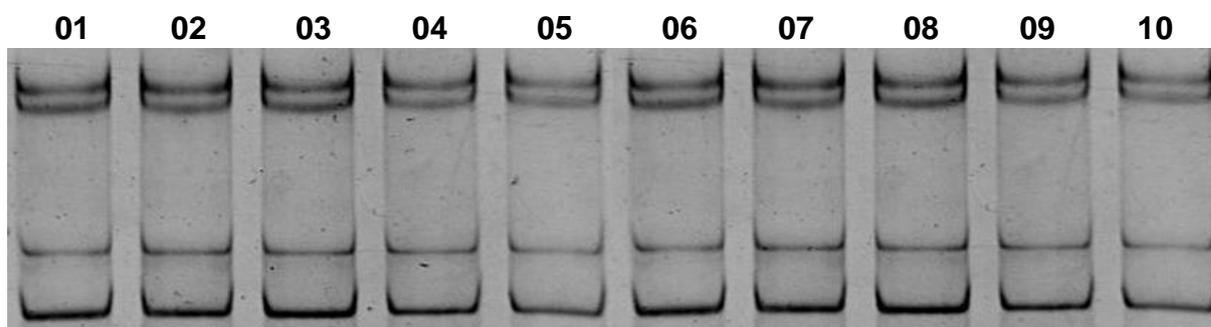


FIGURA 31. PERFIL ELETROFORÉTICO TÍPICO DA REAÇÃO DE PCR-SSCP DO GCKE7 DO GENE DA GCK.

Gel de poliacrilamida (29:1) a 10% em meio ácido, pH 3,66. A 5 μ L do produto de PCR foram acrescidos 10 μ L da solução de formamida seguido de incubação a 98°C por 10 minutos, sendo o volume total aplicado no gel. As condições de corrida eletroforética estão descritas na Tabela 6. O gel foi corado com brometo de etídeo.

As linhas 1 a 10 mostram o padrão eletroforético observado sem variação.

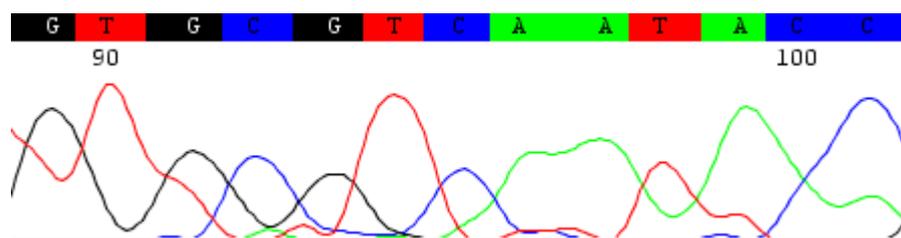


FIGURA 32. PERFIL ELETROFORÉTICO DE PARTE DA REAÇÃO DE SEQUENCIAMENTO DO GCKE7 DO GENE DA GCK.

Eletroferograma da reação de sequenciamento evidenciando parte da sequência do GCKE7 do gene da Glucoquinase sem a presença de variação genética.

5.8 EXON8 DO GENE DA GLUCOQUINASE (GCKE8)

As Figuras 33, 34 e 35 mostram, respectivamente, os perfis eletroforéticos de PCR, PCR-SSCP e Sequenciamento do Exon8 do gene da Glucoquinase.

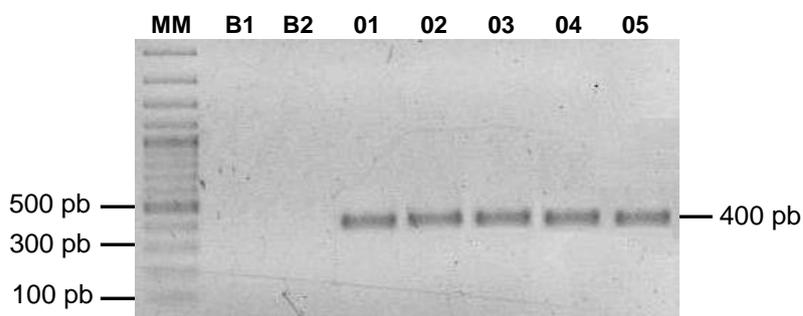


FIGURA 33. PERFIL ELETROFORÉTICO TÍPICO DE PRODUTOS DE PCR DO GCKE8 DO GENE DA GCK.

Eletroforese em gel de agarose 1,5% em tampão TBE 1X. O produto de PCR (2 μ L) acrescido de 3 μ L de solução de aplicação (glicerol 30%, xileno cianol 0,025% e azul de bromofenol 0,025%) foi aplicado no gel. A corrida eletroforética foi realizada 50 minutos 60V (~25mA). O gel foi corado com brometo de etídeo.

As linhas B1 e B2 representam os controles da reação, na ausência de DNA. As linhas 01 a 05 são amostras de DNA amplificadas. À esquerda do gel a indicação da massa molecular do marcador de 100 pares de base (GeneRuller Express DNA Ladder, Fermentas) da linha MM. À direita do gel a indicação do tamanho do produto de PCR.

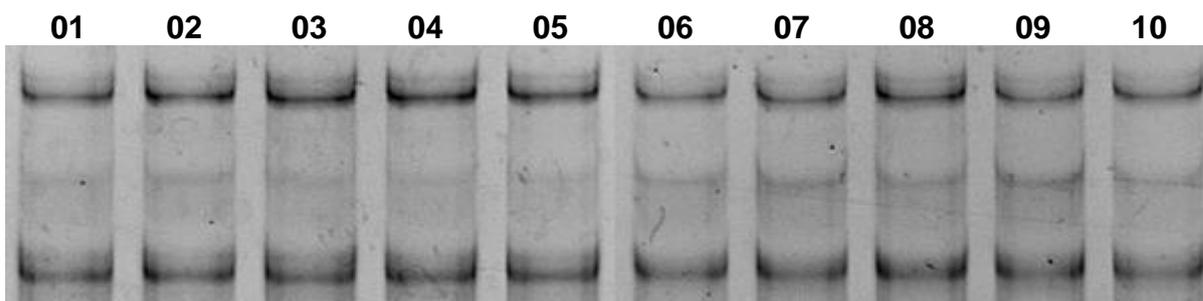


FIGURA 34. PERFIL ELETROFORÉTICO TÍPICO DA REAÇÃO DE PCR-SSCP DO GCKE8 DO GENE DA GCK.

Gel de poliacrilamida (29:1) a 10% em meio ácido, pH 3,66. A 5µL do produto de PCR foram acrescidos 10µL da solução de formamida seguido de incubação a 98°C por 10 minutos, sendo o volume total aplicado no gel. As condições de corrida eletroforética estão descritas na Tabela 6. O gel foi corado com brometo de etídeo.

As linhas 1 a 10 mostram o padrão eletroforético observado sem variação.

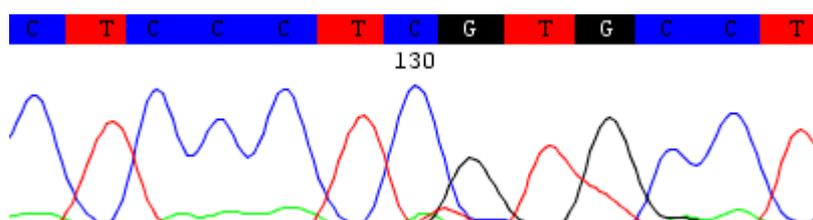


FIGURA 35. PERFIL ELETROFORÉTICO DE PARTE DA REAÇÃO DE SEQUENCIAMENTO DO GCKE8 DO GENE DA GCK.

Eletroferograma da reação de sequenciamento evidenciando parte da sequência do GCKE8 do gene da Glucoquinase sem a presença de variação genética.

5.9 EXON9 DO GENE DA GLUCOQUINASE (GCKE9)

As Figuras 36, 37 e 38 mostram, respectivamente, os perfis eletroforéticos de PCR, PCR-SSCP e Sequenciamento do Exon9 do gene da Glucoquinase.

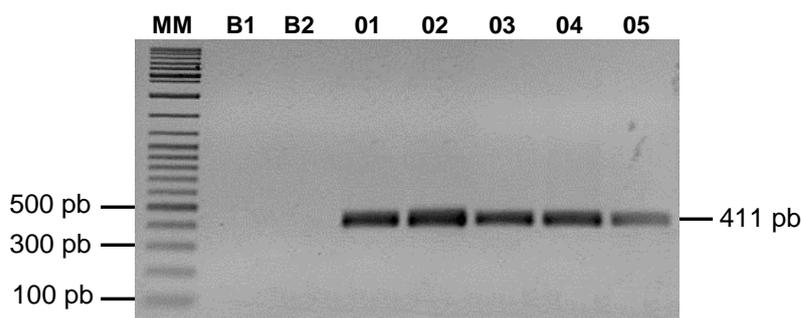


FIGURA 36. PERFIL ELETROFORÉTICO TÍPICO DE PRODUTOS DE PCR DO GCKE9 DO GENE DA GCK.

Eletoforese em gel de agarose 1,5% em tampão TBE 1X. O produto de PCR (2 μ L) acrescido de 3 μ L de solução de aplicação (glicerol 30%, xileno cianol 0,025% e azul de bromofenol 0,025%) foi aplicado no gel. A corrida eletroforética foi realizada 50 minutos 60V (~25mA). O gel foi corado com brometo de etídeo.

As linhas B1 e B2 representam os controles da reação, na ausência de DNA. As linhas 01 a 05 são amostras de DNA amplificadas. À esquerda do gel a indicação da massa molecular do marcador de 100 pares de base (GeneRuller Express DNA Ladder, Fermentas) da linha MM. À direita do gel a indicação do tamanho do produto de PCR.

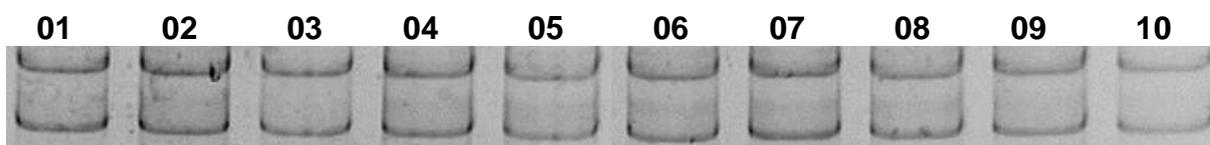


FIGURA 37. PERFIL ELETROFORÉTICO TÍPICO DA REAÇÃO DE PCR-SSCP DO GCKE9 DO GENE DA GCK.

Gel de poliacrilamida (29:1) a 09% em meio ácido, pH 3,66. A 5 μ L do produto de PCR foram acrescidos 10 μ L da solução de formamida seguido de incubação a 98 °C por 10 minutos, sendo o volume total aplicado no gel. As condições de corrida eletroforética estão descritas na Tabela 6. O gel foi corado com brometo de etídeo.

As linhas 1 a 10 mostram o padrão eletroforético observado sem variação. Porém, por análise de sequenciamento, foi observado três padrões. Um padrão homocigoto usual, um padrão heterocigoto e um padrão homocigoto para a variação genética encontrada. A variação genética foi encontrada em apenas 2 amostras, uma no grupo CTRL e outra no grupo DMG, apresentadas na Figura 36.

5.8.1 Variação Genética do GCKE9 do gene da Glucoquinase.

A Figura 38 apresenta a sequência dos amplicons gerados, bem como uma análise do GCKE9 do gene da Glucoquinase.

A

CCCTCCCTGGAGAACGAGAGGCCGCCGCTGGAGGGGGATGGACTGTTCGGAGCGACACTCAGCGACCGCCCTACCT
 CCTCCC GCCCCG CAGCGACACGGGCGACCGCAAGCAGATCTACAACATCCTGAGCACGCTGGGGCTGCGACCCTC
 GACCACCGACTGCGACATCGTGCGCCGCGCTGCGAGAGCGTGTCTACGCGCGCTGCGCACATGTGCTCGGGCGG
 GCTGGCGGGCGTCATCAACCGCATGCGCGAGAGCCGCGAGGACGTAATGCGCATCACTGTGGGCGTGGATGG
 CTCCGTGTACAAGCTGCACCCAGGTGAGCCCGCCCGGCTCTCTCCCTGGTAAAGTGGGGCCCAAAAAGCGC
 GCGCTCCAAGGTTCCCTTGCGGTTCCCAAGCTCCAAGATT

B

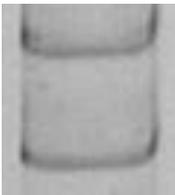
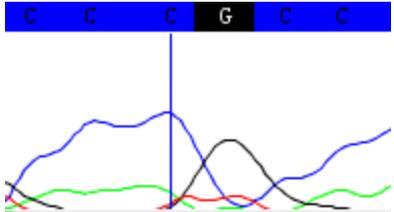
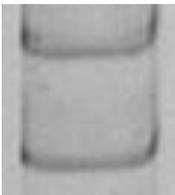
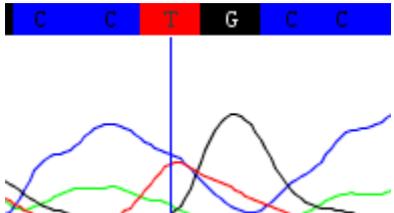
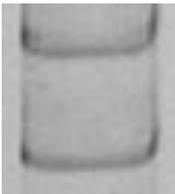
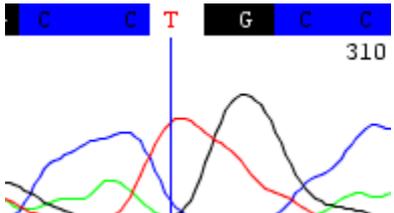
PADRÕES ENCONTRADOS	FREQUÊNCIA (%)	VARIANTES (PCR-SSCP)	ANÁLISE DE SEQUENCIAMENTO (ELETROFEROGRAMAS)
SEQUÊNCIA CONSENSO* CCCGCC			
P1	99,0		
P1	0,5		
P1	0,5		

FIGURA 38. PADRÕES ENCONTRADOS, FREQUÊNCIAS E ANÁLISES DE SEQUENCIAMENTO DAS VARIANTES ENCONTRADAS NOS PERFIS DE PCR-SSCP DO GCKE9 DO GENE DA GCK.

A seção "A" mostra a sequência de nucleotídeos (5'→3') correspondente ao amplicon do Exon9 do gene da GCK. Em verde (a região de hibridação dos primers), em preto (Intro8 e Intron9, respectivamente), em azul (o Exon9); em caixa alta (a sequência apresentada no eletroferograma, seção B) e em vermelho (a posição da variação genética).

Na seção "B" são mostrados os padrões, frequências, e perfis de variantes encontradas e confirmadas por reação de sequenciamento. P1 corresponde aos padrões usual, heterozigoto e homozigoto para a variação (substituição C→T), respectivamente. O número total de amostras analisadas (n) por PCR-SSCP foi de 200.

* Sequência consenso do GCKE9 do gene da GCK no sentido 5'→3'.

5.10 EXON10 DO GENE DA GLUCOQUINASE (GCKE10)

O Exon10 foi amplificado de forma semelhante a do Exon1 sendo gerados, com 4 pares de oligonucleotídeos iniciadores, 4 amplicons. O critério de nomenclatura dos fragmentos gerados foi semelhante ao critério utilizado para o Exon1. Exon10Amplicon1, Exon10Amplicon2, Exon10Amplicon3 e Exon10Amplicon4 do Gene da Enzima Glucoquinase (GCKE10A1, GCKE10A2, GCKE10A3 e GCKE10A4 respectivamente) para, posteriormente, serem analisados pelas técnicas de PCR-SSCP e sequenciamento.

5.10.1 Exon10Amplicon1 do Gene da Enzima Glucoquinase (GCKE10A1)

As Figuras 39, 40 e 41 mostram, respectivamente, os perfis eletroforéticos de PCR, PCR-SSCP e Sequenciamento do Exon10A1 do gene da Glucoquinase.

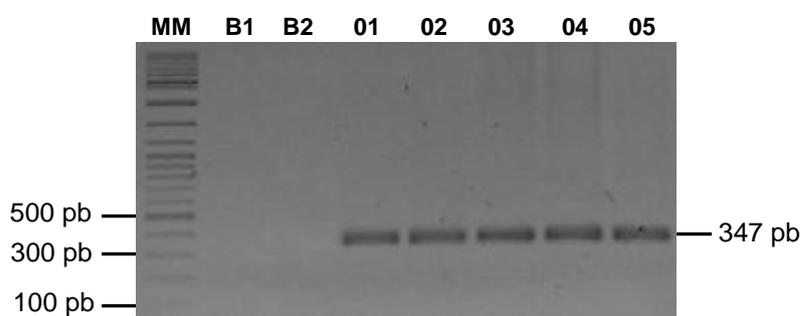


FIGURA 39. PERFIL ELETROFORÉTICO TÍPICO DE PRODUTOS DE PCR DO GCKE10A1 DO GENE DA GCK.

Eletroforese em gel de agarose 1,5% em tampão TBE 1X. O produto de PCR (2 μ L) acrescido de 3 μ L de solução de aplicação (glicerol 30%, xileno cianol 0,025% e azul de bromofenol 0,025%) foi aplicado no gel. A corrida eletroforética foi realizada 50 minutos 60V (~25mA). O gel foi corado com brometo de etídeo.

As linhas B1 e B2 representam os controles da reação, na ausência de DNA. As linhas 01 a 05 são amostras de DNA amplificadas. À esquerda do gel a indicação da massa molecular do marcador de 100 pares de base (GeneRuller Express DNA Ladder, Fermentas) da linha MM. À direita do gel a indicação do tamanho do produto de PCR.

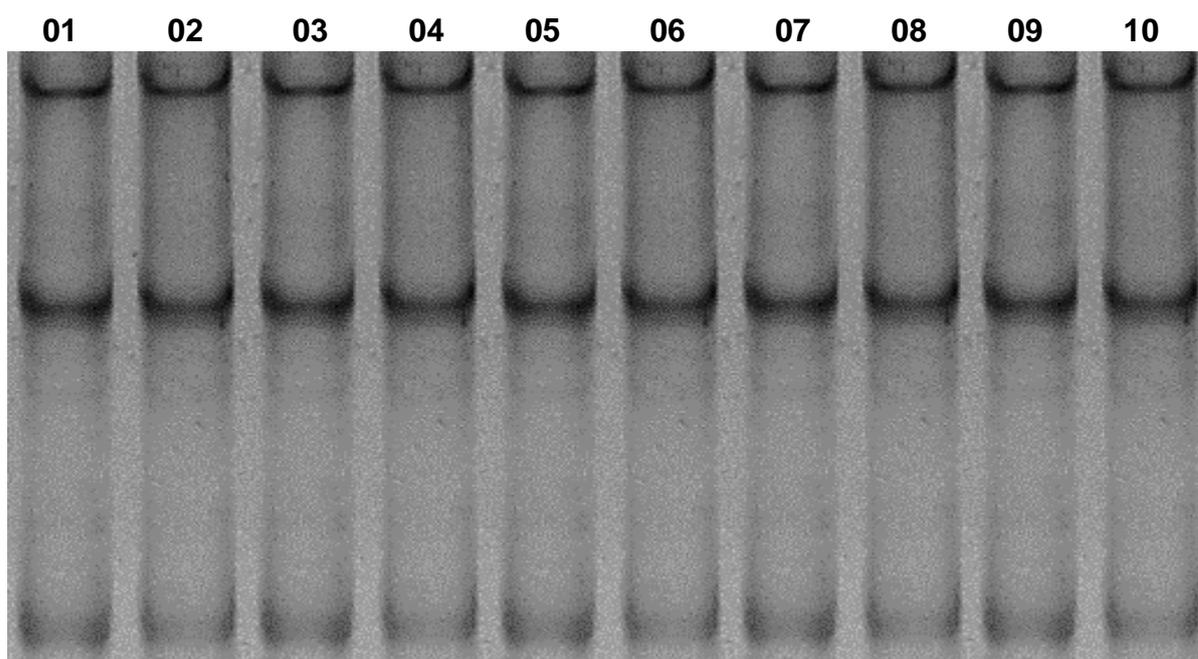


FIGURA 40. PERFIL ELETROFORÉTICO TÍPICO DA REAÇÃO DE PCR-SSCP DO GCKE10A1 DO GENE DA GCK.

Gel de poliacrilamida (29:1) a 10% em meio ácido, pH 3,66. A 5µL do produto de PCR foram acrescidos 10µL da solução de formamida seguido de incubação a 98°C por 10 minutos, sendo o volume total aplicado no gel. As condições de corrida eletroforética estão descritas na Tabela 6. O gel foi corado com brometo de etídeo.

As linhas 1 a 10 mostram o padrão eletroforético observado sem a presença de variação genética.

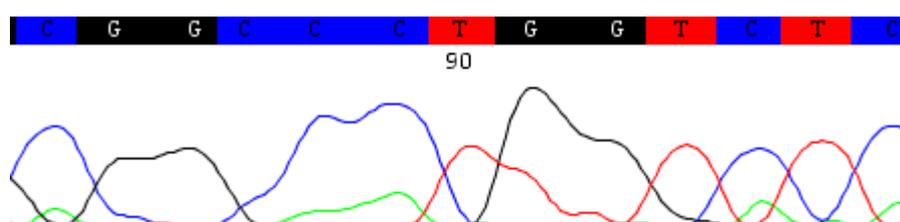


FIGURA 41. PERFIL ELETROFORÉTICO DE PARTE DA REAÇÃO DE SEQUENCIAMENTO DO GCKE10A1 DO GENE DA GCK.

Eletroferograma da reação de sequenciamento evidenciando parte da sequência do GCKE10A1 do gene da Glucoquinase sem a presença de variação genética.

5.10.2 Exon10Amplicon2 do Gene da Enzima Glucoquinase (GCKE10A2)

As Figuras 42, 43 e 44 mostram, respectivamente, os perfis eletroforéticos de PCR, PCR-SSCP e Sequenciamento do Exon10A2 do gene da Glucoquinase.

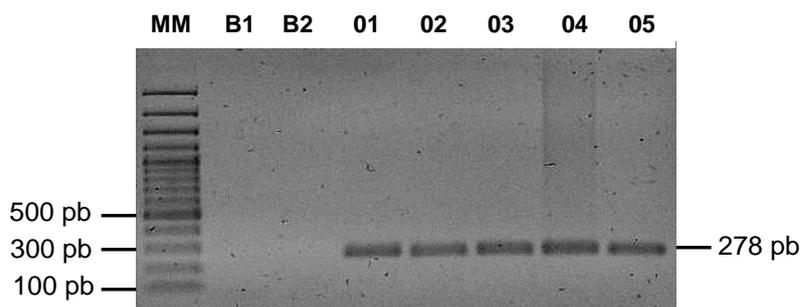


FIGURA 42. PERFIL ELETROFORÉTICO TÍPICO DE PRODUTOS DE PCR DO GCKE10A2 DO GENE DA GCK.

Eletroforese em gel de agarose 1,5% em tampão TBE 1X. O produto de PCR (2 μ L) acrescido de 3 μ L de solução de aplicação (glicerol 30%, xileno cianol 0,025% e azul de bromofenol 0,025%) foi aplicado no gel. A corrida eletroforética foi realizada 50 minutos 60V (~25mA). O gel foi corado com brometo de etídeo.

As linhas B1 e B2 representam os controles da reação, na ausência de DNA. As linhas 01 a 05 são amostras de DNA amplificadas. À esquerda do gel a indicação da massa molecular do marcador de 100 pares de base (GeneRuller Express DNA Ladder, Fermentas) da linha MM. À direita do gel a indicação do tamanho do produto de PCR.

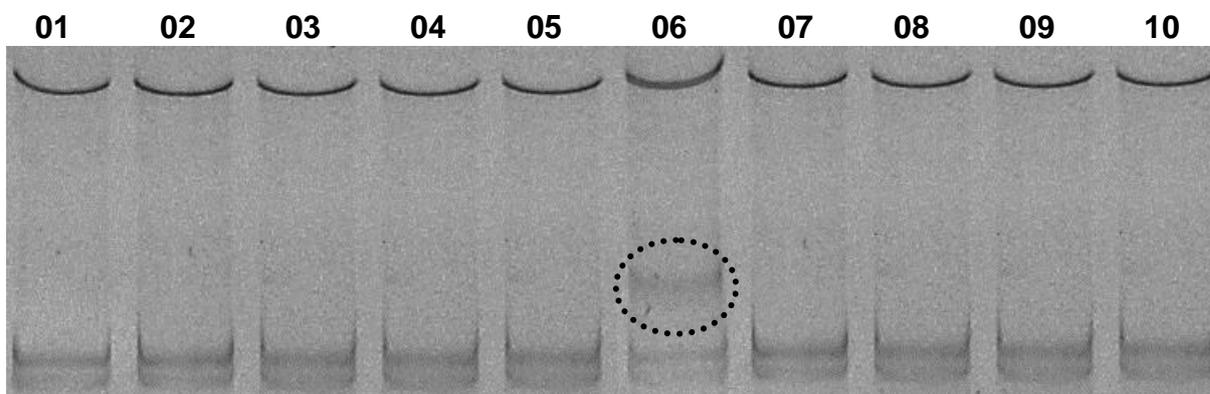


FIGURA 43. PERFIL ELETROFORÉTICO TÍPICO DA REAÇÃO DE PCR-SSCP DO GCKE10A2 DO GENE DA GCK.

Gel de poliacrilamida (29:1) a 13% em meio ácido, pH 3,66. A 5 μ L do produto de PCR foram acrescidos 10 μ L da solução de formamida seguido de incubação a 98 $^{\circ}$ C por 10 minutos, sendo o volume total aplicado no gel. As condições de corrida eletroforética estão descritas na Tabela 6. O gel foi corado com brometo de etídeo.

As linhas 01 a 05 e 07 a 10 mostram o padrão eletroforético usual. A elipse destaca na linha 06 um perfil que difere do usual.

5.10.2.1 Variação Genética do GCKE10A2 do gene da Glucoquinase.

A Figura 44 apresenta a sequência do amplicons gerados, bem como uma análise do GCKE10A2 do gene da Glucoquinase.

A

CATACCGCTGGGGAACAGAGCGGGCCTCTTCCCTCAGTTTTTTCGGTGGGACAGCCCCAGGGCCCTAACGGGGGTG
 CGGCAGGAGCAGGAACAGAGACTCTGGAAGCCCCCACCTTTCTCGCTGGAATCAATTTCCAGAAGGGAGTTGC
 TCACTCAGGACTTTGATGCATTTCCACACTGTCAGAGCTGTTGGCC**TCGCCT**GGGCCCAGGCTCTGGGAAG
 GGGTGCCCTCTGGATCCTGCTGTGGCCTCACTTCCCTGGAACTCATCCTGTGTGGG

B

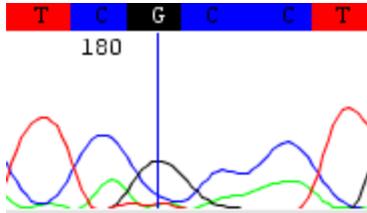
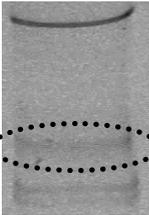
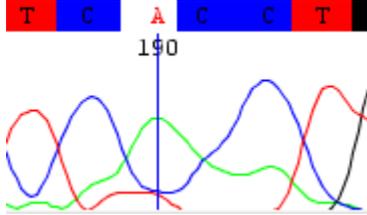
PADRÕES ENCONTRADOS	FREQUÊNCIA (%)	VARIANTES (PCR-SSCP)	ANÁLISE DE SEQUENCIAMENTO (ELETROFEROGRAMAS)
SEQUÊNCIA CONSENSO* TCGCCT			
P1	99,0		
P2	1,0		

FIGURA 44. PADRÕES ENCONTRADOS, FREQUÊNCIAS E ANÁLISES DE SEQUENCIAMENTO DAS VARIANTES ENCONTRADAS NOS PERFIS DE PCR-SSCP DO GCKE10A2 DO GENE DA GCK.

A seção "A" mostra a sequência de nucleotídeos (5'→3') correspondente ao GCKE10A2 do gene da GCK. Em verde (a região de hibridação dos primers), em azul (o Exon10A2); em caixa alta (a sequência apresentada no eletroferograma, seção B) e em vermelho (a posição da variação genética).

A seção "B" mostra os padrões, frequências, e perfis de variantes encontradas e confirmadas por reação de sequenciamento. P1 e P2 correspondem aos padrões usual e homozigoto para a variação (substituição G→A). O número total de amostras analisadas (n) por PCR-SSCP foi de 200.

* Sequência consenso do GCKE10A2 do gene da GCK no sentido 5'→3'.

5.10.3 Exon10Amplicon3 do Gene da Enzima Glucoquinase (GCKE10A3)

As Figuras 45, 46 e 47 mostram, respectivamente, os perfis eletroforéticos de PCR, PCR-SSCP e Sequenciamento do Exon10A3 do gene da Glucoquinase.

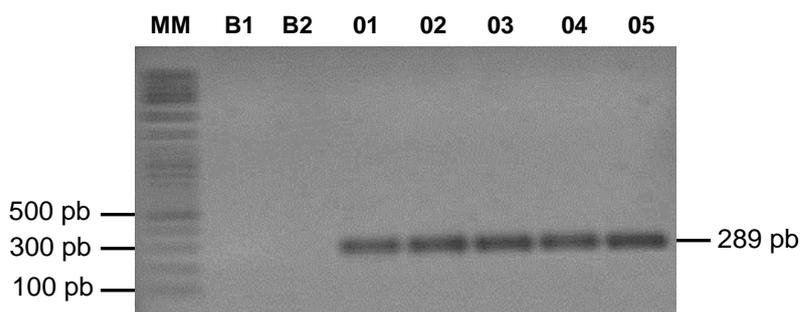


FIGURA 45. PERFIL ELETROFORÉTICO TÍPICO DE PRODUTOS DE PCR DO GCKE10A3 DO GENE DA GCK.

Eletoforese em gel de agarose 1,5% em tampão TBE 1X. O produto de PCR (2 μ L) acrescido de 3 μ L de solução de aplicação (glicerol 30%, xileno cianol 0,025% e azul de bromofenol 0,025%) foi aplicado no gel. A corrida eletroforética foi realizada 50 minutos 60V (~25mA). O gel foi corado com brometo de etídeo.

As linhas B1 e B2 representam os controles da reação, na ausência de DNA. As linhas 01 a 05 são amostras de DNA amplificadas. À esquerda do gel a indicação da massa molecular do marcador de 100 pares de base (GeneRuller Express DNA Ladder, Fermentas) da linha MM. À direita do gel a indicação do tamanho do produto de PCR.

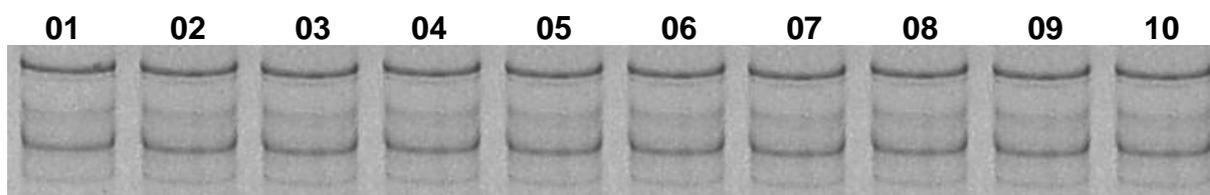


FIGURA 46. PERFIL ELETROFORÉTICO TÍPICO DA REAÇÃO DE PCR-SSCP DO GCKE10A3 DO GENE DA GCK.

Gel de poliacrilamida (29:1) a 13% em meio ácido, pH 3,66. A 5 μ L do produto de PCR foram acrescidos 10 μ L da solução de formamida seguido de incubação a 98°C por 10 minutos, sendo o volume total aplicado no gel. As condições de corrida eletroforética estão descritas na Tabela 6. O gel foi corado com brometo de etídeo.

As linhas 01 a 10 mostram um padrão eletroforético com bandas que não diferem do perfil usual.

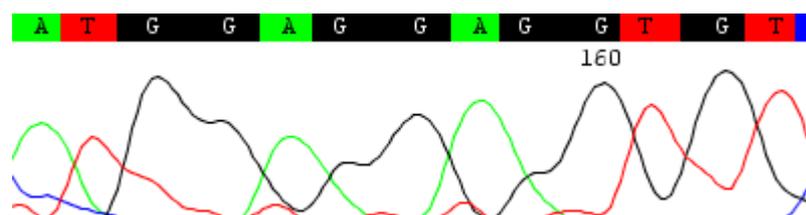


FIGURA 47. PERFIL ELETROFORÉTICO DE PARTE DA REAÇÃO DE SEQUENCIAMENTO DO GCKE10A3 DO GENE DA GCK.

Eletoferograma da reação de sequenciamento evidenciando parte da sequência do GCKE10A3 do gene da Glucoquinase sem a presença de variação genética.

5.10.4 Exon10Amplicon4 do Gene da Enzima Glucoquinase (GCKE10A4)

As Figuras 48, 49 e 50 mostram, respectivamente, os perfis eletroforéticos de PCR, PCR-SSCP e Sequenciamento do Exon10A4 do gene da Glucoquinase.

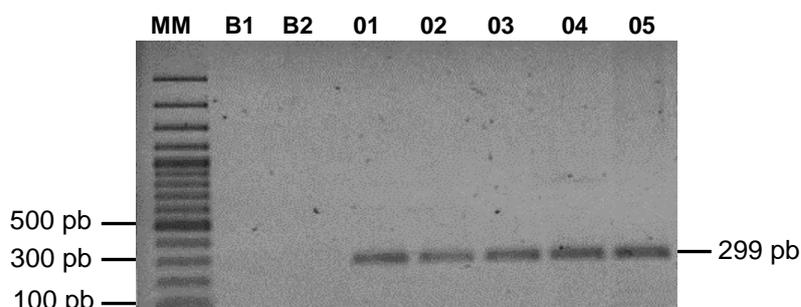


FIGURA 48. PERFIL ELETROFORÉTICO TÍPICO DE PRODUTOS DE PCR DO GCKE10A4 DO GENE DA GCK.

Eletroforese em gel de agarose 1,5% em tampão TBE 1X. O produto de PCR (2 μ L) acrescido de 3 μ L de solução de aplicação (glicerol 30%, xileno cianol 0,025% e azul de bromofenol 0,025%) foi aplicado no gel. A corrida eletroforética foi realizada 50 minutos 60V (~25mA). O gel foi corado com brometo de etídeo.

As linhas B1 e B2 representam os controles da reação, na ausência de DNA. As linhas 01 a 05 são amostras de DNA amplificadas. À esquerda do gel a indicação da massa molecular do marcador de 100 pares de base (GeneRuller Express DNA Ladder, Fermentas) da linha MM. À direita do gel a indicação do tamanho do produto de PCR.

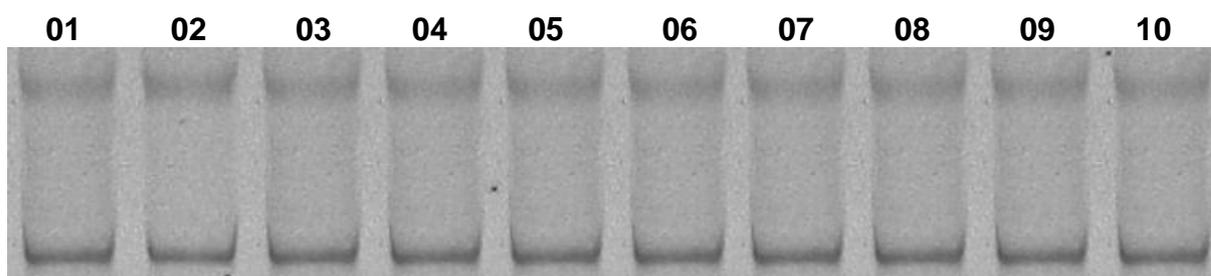


FIGURA 49. PERFIL ELETROFORÉTICO TÍPICO DA REAÇÃO DE PCR-SSCP DO GCKE10A4 DO GENE DA GCK.

Gel de poliacrilamida (29:1) a 09% em meio ácido, pH 3,66. A 5 μ L do produto de PCR foram acrescidos 10 μ L da solução de formamida seguido de incubação a 98°C por 10 minutos, sendo o volume total aplicado no gel. As condições de corrida eletroforética estão descritas na Tabela 6. O gel foi corado com brometo de etídeo.

As linhas 01 a 10 mostram um padrão eletroforético com bandas que não diferem do perfil usual.

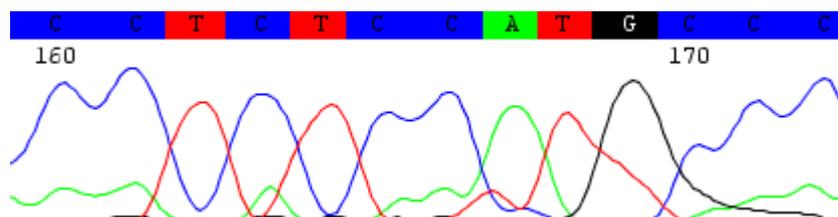


FIGURA 50. PERFIL ELETROFORÉTICO DE PARTE DA REAÇÃO DE SEQUENCIAMENTO DO GCKE10A4 DO GENE DA GCK.
Eletroferograma da reação de sequenciamento evidenciando parte da sequência do GCKE10A4 do gene da Glucoquinase sem a presença de variação genética.

A Figura 51 apresenta um resumo da localização e caracterização das variantes encontradas neste estudo.

**B**

LOCALIZAÇÃO DO SNP	Intron3	Intron6	Intron9	Exon10
EXON (Amplicon)	GCKE4 (4)	GCKE5e6 (6)	GCKE9 (9)	GCKE10A2 (10)
SNP	A>G	T>C	C>T	G>A
RS	-	rs2268574	rs2908274	rs13306388
POSIÇÃO DO SNP	c.43331A>G	c.44702T>C	c.48935C>T	c.49620G>A
FREQUÊNCIA (%)	AA (99,5) AG (0,5) GG (0,0)	TT (95,0) TC (3,5) CC (1,5)	CC (99,0) CT (0,5) TT (0,5)	GG (99,0) GA (0,0) AA (1,0)
REPORTE NA LITERATURA	Não	Sim	Sim	Sim
FREQUÊNCIA DO ALELO RARO (%)	0,3	3,3	0,8	1,0
95% Intervalo de Confiança (%)	(0-1)	(2-5)	(0-2)	(0-2)
ASSOCIAÇÃO CLÍNICA	-	Elevação do Ácido Úrico	-	-
FREQUÊNCIA DO ALELO RARO EM OUTRAS POPULAÇÕES (%)	-	45,8 (Europeus) 32,2 (Asiáticos) 26,7 (Africanos)	50,0 (Africanos)	-
TIPO DE ASSOCIAÇÃO CLÍNICA EM OUTRAS POPULAÇÕES	-	Desconhecida	Desconhecida	Desconhecida

FIGURA 51. LOCALIZAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DAS VARIANTES GENÉTICAS OBSERVADAS NO ESTUDO.

Na seção "A", as caixas, numeradas de 1 a 10 representam os 10 exons do Gene da GCK. Os espaços entre as caixas, interligados pela barra horizontal, representam as regiões intrônicas.

Na seção "B", estão apresentadas as características dos SNPs encontrados no trabalho.

(-) Sem informação.

Dados de cada rs obtidos do sítio *BLASTn SNP Suit*.

A concentração de ácido úrico foi o único parâmetro que apresentou significância após a análise de regressão (regressão múltipla – *forward stepwise*) entre os genótipos das variantes para o sítio polimórfico do amplicon GCKE5e6. A Figura 52 mostra a relação entre os genótipos e a concentração de ácido úrico para estas variantes.

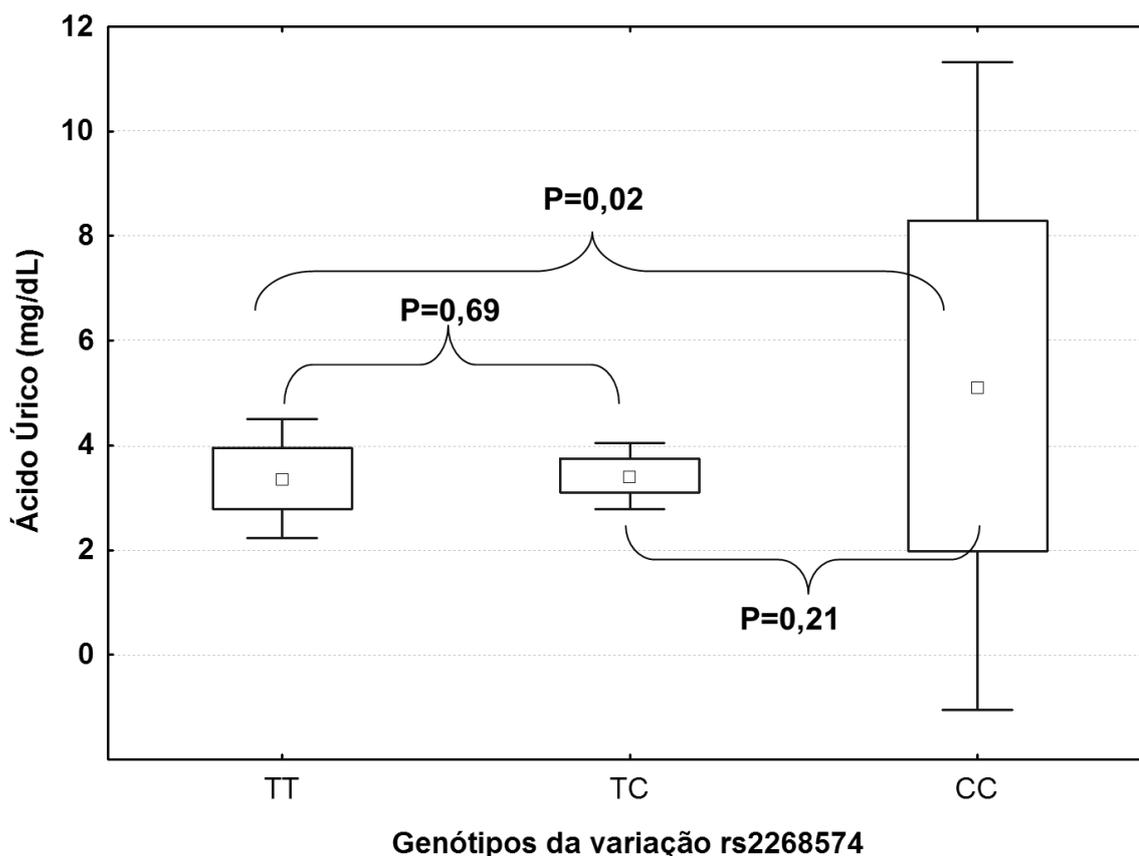


FIGURA 52. RELAÇÃO ENTRE OS GENÓTIPOS DO POLIMORFISMO rs2268574 DO AMPLICON 5e6 COM A CONCENTRAÇÃO SÉRICA DE ÁCIDO ÚRICO.

Os genótipos do polimorfismo (c.44702T>C) do Intron6 do gene da Glucoquinase foram relacionados com as concentrações séricas de ácido úrico. Os quadrados abertos representam a média, o quadrado maior 1 desvio padrão e as barras verticais 2 desvios padrões.

Os valores de probabilidade foram obtidos com o teste "t" para variáveis independentes, após transformação logarítmica da concentração de ácido úrico para normalização.

6 DISCUSSÃO

A enzima Glucoquinase atua como um sensor regulando a liberação de insulina pelo pâncreas desempenhando, dessa forma, uma importante função na homeostase da glucose (NISHI *et al.*, 1992). A secreção fetal de insulina, um hormônio com características anabólicas, exerce uma função relevante no crescimento do organismo e é estimulada em resposta à concentração de glucose materna (PRIDJIAN; BENJAMIN, 2010). Portanto, o estudo de variantes genéticas do gene da Glucoquinase, que apresentam potencial para alterar a homeostasia da glucose sérica, pode afetar a gestante, bem como o feto e recém-nato (HATTERSLEY *et al.*, 1998). Mutações no gene da Glucoquinase (MODY-2) podem explicar até 5% dos casos de diabetes gestacional (ELLARD *et al.*, 2000; GLOYN, 2003). Esse tipo de diabetes é responsável por 5% a 10% das complicações na gravidez (PRIDJIAN; BENJAMIN, 2010). Sua prevalência aumentou de 10% a 100% em vários grupos étnicos nos últimos 20 anos e apresenta várias consequências negativas tanto para a mãe quanto para o recém-nascido (FERRARA, 2007).

6.1 PARÂMETROS ANTROPOMÉTRICOS E OUTROS

Classificação e Coleta das Amostras

As gestantes selecionadas para este estudo, classificadas em grupos, saudáveis (controle) e diabéticas gestacionais (DMG), apresentaram idade média significativamente diferente (Tabela 7). Este achado representa as características dos locais de atendimento de onde foram coletadas as amostras. Também é conhecido o efeito positivo do aumento da idade com o diagnóstico de DMG (COUSTAN *et al.*, 1989). Nas classificações de risco para DMG, pacientes com menos que 25 anos tem risco reduzido para esta patologia, sendo caracterizadas como “baixo risco” (METZGER *et al.*, 2007; ADA, 2010a). Portanto, a idade média dos grupos em estudo esta de acordo com o descrito e esperado para gestantes.

A coleta das amostras nas gestantes diabéticas foi realizada em período da gravidez significativamente mais avançado (cerca de 7 meses) quando comparado com o grupo controle (cerca de 5 meses) como observado na Tabela 7. Este achado reflete características associadas à obtenção da amostra. O Programa Mãe Curitibana atende as gestantes e as encaminha para serem atendidas no Laboratório da Prefeitura Municipal de Curitiba (LMC) entre a 24^a e 28^a semanas de gestação, período no qual a concentração dos hormônios “diabetogênicos”, fisiológicos na gravidez, é maior. Somente após a triagem pelo LMC, é que as gestantes caracterizadas como diabéticas são encaminhadas ao Serviço de Atendimento de Diabéticas Gestantes do HC-UFPR. Portanto, a diferença de período gestacional era esperada entre os grupos em estudo.

Etnia

Quanto à etnia, o grupo CTRL foi totalmente composto de Euro-Brasileiras, enquanto o grupo DMG, contempla uma fração de 10% e 90%, respectivamente, de Afro- e Euro-Brasileiras (Tabela 7). A presença significativamente maior ($P < 0,002$) de Afro-Brasileiras no grupo DMG é compatível com o maior risco atribuído aos afrodescendentes para o desenvolvimento do diabetes (DOOLEY; METZGER; CHO, 1991).

Tabagismo

As gestantes com DMG apresentaram uso do tabaco (44%) significativamente maior quando comparado ao grupo controle (2%) como mostrado na Tabela 7. A soma desses dois grupos traz a informação de que 46% das gestantes fumam na população estudada. Este dado é semelhante com o percentual de gestantes tabagistas da Europa, África do Sul e Austrália (20-45%). Por outro lado, representa mais do que o dobro de mulheres grávidas que fazem o uso de tabaco (~20%) na América do Sul e Canadá (NG; ZELIKOFF, 2007). Gestantes que fazem uso do tabaco podem propiciar problemas futuros no recém-nascido como asma, câncer, diabetes tipo 2, obesidade e desordens neurológicas (MONTGOMERY; EKBOM,

2002; NG; ZELIKOFF, 2007). O risco para o desenvolvimento do diabetes tipo 2, em especial, é decorrente de uma má nutrição fetal, no período intrauterino, associado ou não à exposição aos agentes tóxicos oriundos do hábito tabagista materno. De forma contrária à associação com o diabetes tipo 2, em estudos realizados, não foram encontradas associações entre gestantes que fazem uso do tabaco com o desenvolvimento do diabetes tipo 1 (MARSHALL *et al.*, 2004; STENE *et al.*, 2004). O hábito de fumar está presente em jovens tanto com diabetes tipo 1 quanto tipo 2. Este hábito está prevalente em 2,7%, 17,1% e 34,0% em jovens com diabetes tipo 1 com idades de 10 a 14 anos, 15 a 19 anos e acima de 20 anos, respectivamente. Para jovens com diabetes tipo 2, com a mesma faixa etária, uma prevalência de 5,5%, 16,4% e 40,3% respectivamente, foi reportada (REYNOLDS *et al.*, 2010).

Contreras e colaboradores (2010) descreveram que gestantes tabagistas mostraram 40% menor probabilidade para os neonatos apresentarem tamanho maior que o previsto para a idade. Este efeito aparentemente benéfico do tabaco durante a gestação, no entanto, necessita confirmação e os autores não recomendam o tabagismo para uso terapêutico.

Miller e colaboradores (2010), comparando mulheres fumantes e não fumantes, ressaltam que o uso de tabaco diminui o risco para o desenvolvimento da pré-eclâmpsia, um quadro de falência aguda da função renal. No entanto, gestantes tabagistas que desenvolveram pré-eclâmpsia, apresentaram mais complicações durante a gravidez. De forma semelhante, Conde-Agudelo e colaboradores (1999) demonstraram que o uso do tabaco durante a gestação está relacionado negativamente com o desenvolvimento da pré-eclâmpsia. Este efeito é atribuído, pelos autores, à nicotina. Este composto apresenta efeito antioxidante e inibidor da produção de citocinas, inibindo o desenvolvimento da pré-eclâmpsia. O possível efeito benéfico do tabaco na gestação é contraposto pelo seu efeito nocivo relacionado a eventos coronarianos. Dessa forma, é relevante alertar para a necessidade da criação de um maior número de programas com objetivo prevenir ou fazer com que tabagistas parem de fumar (REYNOLDS *et al.*, 2010).

IMC

O excesso ponderal, considerado um fator de risco para o desenvolvimento do diabetes tipo 2 e gestacional, tem aumentado significativamente nos últimos anos em todas as populações (XIONG *et al.*, 2001; LANGER; YOGEV; XENAKIS; BRUSTMAN, 2005; ADA, 2010a). Stuebe e colaboradores (2010) apontam para o efeito de alelos de risco para o diabetes e obesidade em diferentes populações. Entre estes, o alelo *KCNC1*, foi encontrado em pré-gestantes e esta associado a um ganho de massa corporal durante a gestação. Em síntese, um IMC maior era esperado para o grupo DMG, uma vez que o sobrepeso é fator de risco para o desenvolvimento desta patologia (ROSENBERG *et al.*, 2005).

História Familiar de Diabetes e DAC

A presença de familiares de primeiro grau apresentando diabetes (69%) e/ou doença arterial coronariana (38%) foi expressiva no grupo DMG (Tabela 7). Estes dados não estão disponíveis para o grupo CTRL. Rivero e colaboradores (2008) estudaram gestantes com DMG brasileiras e mostraram que neste grupo a presença de sobrepeso/obesidade, dislipidemia e marcadores inflamatórios alterados fazem do DMG um fator de alto risco para o desenvolvimento de DAC. Também está descrito que outros fatores de risco para a DAC, como dislipidemia e estresse oxidativo, apresentam um grande impacto em mulheres diabéticas (LEGATO *et al.*, 2006). Este achado está em concordância com nossos dados.

Uso de Insulina

A terapia com insulina implantada em 30% das gestantes com DMG reflete um subgrupo de pacientes com controle inadequado da glicemia, no qual a terapêutica dietética não foi eficaz (Tabela 7). Nossos achados diferem de outro estudo no qual menciona que acima de 80% de gestantes com diabetes gestacional necessitam de intervenção farmacológica para controlar a glicemia. Dois fármacos que apresentam

igual eficácia no tratamento desse tipo de diabetes são a glibenclamida e a insulina (LANGER; YOGEV; XENAKIS; ROSENN, 2005).

6.2 PARÂMETROS LABORATORIAIS (BIOMARCADORES)

Glucose

Quanto à concentração sérica média de glucose (glicemia), os dois grupos em estudo diferem significativamente (Tabela 7). Este resultado era esperado devido à classificação da amostra ter como elemento central a glicemia. Também confirma a consistência dos grupos em estudo.

Hemoglobina Glicada

A hemoglobina glicada (HbA1C), um marcador do controle glicêmico, sugere que a média das gestantes do grupo DMG está bem controlada. Resultados para este parâmetro não estão disponíveis para o grupo CTRL. Valores médios superiores a 6,5% de HbA1C são esperados para diabéticos com controle inadequado da glicemia (ADA, 2010b; CASTORINO; JOVANOVIC, 2011). Indivíduos que possuem baixo risco de desenvolver diabetes possuem valores médios de HbA1C inferiores a 6,5% (ADA, 2010a). Neste estudo foram identificadas apenas nove gestantes com DMG apresentando concentrações de HbA1C entre 7% e 10%. Gandhi e colaboradores (2008), também encontraram médias de HbA1C consideradas normais em gestantes com DMG (6,11%). Porém, encontraram uma diferença significativa observada nas médias das gestantes DMG quando comparadas ao grupo de gestantes diabéticas tipo 1 (6,75%). Da mesma forma, justificam que valores normais para a concentração de HbA1C estão relacionados a um bom controle glicêmico no segundo e terceiro trimestres de gestação. Além disso, propõem que a HbA1C pode ser uma ferramenta útil para o controle glicêmico em gestantes com diabetes.

Perfil Lipídico

Os resultados do perfil lipídico (colesterol total, HDL-c, LDL-c e triglicérides) foram heterogêneos quando comparados os grupos em estudo (Tabela 7). As concentrações médias de colesterol total e triglicérides foram significativamente maiores no grupo com DMG. Este resultado é esperado, uma vez que o diabetes afeta o metabolismo dos lípidos sendo considerado fator de risco para DAC (ADA, 2010a). Também a elevação das concentrações de colesterol e triglicérides está bem descrita nesta patologia em vários trabalhos publicados (MEYERS-SEIFER; VOHR, 1996; GRUNDY *et al.*, 2006; KING *et al.*, 2009; MARCINKEVAGE; NARAYAN, 2010). Concentrações médias significativamente superiores de colesterol na fração de alta densidade (HDL-colesterol) foram observadas no grupo com DMG, em comparação com gestantes saudáveis (Tabela 7). Esse dado é discordante do usual para os níveis de HDL-colesterol para diabéticas gestacionais (GRUNDY *et al.*, 2006; ADA, 2010a; MARCINKEVAGE; NARAYAN, 2010), mas pode ser um reflexo de melhores hábitos de vida dessas gestantes na tentativa de controlar o diabetes e minimizar o risco para eventos coronarianos.

As concentrações de LDL-colesterol não foram diferentes entre os grupos (Tabela 7). Koukkou e colaboradores (1996) apresentaram resultados divergentes ao observados neste trabalho, reportando concentrações de LDL-colesterol reduzidas em gestantes do grupo DMG. Outros dois estudos que compararam um grupo CTRL e um grupo de DMG também reportam valores de LDL-colesterol menores para o grupo DMG (METZGER *et al.*, 1980; HOLLINGSWORTH; GRUNDY, 1982). O DMG é conhecido por alterar o metabolismo dos lípidos (KNOPP *et al.*, 1980). Propomos que a ausência de diferença na concentração de LDL-colesterol observada neste estudo tenha relação ao bom controle glicêmico e dieta adequada das gestantes com DMG. Também as concentrações de colesterol total e HDL-colesterol maiores no grupo DMG podem interferir na concentração de LDL-colesterol.

Ureia e Creatinina

As concentrações de ureia e creatinina, marcadores da função de filtração glomerular, estão dentro dos valores de referência (0,4-1,2mg/dL) para ambos os

grupos sugerindo que as gestantes não apresentam lesão renal relevante (Tabela 7). Gungor e colaboradores (2006), analisando pacientes turcas com diabetes gestacional, observaram nessas pacientes uma elevação da concentração de creatinina quando comparada a gestantes saudáveis, divergindo de nossos dados. Por outro lado a menor concentração de ureia no grupo DMG pode representar um aporte menor de proteína ou mesmo o efeito do aumento no fluxo urinário, que promovem menor concentração sérica deste marcador, nestas pacientes que estão mais avançadas no período gestacional quando comparadas ao controle (BURTIS *et al.*, 2001).

6.3 ANÁLISES MOLECULARES

O diabetes monogênico do tipo MODY (*Maturity onset diabetes of the Young*) apresenta prevalência elevada para as mutações associadas aos genes da Glucoquinase (MODY-2, GCK) e fator hepatocítico nuclear 1-alfa (MODY-3; HNF-1A). Dependendo da população estudada predomina GCK ou HNF-1A (WINTER; NAKAMURA; HOUSE, 1999).

Considerando que a gestação é um período em que os hormônios liberados promovem uma resistência fisiológica à insulina, é esperado que em alguns pacientes que apresentem variabilidades genéticas associadas ao diabetes, mesmo na forma heterozigótica, produzam manifestação clínica de diabetes. As características clínicas do diabetes gestacional são semelhantes ao diabetes do tipo MODY-2. Este fato estimulou Stoffel e colaboradores (1993) a estudarem a variabilidade genética do gene da GCK em uma população com DMG. Estes autores sugeriram uma prevalência de 5% de mutações da GCK associada ao DMG.

6.3.1 Reação de SSCP e Sequenciamento de DNA

A reação de PCR-SSCP inicialmente descrita por Orita e colaboradores (1989) é utilizada como método de triagem para polimorfismos e mutações. O ensaio tem como fundamento a mobilidade eletroforética em gel de poliacrilamida da fita

simples de DNA, que é dependente de sua conformação. Portanto, variação em uma única base na sequência primária pode produzir padrões de migração eletroforética distintos, decorrente da variação na conformação da fita simples e identificar um padrão diferente do usual, caracterizando uma variação genética (GLAVAC; DEAN, 1993; HAYASHI; YANDELL, 1993).

Os amplicons utilizados neste trabalho são de tamanhos pequenos (242 a 505pb), para não sair do limite de sensibilidade da técnica de triagem de PCR-SSCP. Apenas um amplicon com 505pb foi produzido. Este teria sua sensibilidade reduzida se os géis utilizados neste trabalho não estivessem com o pH ácido.

O método de PCR-SSCP apresenta eficiência de aproximadamente 90% para amplicons com tamanhos de 100-300pb e de 67% para fragmentos de 300-450pb (HAYASHI, 1991). Quando o gel é preparado em pH ácido, a sensibilidade da técnica é aumentada. Géis ácidos apresentam uma boa separação das fitas simples em fragmentos de DNA com tamanho acima de 800pb. Variáveis como a concentração do gel de poliacrilamida, o pH do meio e do tampão, a presença de aditivos como glicerol e polietilenoglicol, a temperatura de eletroforese, a voltagem da corrida afetam a sensibilidade do método (KUKITA *et al.*, 1997). Portanto, as condições de ensaio de PCR-SSCP foram otimizadas para cada amplicon estudado, como mostrado nas Figuras 10, 13, 16, 19, 22, 25, 28, 31, 34, 37, 40, 43, 46 e 49.

Neste trabalho, foram testados para cada amplicon no mínimo três condições de PCR-SSCP. Géis com pH ácido, géis com pH básico e a presença de glicerol nas concentrações de 5 a 10% no gel. A formulação do gel com pH ácido, obtido com solução de tris-hidroximetilamaminometano com pH 3,66 foi a que melhor discriminou os padrões de bandas para todos os amplicons em estudo. Definido esta condição, foram ensaiadas diferentes concentrações de poliacrilamida na proporção de 29:1 em relação à bisacrilamida (3,3% de bisacrilamida). A adição de glicerol no gel não melhorou a definição de bandas ou detecção de SNPs, em contradição com o preconizado por Kukita e colaboradores (1997).

A concentração de poliacrilamida do gel não apresentou associação com o tamanho do amplicon no critério de definição de bandas (Tabela 6). Ou seja, géis a 10% para o Exon5e6 (amplicon 505pb; Figura 28) e Exon3 (amplicon 242pb; Figura 22) apresentaram a mesma eficiência quanto à discriminação do padrão eletroforético.

A técnica de PCR-SSCP apresenta limitações conhecidas. Algumas sequências de DNA (Figura 26 e 38) não apresentaram alterações conformacionais de forma a ser detectada por eletroforese em gel de poliacrilamida, independente dos cuidados utilizados para otimizar o ensaio. Esse fato pode estar atribuído a uma limitação na detecção da mudança conformacional da fita simples mutada, especialmente quando se tem uma mutação localizada nas extremidades da fita. Quando mutações ocorrem em regiões centrais, há uma maior chance de essa mutação promover uma mudança conformacional na fita simples e alterar o perfil eletroforético (FAN *et al.*, 1993).

Concluimos que para cada amplicon, independente do seu tamanho, diferentes concentrações de géis devem ser testadas para otimizar a discriminação das bandas. As reações de sequenciamento apresentadas, embora discriminadoras, não apresentaram, no geral, sequências com bases de elevada qualidade na sua totalidade (Figuras 11, 14, 17, 19, 23, 26, 29, 32, 35, 38, 41, 44, 47, 50). Portanto, recomendamos que novos estudos para aperfeiçoar a reação de sequenciamento sejam realizados, testando novas condições de ensaio.

6.3.2 Sítios sem alteração

Os amplicons para os exons 1 (A1, A2, A3), 2, 3, 7, 8 e 10 (A1, A3 e A4) não apresentaram neste trabalho variantes identificadas por PCR-SSCP ou reação de sequenciamento de DNA. Este achado pode sugerir que estes sítios não sejam polimórficos na população em estudo. Em outros estudos, em particular, quando são seccionadas amostras de indivíduos ou familiares com MODY-2 a frequência na detecção de variantes é expressivamente superior (Tabela 2).

6.3.3 Sítios apresentando variabilidade

Amplicon do Exon4

Este amplicon não mostrou para as amostras em estudo alterações no padrão de PCR-SSCP (Figura 25). No entanto foi detectado na reação de sequenciamento

de DNA um polimorfismo (Figura 26). Uma substituição do tipo A→G (transição) na posição c.43331 do Intron3, região que flanqueia o Exon4 (Figura 51). A frequência estimada para esta variação na população em estudo foi de 0,5%. Não foram encontradas no *SNP Bank* referências a esta variação, bem como na literatura pesquisada (Tabela 2). Postulamos que esta variante não está descrita, contudo a baixa frequência não permite outras análises. Esta paciente, amostra nº 86CTRL, pertence ao grupo controle e não apresenta nenhuma característica fenotípica ou laboratorial alterada.

Amplicon dos Exons5e6

Na região amplificada que compreende os exons 5 e 6 e regiões flanqueadoras foi identificada um único polimorfismo (transição), c.44702T>C (Figura 51). Quando comparado com os SNPs do *SNP Bank*, observou-se que já estava descrito e referenciado com a designação de rs2268574 e localizada na região do Intro6. Este sítio polimórfico, identificado por PCR-SSCP e sequenciamento de DNA, foi o que apresentou maior número de indivíduos (10) com a mutação descrita. Sete gestantes apresentaram a forma heterozigótica (T/C) e 3 a forma homozigótica rara (CC). Todas as variantes foram detectadas apenas no grupo CTRL e a frequência do alelo raro (C) foi estimada em 0,8% (95% de intervalo de confiança: 0-2%).

Uma análise de regressão múltipla (*forward stepwise*) utilizando os genótipos do polimorfismo rs2268574 (códigos TT=1, TC=2 e CC=3) como variável dependente e as variáveis independentes, glicemia, ureia, creatinina, ácido úrico, colesterol, HDL-colesterol, LDL-colesterol e triglicérides, apresentou apenas a variável ácido úrico como significativa no modelo (beta=0,33; P=0,001). A análise do comportamento da concentração do ácido úrico entre os genótipos é apresentada em detalhes no item 6.3.4.

Amplicon do Exon9

O amplicon do Exon9 e regiões flanqueadoras, não apresentaram alterações no perfil de PCR-SSCP (Figura 37). No entanto, duas amostras com variações no

mesmo sítio polimórfico foram identificadas através do sequenciamento de DNA (Figura 38).

A variação foi caracterizada como a transição c.48935C>T, no Intron9 já caracterizada no *SNP Bank* com a designação rs2908274 (Figura 51). A gestante codificada com o nº 86CTRL apresentou o perfil heterozigótico e no grupo DMG foi detectado o homozigoto raro (amostra nº 06DGM). Não foram encontradas na literatura associações deste polimorfismo com características clínicas.

Amplicon 2 do Exon10

O amplicon 2 do Exon10, embora esteja localizado em um exon, encontra-se após um codon de parada (*stop codon*) em uma região de possível *splicing* (IYNEDJIAN, 1993). Neste sítio foram identificadas duas amostras com variações em homozigose detectadas por PCR-SSCP (Figura 43) e identificadas por sequenciamento de DNA (Figura 44) como a mutação c.49620G>A. Esta mutação já está descrita e caracterizada como rs13306388 no *SNP Bank* (Figura 51) e apresenta frequência na população em estudo estimada em 1%. As gestantes que apresentaram esta variação são do grupo DMG (amostras nº 58DMG e nº 67DMG). A baixa frequência populacional não permite análises de associação.

6.3.4 Análise com biomarcadores

A concentração de ácido úrico foi o único parâmetro laboratorial a apresentar associação com um polimorfismo neste estudo (Figura 52).

As concentrações de ácido úrico sérico não foram significativamente diferentes entre os genótipos TT e TC ($P=0,69$) ou TC e CC ($P=0,21$). No entanto, genótipos CC e TT apresentaram concentrações significativamente diferentes de ácido úrico ($P=0,02$). Todas as gestantes que apresentaram este polimorfismo pertencem ao grupo controle. Não é possível descartar que este achado seja um artefato decorrente do tamanho amostral muito díspare entre os genótipos. No entanto, os resultados de análise de regressão significativos recomendam que o

resultado seja apresentado para que em outros estudos com maior tamanho amostral este achado possa ser validado ou descartado.

6.4 CONSIDERAÇÕES FINAIS E FUTURAS

Os polimorfismos identificados neste trabalho não apresentaram informações de associação com características clínicas. Esse fato pode ser decorrente dos polimorfismos estarem localizadas em regiões que não codificam a proteína (introns e possível região de *splicing*), não alterando a atividade biológica da GCK.

O gene da Glucoquinase não apresentou um sítio polimórfico de elevada frequência (*hotspot*) que permita ser utilizado como marcador. O padrão de diferentes mutações observados no projeto em tela é similar ao descrito na literatura.

Considerando as complicações para a gestante, feto e recém-nato associadas ao DMG, ampliar o conhecimento e a busca de marcadores para a patologia é relevante e atual. É neste contexto que se insere esta pesquisa. Ao nosso conhecimento, este é o primeiro trabalho que busca marcadores moleculares associados ao gene da Glucoquinase em uma população brasileira.

7 CONCLUSÕES

- Pacientes com diabetes gestacional apresentaram maior IMC, e concentrações séricas de glicemia de jejum, colesterol total, HDL-colesterol e ácido úrico quando comparado às gestantes saudáveis pertencentes ao grupo controle.
- De um total de 200 amostras utilizadas no presente estudo, 13 amostras (6,5%) apresentaram polimorfismos em regiões diferentes, confirmando que o gene Glucoquinase é polimórfico.
- Três diferentes variações de um único nucleotídeo foram observadas na amostra, e já foram descritas na literatura, rs2268574 (intron6), rs2908274 (Intron9) e rs13306388 (amplicon 2 do Exon10).
- Uma variação não descrita foi identificada na posição c.43441A>G localizada no Intron3.
- O genótipo CC da variação rs2268574 (Intron6) foi associado com concentração elevada de ácido úrico sérico.
- Não foi observada uma variação do tipo “hotspot” nas amostras pertencentes ao presente estudo.

REFERÊNCIAS

- ADA. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. **Diabetes Care**. v. 33 Suppl 1, p. S62-9. 2010a.
- ADA. Executive summary: Standards of medical care in diabetes-2010. **Diabetes Care**. v. 33 Suppl 1, p. S4-10. 2010b.
- AGIUS, L.; STUBBS, M. Investigation of the mechanism by which glucose analogues cause translocation of glucokinase in hepatocytes: evidence for two glucose binding sites. **Biochem J**. v. 346 Pt 2, p. 413-21. 2000.
- ARDEN, C. *et al.* Glucokinase Is an Integral Component of the Insulin Granules in Glucose-Responsive Insulin Secretory Cells and Does Not Translocate During Glucose Stimulation. **Diabetes**. v. 53, p. 2346-2352. 2004.
- BALTRUSCH, S.; TIEDGE, M. Glucokinase Regulatory Network in Pancreatic β -Cells and Liver. **Diabetes**. v. 55, n.2, p. 55-64. 2006.
- BARBETTI, F. *et al.* Opposite clinical phenotypes of glucokinase disease: Description of a novel activating mutation and contiguous inactivating mutations in human glucokinase (GCK) gene. **Mol Endocrinol**. v. 23, n.12, p. 1983-9. 2009.
- BARRIO, R. *et al.* Nine novel mutations in maturity-onset diabetes of the young (MODY) candidate genes in 22 Spanish families. **J Clin Endocrinol Metab**. v. 87, n.6, p. 2532-9. 2002.
- BARROSO, I. Genetics of Type 2 diabetes. **Diabet Med**. v. 22, n.5, p. 517-35. 2005.
- BEN-HAROUSH, A.; YOGEV, Y.; HOD, M. Epidemiology of gestational diabetes mellitus and its association with Type 2 diabetes. **Diabet Med**. v. 21, n.2, p. 103-13. 2004.
- BOUTIN, P. *et al.* Automated fluorescence-based screening for mutation by SSCP: use of universal M13 dye primers for labeling and detection. **Biotechniques**. v. 23, n.3, p. 358-62. 1997.
- BUCHANAN, T. A.; XIANG, A. H. Gestational diabetes mellitus. **J Clin Invest**. v. 115, n.3, p. 485-91. 2005.
- BURTIS, C. A. *et al.* **Tietz fundamentals of clinical chemistry**. 5th. Philadelphia: W.B. Saunders, 2001.
- CASTORINO, K.; JOVANOVIĆ, L. Pregnancy and diabetes management: advances and controversies. **Clin Chem**. v. 57, n.2, p. 221-30. 2011.
- CESSE, E. A. *et al.* [Mortality trends by the diabetes mellitus in Brazil: 1950 to 2000]. **Arq Bras Endocrinol Metabol**. v. 53, n.6, p. 760-6. 2009.

CHAKRAVARTHY, M. V.; SEMENKOVICH, C. F. The ABCs of beta-cell dysfunction in type 2 diabetes. **Nat Med**. v. 13, n.3, p. 241-2. 2007.

CONDE-AGUDELO, A. *et al.* Cigarette smoking during pregnancy and risk of preeclampsia: a systematic review. **Am J Obstet Gynecol**. v. 181, n.4, p. 1026-35. 1999.

CONTRERAS, K. R.; KOMINIAREK, M. A.; ZOLLINGER, T. W. The impact of tobacco smoking on perinatal outcome among patients with gestational diabetes. **J Perinatol**. v. 30, n.5, p. 319-23. 2010.

COUSTAN, D. R. *et al.* Maternal age and screening for gestational diabetes: a population-based study. **Obstet Gynecol**. v. 73, n.4, p. 557-61. 1989.

DATASUS. Número de Diabéticos, Hipertensos e Diabéticos com Hipertensão por sexo, tipo e risco. Disponível em: <http://hiperdia.datasus.gov.br/hiperelhiperrisco.asp>. Acesso em: 13/01/2011.

DE LA IGLESIA, N. *et al.* Glucokinase regulatory protein is essential for the proper subcellular localisation of liver glucokinase. **FEBS Letters**. v. 456, n.2, p. 332-338. 1999.

DIB, S. A. [Heterogeneity of type 1 diabetes mellitus]. **Arq Bras Endocrinol Metabol**. v. 52, n.2, p. 205-18. 2008.

DODE, M. A.; SANTOS IDA, S. [Risk factors for gestational diabetes mellitus in the birth cohort in Pelotas, Rio Grande do Sul State, Brazil, 2004]. **Cad Saude Publica**. v. 25, n.5, p. 1141-52. 2009.

DOOLEY, S. L.; METZGER, B. E.; CHO, N. H. Gestational diabetes mellitus. Influence of race on disease prevalence and perinatal outcome in a U.S. population. **Diabetes**. v. 40 Suppl 2, p. 25-9. 1991.

ELLARD, S. *et al.* A high prevalence of glucokinase mutations in gestational diabetic subjects selected by clinical criteria. **Diabetologia**. v. 43, n.2, p. 250-3. 2000.

ENQUOBAHRIE, D. A. *et al.* Early pregnancy lipid concentrations and the risk of gestational diabetes mellitus. **Diabetes Res Clin Pract**. v. 70, n.2, p. 134-42. 2005.

FAN, E. *et al.* Limitations in the use of SSCP analysis. **Mutat Res**. v. 288, n.1, p. 85-92. 1993.

FERRARA, A. Increasing prevalence of gestational diabetes mellitus: a public health perspective. **Diabetes Care**. v. 30 Suppl 2, p. S141-6. 2007.

FORCE, U. S. P. S. T. Screening for gestational diabetes mellitus: recommendations and rationale. **Obstet Gynecol**. v. 101, n.2, p. 393-5. 2003.

FOWLER, M. J. Classification of Diabetes: Not All Hyperglycemia is the Same. **Clinical Diabetes**. v. 25, n.2, p. 74-76. 2007.

GALAN, M. *et al.* Effects of novel maturity-onset diabetes of the young (MODY)-associated mutations on glucokinase activity and protein stability. **Biochem J.** v. 393, n.Pt 1, p. 389-96. 2006.

GANDHI, R. A. *et al.* HbA1c during pregnancy: its relationship to meal related glycaemia and neonatal birth weight in patients with diabetes. **Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.** v. 138, n.1, p. 45-8. 2008.

GIDH-JAIN, M. *et al.* Glucokinase mutations associated with non-insulin-dependent (type 2) diabetes mellitus have decreased enzymatic activity: implications for structure/function relationships. **Proc Natl Acad Sci U S A.** v. 90, n.5, p. 1932-6. 1993.

GLAVAC, D.; DEAN, M. Optimization of the single-strand conformation polymorphism (SSCP) technique for detection of point mutations. **Hum Mutat.** v. 2, n.5, p. 404-14. 1993.

GLOYN, A. L. Glucokinase (GCK) mutations in hyper- and hypoglycemia: maturity-onset diabetes of the young, permanent neonatal diabetes, and hyperinsulinemia of infancy. **Hum Mutat.** v. 22, n.5, p. 353-62. 2003.

GREELEY, S. A. *et al.* Update in neonatal diabetes. **Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes.** v. 17, n.1, p. 13-9. 2010.

GRUNDY, S. M. *et al.* Diagnosis and management of the metabolic syndrome: an American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute scientific statement. **Curr Opin Cardiol.** v. 21, n.1, p. 1-6. 2006.

GUNGOR, E. S.; DANISMAN, N.; MOLLAMAHMUTOGLU, L. Relationship between serum uric acid, creatinine, albumin and gestational diabetes mellitus. **Clin Chem Lab Med.** v. 44, n.8, p. 974-7. 2006.

HATTERSLEY, A. T. *et al.* Mutations in the glucokinase gene of the fetus result in reduced birth weight. **Nat Genet.** v. 19, n.3, p. 268-70. 1998.

HAYASHI, K. PCR-SSCP: a simple and sensitive method for detection of mutations in the genomic DNA. **PCR Methods Appl.** v. 1, n.1, p. 34-8. 1991.

HAYASHI, K.; YANDELL, D. W. How sensitive is PCR-SSCP? **Hum Mutat.** v. 2, n.5, p. 338-46. 1993.

HOLLINGSWORTH, D. R.; GRUNDY, S. M. Pregnancy-associated hypertriglyceridemia in normal and diabetic women. Differences in insulin-dependent, non-insulin-dependent, and gestational diabetes. **Diabetes.** v. 31, n.12, p. 1092-7. 1982.

HOLMKVIST, J. *et al.* Common variants in maturity-onset diabetes of the young genes and future risk of type 2 diabetes. **Diabetes.** v. 57, n.6, p. 1738-44. 2008.

LYNEDJIAN, P. B. Mammalian glucokinase and its gene. **Biochem J.** v. 293 (Pt 1), p. 1-13. 1993.

JOHANSEN, A. *et al.* Half of clinically defined maturity-onset diabetes of the young patients in Denmark do not have mutations in HNF4A, GCK, and TCF1. **J Clin Endocrinol Metab.** v. 90, n.8, p. 4607-14. 2005.

KHALIL, R. *et al.* Screening of mutations in the GCK gene in Jordanian maturity-onset diabetes of the young type 2 (MODY2) patients. **Genet Mol Res.** v. 8, n.2, p. 500-6. 2009.

KIM, C.; NEWTON, K. M.; KNOPP, R. H. Gestational diabetes and the incidence of type 2 diabetes: a systematic review. **Diabetes Care.** v. 25, n.10, p. 1862-8. 2002.

KING, K. B. *et al.* Is a history of gestational diabetes related to risk factors for coronary heart disease? **Res Nurs Health.** v. 32, n.3, p. 298-306. 2009.

KNOPP, R. H. *et al.* Relationships of lipoprotein lipids to mild fasting hyperglycemia and diabetes in pregnancy. **Diabetes Care.** v. 3, n.3, p. 416-20. 1980.

KOUKKOU, E.; WATTS, G. F.; LOWY, C. Serum lipid, lipoprotein and apolipoprotein changes in gestational diabetes mellitus: a cross-sectional and prospective study. **J Clin Pathol.** v. 49, n.8, p. 634-7. 1996.

KUKITA, Y. *et al.* SSCP analysis of long DNA fragments in low pH gel. **Hum Mutat.** v. 10, n.5, p. 400-7. 1997.

LANGER, O. *et al.* Overweight and obese in gestational diabetes: the impact on pregnancy outcome. **Am J Obstet Gynecol.** v. 192, n.6, p. 1768-76. 2005.

LANGER, O. *et al.* Insulin and glyburide therapy: dosage, severity level of gestational diabetes, and pregnancy outcome. **Am J Obstet Gynecol.** v. 192, n.1, p. 134-9. 2005.

LEGATO, M. J. *et al.* Gender-specific care of the patient with diabetes: review and recommendations. **Gend Med.** v. 3, n.2, p. 131-58. 2006.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger principles of biochemistry.** 5th. New York: W.H. Freeman, 2008.

LEHTO, M. *et al.* High frequency of mutations in MODY and mitochondrial genes in Scandinavian patients with familial early-onset diabetes. **Diabetologia.** v. 42, n.9, p. 1131-7. 1999.

LINDNER, T. H.; COCKBURN, B. N.; BELL, G. I. Molecular genetics of MODY in Germany. **Diabetologia.** v. 42, n.1, p. 121-3. 1999.

LINNE, Y.; BARKELING, B.; ROSSNER, S. Natural course of gestational diabetes mellitus: long term follow up of women in the SPAWN study. **BJOG.** v. 109, n.11, p. 1227-31. 2002.

MAGNUSON, M. A.; SHELTON, K. D. An alternate promoter in the glucokinase gene is active in the pancreatic beta cell. **J Biol Chem.** v. 264, n.27, p. 15936-42. 1989.

MAHALINGAM, B. *et al.* Structural model of human glucokinase in complex with glucose and ATP: implications for the mutants that cause hypo- and hyperglycemia. **Diabetes.** v. 48, n.9, p. 1698-705. 1999.

MANTOVANI, V. *et al.* Identification of eight novel glucokinase mutations in Italian children with maturity-onset diabetes of the young. **Hum Mutat.** v. 22, n.4, p. 338. 2003.

MARCINKEVAGE, J. A.; NARAYAN, K. M. Gestational diabetes mellitus: Taking it to heart. **Prim Care Diabetes.** v. p. 2010.

MARKS, S. D.; COUCH, R. M. Identification of two new mutations in the glucokinase gene that result in maturity-onset diabetes of the young. **Diabetes Care.** v. 33, n.7, p. e94. 2010.

MARSHALL, A. L. *et al.* Type 1 diabetes mellitus in childhood: a matched case control study in Lancashire and Cumbria, UK. **Diabet Med.** v. 21, n.9, p. 1035-40. 2004.

MATSCHINSKY, F. M.; ELLERMAN, J. E. Metabolism of glucose in the islets of Langerhans. **J Biol Chem.** v. 243, n.10, p. 2730-6. 1968.

MATSCHINSKY, F. M. *et al.* The network of glucokinase-expressing cells in glucose homeostasis and the potential of glucokinase activators for diabetes therapy. **Diabetes.** v. 55, n.1, p. 1-12. 2006.

METZGER, B. E. *et al.* Summary and recommendations of the Fifth International Workshop-Conference on Gestational Diabetes Mellitus. **Diabetes Care.** v. 30 Suppl 2, p. S251-60. 2007.

METZGER, B. E. *et al.* Effects of gestational diabetes on diurnal profiles of plasma glucose, lipids, and individual amino acids. **Diabetes Care.** v. 3, n.3, p. 402-9. 1980.

MEYER, W. J. *et al.* Early gestational glucose screening and gestational diabetes. **J Reprod Med.** v. 41, n.9, p. 675-9. 1996.

MEYERS-SEIFER, C. H.; VOHR, B. R. Lipid levels in former gestational diabetic mothers. **Diabetes Care.** v. 19, n.12, p. 1351-6. 1996.

MILLER, E. C. *et al.* The risk of adverse pregnancy outcomes is increased in preeclamptic women who smoke compared with nonpreeclamptic women who do not smoke. **Am J Obstet Gynecol.** v. 203, n.4, p. 334 e1-8. 2010.

MONTGOMERY, S. M.; EKBOM, A. Smoking during pregnancy and diabetes mellitus in a British longitudinal birth cohort. **BMJ.** v. 324, n.7328, p. 26-7. 2002.

NG, S. P.; ZELIKOFF, J. T. Smoking during pregnancy: subsequent effects on offspring immune competence and disease vulnerability in later life. **Reprod Toxicol.** v. 23, n.3, p. 428-37. 2007.

NISHI, S. *et al.* Human pancreatic beta-cell glucokinase: cDNA sequence and localization of the polymorphic gene to chromosome 7, band p 13. **Diabetologia.** v. 35, n.8, p. 743-7. 1992.

NJOLSTAD, P. R. *et al.* Permanent neonatal diabetes caused by glucokinase deficiency: inborn error of the glucose-insulin signaling pathway. **Diabetes.** v. 52, n.11, p. 2854-60. 2003.

ORITA, M. *et al.* Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. **Proc Natl Acad Sci U S A.** v. 86, n.8, p. 2766-70. 1989.

PEDELINI, L. *et al.* Structure-function analysis of the alpha5 and the alpha13 helices of human glucokinase: description of two novel activating mutations. **Protein Science.** v. 14, n.8, p. 2080-2086. 2005.

PRIDJIAN, G.; BENJAMIN, T. D. Update on gestational diabetes. **Obstet Gynecol Clin North Am.** v. 37, n.2, p. 255-67. 2010.

REYNOLDS, K. *et al.* Prevalence of Tobacco Use and Association between Cardiometabolic Risk Factors and Cigarette Smoking in Youth with Type 1 or Type 2 Diabetes Mellitus. **J Pediatr.** v. p. 2010.

RIVERO, K. *et al.* Prevalence of the impaired glucose metabolism and its association with risk factors for coronary artery disease in women with gestational diabetes. **Diabetes Res Clin Pract.** v. 79, n.3, p. 433-7. 2008.

ROSE, C. S. *et al.* A -30G>A polymorphism of the beta-cell-specific glucokinase promoter associates with hyperglycemia in the general population of whites. **Diabetes.** v. 54, n.10, p. 3026-31. 2005.

ROSENBERG, T. J. *et al.* Maternal obesity and diabetes as risk factors for adverse pregnancy outcomes: differences among 4 racial/ethnic groups. **Am J Public Health.** v. 95, n.9, p. 1545-51. 2005.

RUZZO, A.; ANDREONI, F.; MAGNANI, M. Structure of the human hexokinase type I gene and nucleotide sequence of the 5' flanking region. **Biochem J.**, v. v. 331, p. p. 607-613. 1998.

SANTOS, I. C. *et al.* The glucokinase gene promoter polymorphism -30G>A (rs1799884) is associated with fasting glucose in healthy pregnant women but not with gestational diabetes. **Clin Chim Acta.** v. p. 2010.

SBD. Diretrizes. Tratamento e acompanhamento do Diabetes mellitus. **Sociedade Brasileira de Diabetes.** v. p. 2007.

- SESHIAH, V. *et al.* Gestational diabetes mellitus manifests in all trimesters of pregnancy. **Diabetes Res Clin Pract.** v. 77, n.3, p. 482-4. 2007.
- SESHIAH, V. *et al.* Detection and care of women with gestational diabetes mellitus from early weeks of pregnancy results in birth weight of newborn babies appropriate for gestational age. **Diabetes Res Clin Pract.** v. 80, n.2, p. 199-202. 2008.
- SHAAT, N. *et al.* Common variants in MODY genes increase the risk of gestational diabetes mellitus. **Diabetologia.** v. 49, n.7, p. 1545-51. 2006.
- SOUZA, R. L. *et al.* Four new mutations in the BCHE gene of human butyrylcholinesterase in a Brazilian blood donor sample. **Mol Genet Metab.** v. 84, n.4, p. 349-53. 2005.
- STAGE, E.; RONNEBY, H.; DAMM, P. Lifestyle change after gestational diabetes. **Diabetes Res Clin Pract.** v. 63, n.1, p. 67-72. 2004.
- STENE, L. C. *et al.* Perinatal factors and development of islet autoimmunity in early childhood: the diabetes autoimmunity study in the young. **Am J Epidemiol.** v. 160, n.1, p. 3-10. 2004.
- STOFFEL, M. *et al.* Identification of glucokinase mutations in subjects with gestational diabetes mellitus. **Diabetes.** v. 42, n.6, p. 937-40. 1993.
- STOFFEL, M. *et al.* Human glucokinase gene: isolation, characterization, and identification of two missense mutations linked to early-onset non-insulin-dependent (type 2) diabetes mellitus. **Proc Natl Acad Sci U S A.** v. 89, n.16, p. 7698-702. 1992.
- STUEBE, A. M. *et al.* Obesity and diabetes genetic variants associated with gestational weight gain. **Am J Obstet Gynecol.** v. 203, n.3, p. 283 e1-17. 2010.
- TAKEDA, J. *et al.* Structure/function studies of human beta-cell glucokinase. Enzymatic properties of a sequence polymorphism, mutations associated with diabetes, and other site-directed mutants. **J Biol Chem.** v. 268, n.20, p. 15200-4. 1993.
- TINTO, N. *et al.* Glucokinase gene mutations: structural and genotype-phenotype analyses in MODY children from South Italy. **PLoS ONE.** v. 3, n.4, p. e1870. 2008.
- TURKKAHRAMAN, D. *et al.* Permanent neonatal diabetes mellitus caused by a novel homozygous (T168A) glucokinase (GCK) mutation: initial response to oral sulphonylurea therapy. **J Pediatr.** v. 153, n.1, p. 122-6. 2008.
- VAN SCHAFTINGEN, E.; VEIGA-DA-CUNHA, M.; NICULESCU, L. The regulatory protein of glucokinase. **Biochem Soc Trans.** v. 25, n.1, p. 136-40. 1997.
- WATANABE, R. M. *et al.* Genetics of gestational diabetes mellitus and type 2 diabetes. **Diabetes Care.** v. 30 Suppl 2, p. S134-40. 2007.

WEEDON, M. N. *et al.* Genetic regulation of birth weight and fasting glucose by a common polymorphism in the islet cell promoter of the glucokinase gene. **Diabetes**. v. 54, n.2, p. 576-81. 2005.

WILD, S. *et al.* Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. **Diabetes Care**. v. 27, n.5, p. 1047-53. 2004.

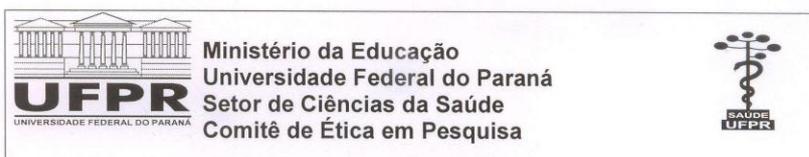
WINTER, W. E.; NAKAMURA, M.; HOUSE, D. V. Monogenic diabetes mellitus in youth. The MODY syndromes. **Endocrinol Metab Clin North Am**. v. 28, n.4, p. 765-85. 1999.

XIONG, X. *et al.* Gestational diabetes mellitus: prevalence, risk factors, maternal and infant outcomes. **Int J Gynaecol Obstet**. v. 75, n.3, p. 221-8. 2001.

ZELENT, D. *et al.* A Glucose Sensor Role for Glucokinase in Anterior Pituitary Cells. **Diabetes**. v. 55, p. 1923-1929. 2006.

ZOUALI, H. *et al.* Linkage analysis and molecular scanning of glucokinase gene in NIDDM families. **Diabetes**. v. 42, n.9, p. 1238-45. 1993.

ANEXO I



Curitiba, 15 de julho de 2010.

Ilmo (a) Sr. (a)
Henrique Ravanhol Frigeri

Nesta

Prezado(a) Pesquisador(a),

Comunicamos que o Projeto de Pesquisa intitulado “**Variabilidade do gene da glucoquinase no diabetes gestacional e associações com polimorfismos dos genes RAGE, obestatina e grelina**” está de acordo com as normas éticas estabelecidas pela Resolução CNS 196/96, foi analisado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Setor de Ciências da Saúde da UFPR, em reunião realizada no dia 25 de maio de 2010 e apresentou pendência(s). Pendência(s) apresentada(s), documento(s) analisado(s) e projeto aprovado em 14 de julho de 2010.

Registro CEP/SD: 925.050.10.05 CAAE: 1925.0.000.091-10

Conforme a Resolução CNS 196/96, solicitamos que sejam apresentados a este CEP, relatórios sobre o andamento da pesquisa, bem como informações relativas às modificações do protocolo, cancelamento, encerramento e destino dos conhecimentos obtidos.

Data para entrega do relatório final ou parcial: 17/01/2011.

Atenciosamente

Prof.ª Dr.ª Liliansa Maria Labronici
Coordenadora do Comitê de Ética em
Pesquisa do Setor de Ciências da Saúde

Prof.ª Dr.ª Liliansa Maria Labronici
Coordenadora do Comitê de Ética
em Pesquisa - SD/UFPR

ENTREGUE
09/08/2010

Rua Padre Camargo, 280 – Alto da Glória – Curitiba-PR – CEP 80060-240
Fone: (41)3360-7259 – e-mail: cometica.saude@ufpr.br



ANEXO II

Método de extração de DNA genômico.

Modificações no método de Lahiri e Nurberger, 1991.

Etapas	Ações
1	Coletar de 3 a 5 mL de sangue total em tubo de EDTA Centrifugar o tubo de sangue por 10 min a 4000 rpm Remover o plasma Separar o creme leucocitário (<i>buffy coat</i>)
2	Em tudo Eppendorf colocar 900 μ L de TKM1 contendo NP-40 (ou Triton X-100) a 2,5% Adicionar 250 μ L do <i>buffy coat</i> Homogeneizar em vortex Centrifugar por 5 min a 10000 rpm Desprezar quase todo o sobrenadante, deixando aproximadamente 500 μ L
3	*Completar o volume do tubo com TKM1 (sem NP-40 ou Triton X-100) Homogeneizar em vortex Centrifugar por 5 min a 10000 rpm Desprezar todo o sobrenadante * Repetir esta etapa até que o sedimento esteja limpo
4	Completar o volume do tubo com água ultra pura Homogeneizar em vortex Centrifugar por 5 min a 13000 rpm Desprezar todo o sobrenadante
5	Adicionar ao sedimento: 40 μ L de tampão de proteinase K 20 μ L de proteinase K 10 μ L de SDS 20% 120 μ L de água ultra pura Homogeneizar em vortex Colocar em banho-maria 65 °C por 40 min Em 20 min de banho-maria, homogeneizar novamente os tubos em vortex
6	Tirar os tubos do banho-maria e esfriar em temperatura ambiente Adicionar 100 μ L de Cloreto de Sódio 6M Homogeneizar Centrifugar por 10 min a 13000 rpm
7	Transferir o SOBRENADANTE para um novo tubo Eppendorf Adicionar 700 μ L de etanol absoluto Homogeneizar por inversão Centrifugar por 2 min a 13000 rpm Desprezar sobrenadante
8	Adicionar 700 μ L de etanol 70% Homogeneizar em vortex Centrifugar por 2 min a 13000 rpm Desprezar sobrenadante Deixar os tubos secar em temperatura ambiente, estufa a 37 °C, ou em bloco de aquecimento a 65 °C
9	Depois de seco, reconstituir com 80 a 100 μ L de água ultra pura Homogeneizar bem em vortex Deixar 1 hora a 65 °C