

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

MARCIANE WELTER

VARIABILIDADE DE GENES E BIOMARCADORES DE CONTROLE GLICÊMICO
ASSOCIADOS AO *DIABETES MELLITUS* TIPO 2

CURITIBA
2014

MARCIANE WELTER

VARIABILIDADE DE GENES E BIOMARCADORES DE CONTROLE GLICÊMICO
ASSOCIADOS AO *DIABETES MELLITUS* TIPO 2

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Concentração em Análises Clínicas, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Profa. Dra. Fabiane G. de Moraes Rego

Co-orientadores: Prof. Dr. Geraldo Picheth
Profa. Dra. Dayane Alberton

CURITIBA
2014

Welter, Marciane

Variabilidade de genes e biomarcadores de controle glicêmico associados ao *Diabetes Mellitus* tipo 2 / Marciane Welter – Curitiba, 2014.

121f. : il (algumas color.) ; 30 cm

Orientadora: Professora Dra. Fabiane G. de Moraes Rego

Coorientador: Professor Dr. Geraldo Picheth

Coorientadora: Professora Dra. Dayane Alberton

Dissertação (mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, 2014.

Inclui bibliografia

1. Diabetes tipo 2. 2. Polimorfismo. 3. Genes. I. Rego, Fabiane G. de Moraes. II. Picheth, Geraldo. III. Alberton, Dayane. IV. Universidade Federal do Paraná. V. Título.

CDD 616.462

TERMO DE APROVAÇÃO

MARCIANE WELTER

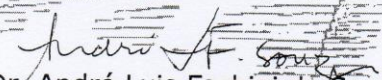
Título: **"VARIABILIDADE DE GENES E BIOMARCADORES DE CONTROLE GLICÊMICO ASSOCIADOS AO DIABETES MELLITUS TIPO 2"**

Dissertação aprovada como requisito parcial para a obtenção de grau de Mestre, no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal do Paraná, área de concentração: Análises Clínicas.


Profª. Dra. Fabiane Gomes de Moraes Rego
Orientadora


Profª. Dra. Dayane Alberton
Co-orientadora


Profª. Dra. Karin Braun Prado
Universidade Federal do Paraná


Prof. Dr. André Luis Fachini de Souza
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Catarinense

Curitiba, 26 de fevereiro de 2014.

Aos meus pais
Lucena e Tateo

AGRADECIMENTOS

À Deus pela vida saudável, benção e proteção.

Aos Professores Fabiane Gomes de Moraes Rego e Geraldo Picheth, pela orientação, acolhida, apoio e incentivos e ajuda no término desta dissertação.

À Professora Dayane Alberton, pela confiança, ajuda e conselhos.

Aos colegas Henrique Ravanhol Frigeri, Izabella Castilhos Ribeiro dos Santos Weiss, Mauren Isfer, Claudia Dib da Costa, Kátia Cristina Boritza, João Paulo Lobo Junior e Waldemar Volanski pela amizade, companheirismo e colaboração na realização desta dissertação.

Ao Professor Emanuel Maltempi de Souza por permitir o uso do laboratório de fixação de Nitrogênio do Departamento de Bioquímica da UFPR para a realização do experimento envolvido nesta dissertação.

Aos colegas de mestrado do programa de pós-graduação em Ciências Farmacêuticas UFPR que iniciaram em 2012 junto comigo, pelo apoio, incentivo e companheirismo.

Aos meus pais Lucena H. M. Welter e Tateo A. Welter, pelo incentivo, apoio e carinho que foi me dado durante este período. Principalmente minha mãe Lucena que sempre está me incentivando a estudar e crescer profissionalmente.

À Capes, Programa REUNI, pelo auxílio financeiro.

Feliz aquele que transfere o que
sabe e aprende o que ensina.

Cora Coralina

RESUMO

Diabetes mellitus tipo 2 (DM2) é um distúrbio metabólico cada vez mais comum e grave. É caracterizado por defeitos tanto na secreção como na ação da insulina. Fatores ambientais e genéticos contribuem para a doença, mas na vasta maioria dos casos a etiologia ainda não é compreendida. Têm sido apontadas algumas variantes em genes específicos que predisporiam a doença, entre eles *FTO*, *TCF7L2*, *ABCC8*, *SLC2A2* e *ADRA2A*. Polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) nestes genes foram associados com características de síndrome metabólica em várias populações. O presente estudo do tipo caso-controle realizado em uma população brasileira, avaliou a associação dos polimorfismos rs9939609 e rs8050136 no gene *FTO*; rs7903146 e rs12255372 no gene *TCF7L2*, rs3758947 no gene *ABCC8*, rs5393 no gene *SLC2A2* e rs10885122 no gene *ADRA2A* com DM2. Estes SNPs foram genotipados em 120 pacientes com DM2 e 121 indivíduos saudáveis (grupo controle) utilizando a plataforma [®] TaqMan para a genotipagem. Não foi observada a diferença de frequência genotípica e alélica para os polimorfismos nos cinco genes testados. As frequências dos alelos raros (95%IC) em indivíduos com DM2 e grupo controle respectivamente para os polimorfismos do gene *FTO* rs9939609 alelo A 37% (31-43%), 36% (30-42%), rs8050136 alelo A 37% (31-43%), 37% (31-43%), *TCF7L2* rs7903146 alelo T 34% (28-40)%, 31% (25-37%), rs12255372 alelo T 33% (27-39%), 28% (23-34%), *ABCC8* rs3758947 alelo T 20% (15-26), 22% (16-27%), *SLC2A2* rs5393 alelo C 21% (16-26%), 20% (15-25%) e *ADRA2A* rs10885122 alelo T 20% (15-26%), 19% (14-24%) sendo semelhantes às descritas para outras populações caucasoides, e maiores quando comparados a populações orientais. Polimorfismos nos genes *FTO*, *TCF7L2*, *ABCC8*, *SLC2A2* e *ADRA2A* não parecem estar associados com DM2 na população brasileira.

Palavras-chave: Diabetes tipo 2; polimorfismo; *FTO*; *TCF7L2*; *ABCC8*; *SLC2A2*; *ADRA2A*.

ABSTRACT

Type 2 diabetes is an increasingly common, serious metabolic disorder. It is characterised by defects in both insulin secretion and action. Both genetic and environmental factors contribute to the disease but in the vast majority of cases the aetiology is still not understood. Some variants have been identified in specific genes that predispose to disease, including *FTO*, *TCF7L2*, *ABCC8*, *SLC2A2* e *ADRA2A*. The single nucleotide polymorphisms (SNPs) in these genes have been associated with features of the metabolic syndrome across various populations. The present case-control study undertaken in the Brazilian population, evaluates the association of polymorphisms rs9939609 and rs8050136 in *FTO* gene; rs7903146 and rs12255372 in *TCF7L2* gene, rs3758947 in *ABCC8* gene, rs5393 in *SLC2A2* gene and rs10885122 in *ADRA2A* with T2D. These SNPs were genotyped in 120 T2D cases and 121 non-diabetic healthy controls using the TaqMan® Assay. No difference in the distribution of genotype and allele frequencies was observed for all polymorphisms in the five genes tested. The frequencies of the rare allele (95% CI) in subjects with T2DM and control group respectively for gene polymorphisms *FTO* rs9939609 allele A 37% (31-43%), 36% (30-42%), rs8050136 allele A 37% (31-43%), 37% (31-43%), *TCF7L2* rs7903146 allele T 34% (28-40)%, 31% (25-37%), rs12255372 allele T 33% (27-39%), 28% (23-34%), *ABCC8* rs3758947 allele T 20% (15-26), 22% (16-27%), *SLC2A2* rs5393 allele C 21% (16-26%), 20% (15-25%), e *ADRA2A* rs10885122 allele T 20% (15-26%), 19% (14-24%) being similar to those described for other Caucasoids populations, and larger when compared to eastern populations. Polymorphisms in *FTO*, *TCF7L2*, *ABCC8*, *SLC2A2* and *ADRA2A* do not seem to be associated with T2D in the Brazilian population.

Key words: Type 2 diabetes; polymorphism; *FTO*; *TCF7L2*; *ABCC8*; *SLC2A2*; *ADRA2A*.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - LOCALIZAÇÃO E ORGANIZAÇÃO GENÔMICA DO GENE <i>FTO</i>	28
FIGURA 2 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA VIA DE SINALIZAÇÃO WNT CANÔNICA.....	32
FIGURA 3 - RESUMO DAS POTENCIAS FUNÇÕES METABÓLICAS DO <i>TCF7L2</i>	33
FIGURA 4 - LOCALIZAÇÃO E ORGANIZAÇÃO GENÔMICA DO GENE <i>TCF7L2</i> ...	34
FIGURA 5 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO CANAL DE POTÁSSIO DEPENDENTE DE ATP.....	37
FIGURA 6 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA LIBERAÇÃO DE INSULINA DEPENDENTE DE GLICOSE.....	38
FIGURA 7 - LOCALIZAÇÃO E ORGANIZAÇÃO GENÔMICA SIMPLIFICADA DO GENE <i>ABCC8</i>	40
FIGURA 8 - LOCALIZAÇÃO E ORGANIZAÇÃO GENÔMICA SIMPLIFICADA DO GENE <i>SLC2A2</i>	42
FIGURA 9 - LOCALIZAÇÃO DO GENE <i>ADRA2A</i> NO CROMOSSOMO 10.....	44
FIGURA 10 - DEMONSTRAÇÃO ESQUEMÁTICA DO MECANISMO DA INIBIÇÃO DA LIBERAÇÃO DE INSULINA PELA NOREPINEFRINA.....	45
FIGURA 11 - GENES EM ESTUDO E VIAS METABÓLICAS ASSOCIADAS A DISFUNÇÃO DAS CÉLULAS β -PANCREÁTICAS E RESISTÊNCIA À INSULINÁ.....	49
FIGURA 12 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA.....	81
FIGURA 13 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA ENTRE GENÓTIPOS DO RS10885122 DO GENE <i>ADRA2A</i> E O PESO NOS GRUPOS EM ESTUDO.....	82

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - CRITÉRIOS PARA O DIAGNÓSTICO DO <i>DIABETES MELLITUS</i>	23
TABELA 2 - CARACTERÍSTICAS DA METODOLOGIA EMPREGADA PARA A QUANTIFICAÇÃO DOS BIOMARCADORES EM ESTUDO.....	54
TABELA 3 – CARACTERIZAÇÃO DOS POLIMORFISMOS EM ESTUDO.....	55
TABELA 4 - CONDIÇÕES OTIMIZADAS PARA A REAÇÃO DE PCR EM TEMPO REAL.....	57
TABELA 5.- CARACTERIZAÇÃO DOS GRUPOS.....	60
TABELA 6 - CONCENTRAÇÕES SÉRICAS DE PARÂMETROS BIOQUÍMICOS PARA OS GRUPOS EM ESTUDO.....	62
TABELA 7 - FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS DOS POLIMORFISMOS rs9939609 e rs8050136 DO GENE <i>FTO</i> , NA AMOSTRA EM ESTUDO.....	64
TABELA 8 - COMPARAÇÕES ENTRE FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS DO POLIMORFISMO rs9939609 DO GENE <i>FTO</i> COM DADOS DA LITERATURA.....	65
TABELA 9 - COMPARAÇÕES ENTRE FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS DO POLIMORFISMO rs8050136 DO GENE <i>FTO</i> COM DADOS DA LITERATURA.....	67
TABELA 10 - FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS DOS POLIMORFISMOS rs7903146 e rs12255372 DO GENE <i>TCF7L2</i> NA AMOSTRA EM ESTUDO.....	69
TABELA 11 - COMPARAÇÕES ENTRE FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS DO POLIMORFISMO rs7903146 DO GENE <i>TCF7L2</i> COM DADOS DA LITERATURA.....	70
TABELA 12 - COMPARAÇÕES ENTRE FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS DO POLIMORFISMO rs12255372 DO GENE <i>TCF7L2</i> COM DADOS DA LITERATURA.....	71
TABELA 13 - FREQUÊNCIA GENOTÍPICA E ALÉLICA DO POLIMORFISMO rs3758947 DO GENE <i>ABCC8</i> , NA AMOSTRA EM ESTUDO.....	73

TABELA 14 - FREQUÊNCIA GENOTÍPICA E ALÉLICA DO POLIMORFISMO rs5393 DO GENE <i>SLC2A2</i> , NA AMOSTRA EM ESTUDO.....	75
TABELA 15 - FREQUÊNCIA GENOTÍPICA E ALÉLICA DO POLIMORFISMO rs10885122 DO GENE <i>ADRA2A</i> , NA AMOSTRA EM ESTUDO.....	77
TABELA 16 - COMPARAÇÕES ENTRE FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS DO POLIMORFISMO rs10885122 DO GENE <i>ADRA2A</i> COM DADOS DA LITERATURA.....	78
TABELA 17 - CORRELAÇÕES SIGNIFICATIVAS ($P < 0,05$) ENTRE OS POLIMORFISMOS EM ESTUDO E PARÂMETROS LABORATORIAIS E ANTROPOMÉTRICOS NOS GRUPOS EM ESTUDO.....	79

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

1,5 AG -	<i>1,5 anidroglucitol</i>
2-h 75g de glicose -	Dosagem de glicemia 2 horas após sobrecarga de 75g de glicose
2OG -	<i>2 oxoglutarato oxigenase</i>
ABCC8-	<i>ATP-binding cassette, sub-family C, member 8</i> ; caixa de ligação ao ATP, sub família C, membro 8
Acetil-coa -	Acetil coenzima a
ADA -	<i>American Diabetes Association</i> , Associação Americana de Diabetes
ADP -	Adenosina difosfato
ADRA2A -	<i>Adrenoceptor alpha 2a</i> ; Adrenoreceptor alfa 2a
ALKB -	Alfa-cetoglutarato dependente de dioxigenase
AMF-	Alelo de menor frequência
APC -	<i>Adenomatous polyposis coli</i> , adenomatosa polipose coli
ATP -	Adenosina tri-fosfato
Ca -	Cálcio
cAMP -	Adenosina monofosfato cíclico
CBP -	<i>cAMP response element-binding</i> , proteína de ligação elemento de resposta ao AMP cíclico
CENSO-IBGE-	Estimativa do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
CEP -	Comitê de Ética em Pesquisa
CK-1α -	<i>Casein Kinase 1α</i> , caseína quinase 1 α
Clearance-	Remoção
CREB-	Proteína de ligação
CtBP-1-	Proteína C-terminal de ligação 1
CVa,-	Coeficiente de variação analítica inter ensaio
DAC-	Doença Arterial Coronariana
DCCT-	<i>Diabetes Control and Complications Trial</i> , Teste de controle

	e complicações do Diabetes
DM-	<i>Diabetes Mellitus</i> , Diabetes melito
DM1-	<i>Diabetes Mellitus</i> tipo 1
DM2-	<i>Diabetes Mellitus</i> tipo 2
DMG-	<i>Diabetes Mellitus</i> Gestacional
DNA-	Ácido desoxirribonucléico
DVL-	<i>Dishevelled</i>
EDTA-	Ácido Etilenodiamino Tetra-acético
EPAc -	<i>Exchange proteins activated by cyclic AMP</i>
FT-	<i>Fused Toes</i> , dedos unidos
FTO-	<i>Fat mass and obesity associated gene</i> , gene associado à massa adiposa e obesidade
FZD-	<i>Frizzled</i> (encaracolado, em tradução livre), receptores de superfície celular
GAD-	<i>Glutamic Acid Decarboxilase</i> , descarboxilase do ácido glutâmico
GCK gene-	<i>Glucokinase gene</i>
G_i -	Proteína G inibitória
GIP-	<i>Glucose-dependent insulintropic peptide</i>
GLP-1-	<i>Glucagon-like peptide 1</i>
GLUT-	<i>Glucose transporter</i> , transportador de glicose
GLUT1-	<i>Glucose transporter 1</i> , transportador de glicose 1
GLUT1 gene-	<i>Glucose transporter 1 gene</i>
GLUT2-	<i>Glucose transporter 2</i> , transportador de glicose 2
GLUT3-	<i>Glucose transporter 3</i> , transportador de glicose 3
G_o-	Proteína G com função desconhecida
GPCR-	Receptores acoplados à proteína G
GS3K3B-	<i>Glycogen Synthase Kinase 3β</i>
GSK-3-	Glycogen synthase kinase-3, glicogênio sintase quinase-3
GWAS-	<i>Estudo de associação ampla do genoma</i>

H/N-	Hormônio/neurotransmissor
HBA1C-	Hemoglobina Glicada fração A1C
HC -	Hospital de Clínicas
HCSP-	<i>Highly Ca⁺⁺-sensitive pool</i>
HDAC-	<i>Histonadesacetilase</i>
HDL-C-	HDL- Colesterol, <i>High Density Lipoprotein - Cholesterol</i>
HIV-	<i>Vírus da imunodeficiência Humana</i>
HLA-	<i>Human Leukocyte Antigen</i> , Antígeno leucocitário humano
HOMA-IR-	<i>Homeostatic model assessment – insuline resistance</i>
HPLC-	<i>High Performance Liquid Chromatography</i> , cromatografia líquida de alta eficiência
H-W-	Equilíbrio de Hardy-Weinberg
IDF-	<i>International Diabetes Federation</i>
IGF-1-	<i>Insulin like growth fator 1</i> , Fator de crescimento insulina 1
IGF2 gene-	<i>Insulin-like growth fator 2 gene</i>
IJ-	Insulina em jejum
IL-6-	Interleucina 6
IMC-	Índice de Massa Corporal
Ins-	Insulina
INS gene-	Insulin gene
INSR gene-	<i>Insulin receptor gene</i>
IPF1 gene-	<i>Insulin Promoter Factor gene</i>
IR-	Receptor de insulina
IRP-	<i>Immediately releasable pool</i>
IRS1 gene-	<i>Insulin receptor substrate 1gene</i>
IVS-	Sequência variante intrônica
K-	<i>Potássio</i>
Kb-	<i>1000 pares de base</i>
KCNJ11 gene-	<i>Potassium inwardly rectifying channel, subfamily J, member 11gene</i>

KDa-	Quilo dalton
Kir6.2-	<i>Inward-rectifier K⁺</i>
LCC-	<i>Low-Conductance K⁺ Channel</i>
LDL-C-	LDL-Colesterol, <i>Low Density Lipoprotein - Cholesterol</i>
LEF-1-	<i>Lymphoid enhancer fator 1</i> , fator potenciador linfóide 1
LRP-	<i>Lipoprotein-Related Protein</i> , Receptores de superfície celular
LRP5/6-	Receptor de lipoproteína 5 ou 6
M-A-	Meta análise
MAF-	<i>Minor allele Frequency</i> , frequência do alelo raro
Mix-	Mistura de reação
MODY-	<i>Maturity-Onset Diabetes of the Young</i> , Diabetes da maturidade de início precoce
MPR-	Proteína de resistência a multidroga
Munc-18-	São proteínas ao homólogo mamífero da UNC-18
n-	Número
NE-	Norepinefrina
NGSP-	Programa Nacional para Padronização da hemoglobina glicada, Norte Americano
NICE-	<i>National Institute for Health and Clinical Excellence</i>
NSF-	<i>Attachment protein receptor</i>
NTC-	<i>No template control</i> , controle negativo
OB-	Obesidade mórbida
OMIM-	<i>Mendelian Inheritance in Man</i>
OMS-	Organização Mundial da Saúde
P-	Probabilidade
PACAP-	<i>Pituitary adenylate cyclase activating peptide</i>
PAI-1 gene-	<i>Plasminogen Activator Inhibitor Type 1 gene</i>
PCR-	Reação em Cadeia da Polimerase
P-I-	Pró-insulina

PKA-	Protein kinase A, <i>Proteína quinase A</i>
Primers-	Oligonucleotídeos iniciadores
Probes-	Sondas
PTX-	<i>Pertussis toxin, islet activating protein</i> , proteína ativadora de ilhota
Quencher-	Silenciador
r-	Coeficiente de correlação
RP-	<i>Reserve pool</i>
RRP-	<i>Readily releasable granule pool</i>
SBD-	Sociedade Brasileira de Diabetes
SEMPR-	Serviço de Endocrinologia e Metabologia do Hospital de Clínicas da UFPR
SLC2A2-	<i>Solute carrier family 2, facilitated glucose transporter, member 2</i> ; família de transportador de soluto 2 e transportador de glicose facilitada membro 2
SNAP-	<i>Synaptosomal-associated protein</i>
SNARE-	<i>Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor</i>
SNC-	Sistema nervoso central
SNP-	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i> , polimorfismo de único nucleotídeo
SUR1-	<i>Sulfonylurea receptor 1</i> , receptor de sulfaniluréia 1
SUS-	Sistema Único de Saúde
TBE-	Tris borato EDTA
TCF-	<i>Transcription factor</i> , fator de transcrição
TCF1-	<i>Transcription factor 1</i> , fator de transcrição 1
TCF3-	<i>Transcription factor 3</i> , fator de transcrição 3
TCF4-	<i>Transcription factor 4</i> , fator de transcrição 4
TCF7-	<i>Transcription factor 7</i> , fator de transcrição 7
TCF7L1-	<i>Transcription factor 7-like 1 gene</i> , gene do fator de transcrição 7-semelhante a 1
TCF7L2-	<i>Transcription factor 7-like 2 gene</i> , gene do fator de

	transcrição 7-semelhante a 2
TCLE-	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TNFα-	Fator de necrose tumoral alfa
TOTG -	Teste Oral de Tolerância à Glicose
t-SNARES-	<i>Target SNARE</i>
UFPR-	Universidade Federal do Paraná
UK-	<i>Reino Unido</i>
VAMP-	Proteínas vesiculares
VDCC -	Canal de cálcio voltagem-dependente
VIP -	<i>Vasoactive intestinal peptide</i>
VLDL-C-	VLDL-Colesterol, <i>Very Low Density Lipoprotein - Cholesterol</i>
v-SNARES-	<i>Vesicle-associated membrane protein</i>
WHO-	<i>World Health Organization</i>
Wnt-	<i>Wnt signaling pathways</i> , cascata de sinalização Wnt, termo que provém da combinação de Wg e INT, genes que codificam proteínas de integração
β-cat-	Beta catenina

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	20
2 REVISÃO DE LITERATURA	22
2.1 DIABETES MELLITUS.....	22
2.2 VARIABILIDADE GENÉTICA ASSOCIADA AO DIABETES	25
2.2.1 Gene <i>FTO</i> (<i>Fat Mass and Obesity Associated gene</i> ; gene associado à massa corporal e a obesidade)	26
2.2.2 Gene <i>TCF7L2</i> (<i>Transcription factor 7-like 2</i> ; fator de transcrição 7 semelhante ao 2; gene associado a homeostase da glicose)	30
2.2.3 Gene <i>ABCC8</i> (<i>ATP-binding cassette, sub-family C</i> ; cassete de ligação ao ATP, subfamília C, membro 8)	36
2.2.4 Gene <i>SLC2A2</i> (<i>Solute carrier family 2, facilitated glucose transporter, member 2</i> ; família de transportador de soluto 2 e transportador de glicose facilitada membro 2)	40
2.2.5 Gene <i>ADRA2A</i> (<i>Adrenoceptor alpha 2a</i> ; adrenoreceptor alfa 2a)	43
3 JUSTIFICATIVA	48
4 OBJETIVO GERAL	51
4.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	51
5 MATERIAL E MÉTODOS	52
5.1 AMOSTRA POPULACIONAL	52
5.1.1 Critérios para caracterização da amostra	52
5.2 QUANTIFICAÇÃO DOS BIOMARCADORES	53
5.3 ANÁLISES MOLECULARES	54
5.3.1 Variabilidades genéticas em estudo	54
5.3.2 Isolamento do DNA genômico	55
5.3.3 Determinação da concentração de DNA genômico	55
5.3.4 Reação de PCR em tempo real com sondas fluorescentes (TAQMAN)	56
5.4 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	57
5.5 FLUXOGRAMA DO PROJETO.....	59
6 RESULTADOS E DISCUSSÕES	60
6.1 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA	60
6.2 ANÁLISES MOLECULARES	63
6.2.1 Gene <i>FTO</i>	64
6.2.2 Gene <i>TCF7L2</i>	68
6.2.3 Gene <i>ABCC8</i>	73
6.2.4 Gene <i>SLC2A2</i>	74
6.2.5 Gene <i>ADRA2A</i>	76
6.3 ANÁLISES DE CORRELAÇÃO LINEAR DE PEARSON.....	79
6.4 ANÁLISES DE VARIÂNCIA	80
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS	84
8 CONCLUSÕES	85

REFERÊNCIAS.....	86
ANEXOS	114

1 INTRODUÇÃO

A prevalência do *Diabetes mellitus* (DM) está crescendo em todo o mundo devido à mudança do estilo de vida, tais como padrões de consumo alimentar, inatividade física, obesidade, urbanização e envelhecimento das populações. O aumento do diabetes está ligado diretamente ao incremento da mortalidade por cetoacidose diabética, gangrena e nefropatia; ou indiretamente, através de sua associação com outras condições, tais como as doenças cardiovasculares. A compreensão dos mecanismos pelos quais o diabetes leva a mortalidade é necessária para intervenções adequadas e procedimentos de prevenção (ADAIR; RAO, 2010).

O número de diabéticos está crescendo rapidamente, com previsão de que o número total de casos em todo o mundo deverá aumentar para 366 milhões até o ano de 2030, transformando a patologia em epidemia global (WILD *et al.*, 2004).

A identificação de variantes genéticas associadas ao DM é tema relevante na pesquisa clínica atual. Estudos genéticos em diferentes tipos de diabetes (tipo 1, tipo 2 e diabetes gestacional) demonstraram o envolvimento de múltiplos genes (NEWELL, 2004).

A variação genética que ocorre em 90% no genoma humano é representada pelo polimorfismo de único nucleotídeo (*Single Nucleotide Polymorphism, SNP*), que pode ser responsável pelas diferenças inter-individuais em fenótipos. Estudos de frequência dos polimorfismos e sua associação à doenças podem contribuir para a identificação da origem ou do mecanismo celular de susceptibilidade ou mesmo de proteção para as mesmas, podendo assim propiciar informação diagnóstica acurada, o que resultaria no diagnóstico precoce, prevenção, e eficiente tratamento dessas doenças.

Assim, polimorfismos nas regiões de codificação e promotora dos genes candidatos estudados devem ser analisados em grupos étnicos específicos para determinar o seu significado funcional e o impacto sobre o desenvolvimento do diabetes tipo 2.

A análise dos múltiplos dados (antropométricos, clínicos, laboratoriais, genéticos, dentre outros) para a seleção de fatores de risco/proteção associados ao

diabetes mellitus tipo 2 é complexa por ser uma síndrome que apresenta diferentes fenótipos.

Neste contexto, a proposta desta dissertação foi avaliar a variabilidade de genes diabetogênicos e suas relações com outros biomarcadores, com a finalidade de ampliar o conhecimento dos processos fisiopatológicos associados ao *Diabetes mellitus* tipo 2.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 DIABETES MELLITUS

Glicemia e o diabetes estão aumentando globalmente, impulsionados tanto pelo crescimento populacional quanto pelo envelhecimento, uma vez que atualmente as populações atingem uma maior idade. Intervenções preventivas eficazes são necessárias, e os sistemas de saúde devem se preparar para detectar e controlar o diabetes e suas sequelas. Danaei e colaboradores (2011) demonstraram que o número de diabéticos mais que duplicou de 1980 (153 milhões de diabéticos) para 2008 (347 milhões de diabéticos), mostrando que o diabetes é uma epidemia crescente (DANAIEI *et al.*, 2011). Através do CENSO-IBGE – 2010 da população brasileira estima-se que haja cerca de 12 milhões de diabéticos no Brasil. O número de pessoas com DM demonstra a magnitude do problema (SBD, 2013).

O *Diabetes mellitus* (Diabetes melito, DM) é um grupo de doenças metabólicas, caracterizado por hiperglicemia crônica, resultante de defeitos na secreção da insulina, na ação deste hormônio ou ambos (ADA, 2014a).

O diabetes é classificado em quatro grandes grupos segundo as principais associações mundiais voltadas ao tema (SBD, 2012-2013; ADA, 2014a):

- *Diabetes mellitus* tipo 1 (DM1) resultante da destruição das células β pancreáticas, geralmente levando a uma absoluta deficiência de insulina. Cerca de 10% dos diabéticos estão neste grupo.
- *Diabetes mellitus* tipo 2 (DM2) resultante de um defeito progressivo na secreção de insulina bem como da resistência à insulina. O DM2 está fortemente associado à obesidade e responde por cerca de 90% dos diabéticos.
- Outros tipos específicos de diabetes devido à múltiplas causas. Como por exemplo: defeitos genéticos da função de células- β (MODY), defeitos genéticos na ação da insulina, doenças exócrinas do pâncreas (fibrose cística) ou induzidos por drogas ou substâncias químicas (tratamento do HIV ou após o transplante de órgãos).

- *Diabetes mellitus* gestacional (DMG) é caracterizado como qualquer alteração no metabolismo da glicose com diagnóstico inicial durante a gravidez. O DMG está presente na população brasileira em de cerca de 4-7% das gestações.

Atualmente o Diabetes tipo 2 (DM2) é considerado uma das grandes epidemias mundiais do século XXI e um problema de saúde pública, tanto nos países em desenvolvimento como desenvolvidos. O DM2 é também denominado de diabetes não insulino dependente ou diabetes do adulto (ADA, 2014a).

O DM2 frequentemente é diagnosticado somente após muitos anos em que a resistência à insulina já se estabeleceu. A hiperglicemia se desenvolve de forma gradual e nos estágios iniciais não é suficientemente severa para o desenvolvimento de sintomas clássicos ou mesmo de alterar os testes diagnósticos do diabetes (BRATUSCH-MARRAIN; WALDHAUSL, 1987; ADA, 2014a). Os critérios para o diagnóstico do diabetes segundo a Associação Americana de Diabetes e a Sociedade Brasileira de Diabetes (SBD, 2012-2013), estão descritos na tabela 1.

TABELA 1 - CRITÉRIOS PARA O DIAGNÓSTICO DO *DIABETES MELLITUS*

Crítérios	Analitos	Concentrações	Comentários
1*	HbA1C	≥6,5 %	O teste deve ser realizado com método padronizado e certificado pelo NSGP e padronizado pelo ensaio do DCCT
ou			
2*	Glicemia em jejum	≥126 mg/dL	Jejum definido como ausência de ingestão de alimentos calóricos por no mínimo 8 horas
ou			
3*	Glicemia 2h após 75g de glicose oral	≥200 mg/dL	O teste deve ser realizado como descrito pela OMS utilizando dose oral de glicose contendo o equivalente a 75g de glicose dissolvida em água
ou			
4	Glicemia ao acaso	≥200 mg/dL	Este critério diagnóstico deve ser associado a sintomas clássicos de hiperglicemia ou crise hiperglicêmica

*Na ausência de uma glicemia inequívoca os critérios 1 a 3 devem ser confirmados por repetição do teste.

FONTE: (SBD, 2012-2013; ADA, 2014a)

A cetoacidose, uma complicação grave do diabetes decorrente de deficiência aguda de insulina, raramente ocorre espontaneamente neste tipo de diabetes. Quando diagnosticada, usualmente está associada ao estresse ou à presença de outro processo patológico, como a infecção (BONADIO, 2013; ADA,

2014a). No entanto, estes pacientes têm risco aumentado de desenvolver as complicações microvasculares e macrovasculares (MOTATAIANU *et al.*, 2013; SIMIC *et al.*, 2013; PALLAYOVA; BANERJEE; TAHERI, 2014).

No DM2 a etiologia ainda não está estabelecida. Há um componente genético, ainda mal definido, a obesidade, o sedentarismo e o envelhecimento desencadeiam ou aceleram o aparecimento da doença. Ocorre mais frequentemente em mulheres e em indivíduos com hipertensão ou dislipidemia e sua frequência varia em diferentes subgrupos raciais/étnicos (ADA, 2014a).

A obesidade promove resistência à insulina. A secreção de insulina declina nestes pacientes e é insuficiente para compensar a progressiva resistência à insulina. Esta resistência à insulina pode melhorar com redução de peso e/ou tratamentos farmacológicos para hiperglicemia, mas é raramente restaurada ao normal. Estes diabéticos usualmente não necessitam de tratamento com insulina para sobrevivência, o uso de drogas antidiabéticas orais é necessário para o controle glicêmico. Após longos períodos instalada a patologia, os pacientes necessitam de insulina exógena (STRASSER; PESTA, 2013; ADA, 2014a). Os pacientes que não são obesos pelos critérios tradicionais de peso podem apresentar uma porcentagem maior de gordura corporal distribuída predominantemente na região abdominal (VENDRELL; CHACON, 2013; ADA, 2014a).

A hiperglicemia crônica, mesmo que reduzida, agrava a resistência e a secreção de insulina. Porém, o mecanismo preciso dessa glicotoxicidade não está bem estabelecido. O conceito de lipotoxicidade também é usado para explicar a patogênese do DM2. Os autores que difundem esta teoria sugerem que a elevação das concentrações de ácidos graxos livres circulantes e no meio intracelular induz alterações na secreção e ação da insulina, as quais caracterizam o desenvolvimento do DM2 (PESSIN; SALTIEL, 2000; KHOVIDHUNKIT *et al.*, 2004). Recentemente foi observado que a resistência à insulina e o DM2 estão associados à ativação do sistema imune inato, manifestado por elevação das concentrações circulantes de marcadores inflamatórios. As citocinas pró-inflamatórias ou agentes de fase aguda que elas estimulam induzem resistência à insulina, bem como alterações de secreção deste hormônio (BUTCHER *et al.*, 2014). A origem da associação entre inflamação e DM2 permanece desconhecida. Entretanto, o tecido adiposo mediado pelo sistema imune produz algumas citocinas (TNF α , IL-6), a possível causa para a intensificação da resistência à insulina, a alteração da secreção de insulina e o

desenvolvimento do DM2 (HOTAMISLIGIL *et al.*, 1995; UYSAL; WIESBROCK; HOTAMISLIGIL, 1998; VENDRELL; CHACON, 2013; SHI, C. *et al.*, 2014).

A redução da quantidade de células β , a hiperglicemia e outras alterações metabólicas, que agravam a resistência e pioram a secreção de insulina, dificultam a investigação da sequência de eventos envolvidos na patogênese nessa forma de diabetes. Alguns estudos demonstram hereditariedade como um dos fatores para o desenvolvimento do diabetes. Aproximadamente 15 a 25% em familiares de primeiro grau de pacientes com DM2 desenvolvem uma intolerância a glicose ou o diabetes (PIERCE; KEEN; BRADLEY, 1995). Assim, o risco de DM2 é maior quando existe uma história familiar positiva da doença. Nesse sentido, diversos estudos procuraram investigar em parentes de primeiro grau de pacientes com DM2 e em indivíduos com intolerância à glicose, possíveis alterações primárias, tentando caracterizar como se dá a instalação do DM2. Nos últimos anos houve grande progresso na definição das características clínicas de indivíduos que desenvolvem DM2, bem como em alterações moleculares envolvidas na patogênese dessa forma de diabetes (SBD, 2013).

O DM2 parece ser um distúrbio poligênico, multifatorial e é possível que polimorfismos possam facilitar a instalação da resistência à insulina (MALANDRINO; SMITH, 2011; MARCHETTI *et al.*, 2012; SCHEEN; PAQUOT, 2012).

2.2 VARIABILIDADE GENÉTICA ASSOCIADA AO DIABETES

As variações genéticas humanas mais comuns no genoma são os polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs-*single nucleotide polymorphisms*). Um número significativo de polimorfismos tem sido associado com doenças humanas complexas e alguns deles podem ser fatores diretos ou fator causal (BROOKES, 1999; HEMMINKI; BERMEJO, 2005; YAMADA, 2008). A identificação de polimorfismos que contribuem para o risco de desenvolvimento de uma doença complexa fornece informações valiosas, que são importantes para o diagnóstico precoce, prevenção e tratamento de doenças comuns (SUH; VIJG, 2005; ANDERSON *et al.*, 2007; WANG, L.; LUHM; LEI, 2007).

Muitos polimorfismos recentemente descobertos estão localizados nas regiões não codificantes do DNA. Eles podem regular a expressão de genes

próximos ou distantes. Contudo genes alvos exatos e sua função não são conhecidos na homeostase da glicose. Portanto a caracterização metabólica detalhada dessas variantes pode fornecer dados para descobrir o mecanismo de ação (MANOLIO *et al.*, 2009; WAGNER *et al.*, 2011).

Descobertas subsequentes em estudos de associação genômica ampla (GWAS - *genome-wide association studies*) confirmaram a noção prévia de que DM2 é uma doença genética complexa, mais de 60 locus foram associados com susceptibilidade ao DM e espera-se que este número aumente num futuro próximo (NTZANI; KAVVOURA, 2012).

Muitas variantes comuns em genes candidatos funcionais e posicionais, incluindo *FTO* (CONSORTIUM, 2007; FRAYLING; MCCARTHY, 2007; SCOTT *et al.*, 2007; ZEGGINI *et al.*, 2007), *TCF7L2* (CONSORTIUM, 2007; SANDHU *et al.*, 2007; SAXENA *et al.*, 2007; SCOTT *et al.*, 2007; SLADEK *et al.*, 2007; STEINTHORSDDOTTIR *et al.*, 2007), *ABCC8* (KILPELAINEN *et al.*, 2007), *SLC2A2* (KILPELAINEN *et al.*, 2007; DUPUIS *et al.*, 2010) e *ADRA2A* (DUPUIS *et al.*, 2010; GRARUP; SPARSO; HANSEN, 2010) têm sido estudados para avaliar o seu possível papel como determinantes do DM2.

2.2.1 Gene *FTO* (*Fat Mass and Obesity Associated gene*; gene associado à massa corporal e a obesidade)

Este gene localiza-se no cromossomo 16 (cromossomo 16q12.2; NC_000016.9 -53737875.54148379, figura 1). Também conhecido como gene de massa de gordura e está associado à obesidade. Sua função fisiológica exata não é conhecida. Estudos em ratos e seres humanos indicam um papel no sistema cardiovascular e nervoso e uma forte associação com risco de obesidade, índice de massa corporal e diabetes tipo 2 (NCBI, 2012).

O gene *FTO* foi descoberto em camundongos e recebeu o nome de FT (*Fused Toes*) pelo fato dos mesmos apresentarem os dedos unidos. Em seguida, o gene foi clonado e caracterizado como um gene de tamanho grande, que expressa uma proteína com 502 aminoácidos, sendo assim, denominado *FATSO* (“gordinho”) e abreviado como *FTO*. Com a verificação de sua associação ao acúmulo excessivo

de gordura corporal, o *Gene Nomenclature Committee da Human Genome Organisation* substituiu o nome do gene de *FTO* para *Fat Mass and Obesity Associated* (gene associado à massa corporal e da obesidade), porém manteve a sigla *FTO* (LIMA, 2010).

O gene *FTO* codifica uma demetilase de ácidos nucleicos dependente de 2-oxoglutarato. A enzima *FTO* é homóloga à família de proteínas AlkB (*alkylation*), as quais são enzimas de reparo do DNA por dano por alquilação. Conseqüentemente, estudos bioquímicos *in vitro* revelaram que *FTO* pode ser um membro da superfamília de dioxigenases dependentes de Fe (II) e de 2-oxoglutarato (2OG) (GERKEN *et al.*, 2007; SANCHEZ-PULIDO; ANDRADE-NAVARRO, 2007). Em metazoários estas enzimas estão envolvidas em diversos processos, incluindo a detecção de oxigênio, reparo do DNA, metabolismo de ácidos graxos e modificações pós-transducionais (OZER; BRUICK, 2007; WAHLEN; SJOLIN; HOFFSTEDT, 2008; PENG *et al.*, 2011).

Em humanos e camundongos a expressão do *FTO* é mais abundante no cérebro, principalmente nos núcleos hipotalâmicos, os quais regulam o equilíbrio de energia. Em ratos a expressão hipotalâmica foi regulada pela alimentação e pelo jejum (FRAYLING *et al.*, 2007; GERKEN *et al.*, 2007). Os níveis de expressão do gene *FTO* no jejum são reduzidos no núcleo arqueado do hipotálamo, enquanto dietas ricas em gordura aumentam seus níveis de expressão. O *FTO* pode influenciar a homeostase energética por apresentar efeito direto na ingestão alimentar (YEO; O'RAHILLY, 2012).

Adicionalmente, um número crescente de evidências indica que o cérebro pertence à classe de órgãos sensíveis à insulina, e a expressão de receptores de insulina foi detectada no bulbo olfatório, hipotálamo, córtex cerebral, cerebelo, e hipocampo (HAVRANKOVA; ROTH; BROWNSTEIN, 1978; VAN HOUTEN *et al.*, 1979). A insulina bloqueia a liberação de neuropéptídeos orexígenos e estimula a liberação de neuropéptídeos anorexígenos nos neurônios hipotalâmicos do núcleo arcado, induzindo assim à saciedade e inibição da ingestão de alimentos (PLUM; BELGARDT; BRUNING, 2006). Além disso, a insulina parece estar envolvida na regulação da sobrevivência neural, aprendizagem e memória (VAN DER HEIDE; RAMAKERS; SMIDT, 2006). Foi demonstrado em humanos que a insulina estimula a atividade córtico cerebral em indivíduos esguios, mas não em obesos, sugerindo uma potencial modulação pela insulina das funções córtico cerebrais (tais como

visão, audição, toque ou controle dos movimentos) e demonstrando que a resistência à insulina córtico cerebral é reflexo da obesidade (TSCHRITTER *et al.*, 2006).

Estudos recentes *in vivo* em humanos forneceram a evidência de que polimorfismos no gene *FTO* aumentam a ingestão de alimentos, mas não o gasto energético (JACOB *et al.*, 2000; CHUANG *et al.*, 2001; EK *et al.*, 2001; STUMVOLL *et al.*, 2001; GONZALEZ SANCHEZ *et al.*, 2002; POULSEN *et al.*, 2003).

Para o presente estudo, foram selecionados os polimorfismos rs9939609 e rs8050136 (figura 1). O polimorfismo rs9939609 localiza-se no intron 1 do gene *FTO*, e é constituído pelos alelos A e T, sendo A o alelo de risco. O polimorfismo rs8050136 também se localiza no *intron 1* e contempla os alelos: A (alelo de risco) e C (BERULAVA; HORSTHEMKE, 2010). *FTO* é um gene constituído de 9 exons e 8 introns, contendo mais de 400 kb no cromossomo 16 em humanos. Todos os polimorfismos identificados até agora estão localizados no primeiro e maior intron do gene (CHEUNG; YEO, 2011).

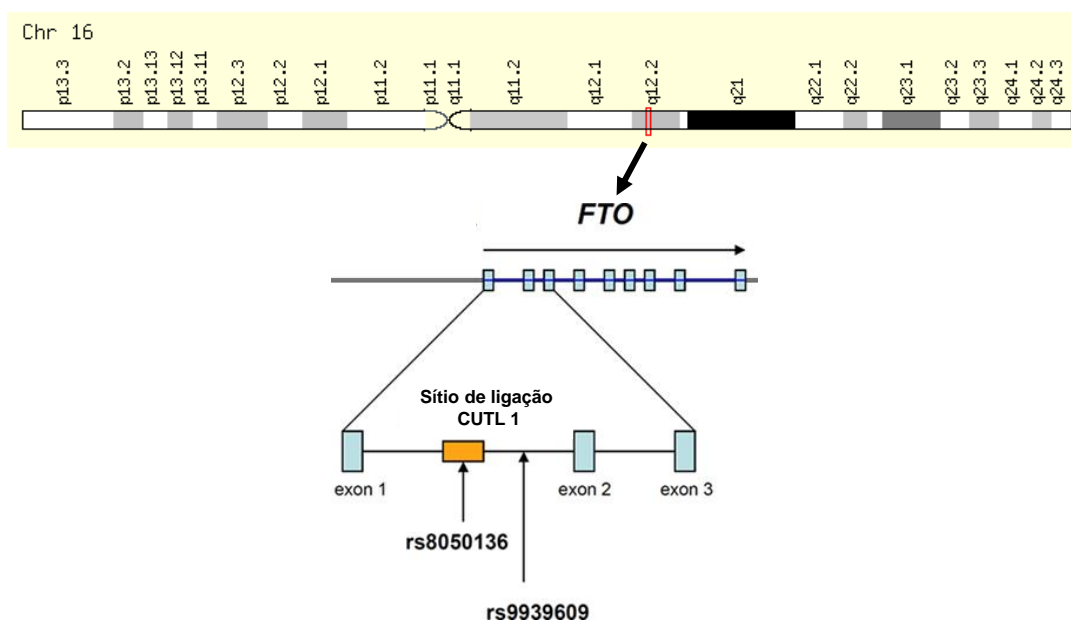


FIGURA 1 – LOCALIZAÇÃO E ORGANIZAÇÃO GENÔMICA DO GENE *FTO*

O gene *FTO* apresenta 9 exons (caixas azuis) e 8 introns. Em destaque na parte inferior da figura a localização dos polimorfismos em estudo no intron 1. O sítio de ligação para CUTL 1 (local de ligação do fator de transcrição) onde se encontra o polimorfismo rs8050136 está em destaque. É uma região reguladora de sobreposição dentro de intron 1 de gene *FTO* e este contém um sítio de ligação do fator de transcrição putativo (CUTL1), que coincide com um SNP (rs8050136) e está associada à obesidade. Foi registrado um nível de redução da expressão do *FTO* quando o sítio CUTL1 é diminuído nos fibroblastos humanos, no entanto o mecanismo deste fenômeno não está elucidado (STRATIGOPOULOS *et al.*, 2008).

A marcação em vermelho da figura indica o braço longo (q) do cromossomo 16, na posição 12.2.

FONTE: Adaptado de (CHEUNG; YEO, 2011; GENECARDS, 2014c).

Vários pesquisadores encontraram associação significativa do rs9939609 do gene *FTO* com o DM2 para a população inglesa (FIELD *et al.*, 2007), escoceses (DONEY *et al.*, 2009) e franceses (LEGRY *et al.*, 2009).

O rs9939609 do *FTO* apresentou relação significativa com IMC e obesidade (FRAYLING *et al.*, 2007), em brancos (BRESSLER *et al.*, 2010) e mulheres brancas hispânicas (SONG *et al.*, 2008).

Para a população asiática de chineses Han foi encontrada associação significativa do rs9939609 e rs8050136 com DM2 e obesidade (LI, H. *et al.*, 2008; LIU, Y. *et al.*, 2010).

Os Polimorfismos rs9939609 e rs8050136 apresentaram associação significativa com obesidade e IMC numa população de obesos (PENG *et al.*, 2011), em afro-americanos (WING *et al.*, 2009), em indianos (CHAUHAN *et al.*, 2011), crianças indianas (DWIVEDI *et al.*, 2012) e uma população mista (afro americana, hispano americana, euro americana) de crianças (KLIMENTIDIS *et al.*, 2011).

A síndrome metabólica foi associada significativamente com os polimorfismos rs9939609 e rs8050136 na população de japoneses (HOTTA *et al.*, 2011) e meta-análise multiétnica (WANG, H. *et al.*, 2012).

Para o rs9939609 não foi encontrada associação significativa entre o IMC para mulheres negras e asiáticas/ilhas do pacífico (SONG *et al.*, 2008).

Para a população de indianos (CHAUHAN *et al.*, 2011) e a população do leste asiático (XI; MI, 2009) não foi encontrada correlação com o DM2.

Como a obesidade constituiu o principal risco para DM2, espera-se que variações genéticas afetando a adiposidade influenciariam o risco para o diabetes. De fato, alguns polimorfismos, sendo os principais os dois analisados neste estudo, (rs8050136 e rs9939609) apresentaram efeito sobre adiposidade e risco para o DM2 em estudos transversais e prospectivos em vários grupos étnicos. A associação entre o DM2 foi abolida pelo ajuste do IMC (FRAYLING *et al.*, 2007; ANDREASEN *et al.*, 2008; TAN *et al.*, 2008), demonstrando claramente que a associação destes polimorfismos com DM2 é explicada pelos seus efeitos na adiposidade. Em média, os portadores dos polimorfismos no gene *FTO* exibem um aumento do IMC de 0,4 Kg/m² por alelo de risco (FRAYLING *et al.*, 2007). Mas em estudo subsequente, foi demonstrado que o polimorfismo rs8050136 no gene *FTO* prejudica a atividade córtex cerebral estimulada pela insulina, e este efeito foi detectado após correção para IMC (TSCHRITTER *et al.*, 2007).

2.2.2 Gene *TCF7L2* (*Transcription factor 7-like 2*; fator de transcrição 7 semelhante ao 2; gene associado a homeostase da glicose)

Este gene está localizado no cromossomo 10 (Cromossomo 10q25.3; NC_000010.10 - 114710009.114927437), também é conhecido como fator de transcrição 7- semelhante ao 2. Este gene codifica uma proteína de alta mobilidade, um fator de transcrição que desempenha função relevante em vias de sinalização. Estudos demonstraram que esta proteína está ligada a homeostase da glicose plasmática. Muitas variantes transcricionais que codificam várias isoformas diferentes têm sido encontrados para este gene (NCBI, 2012).

O *TCF7L2* é expresso em vários tecidos, incluindo o intestino e pâncreas, e está envolvido na cascata de sinalização *Wnt* (CHIANG; IP; JIN, 2012; IP; CHIANG; JIN, 2012). O nome *Wnt* é derivado *Wg* (de gene de polaridade segmentar *Wingless* em virtude do fenótipo mutante: moscas sem asas) e *int* (gene *int* de camundongo que codifica proteína Proto-Oncogênica int-1 – ativado pela integração de um vírus próximo ao gene). A via de sinalização *Wnt* é uma cascata de sinal de transdução altamente conservada, que tem um papel central no desenvolvimento embrionário e a regeneração de tecidos (IP *et al.*, 2012). Esta via não só interage com várias outras vias de sinalização importantes, administrando a organogênese, mas também está envolvida na regulação hormonal e na expressão do gene e da homeostase metabólica (YI; BRUBAKER; JIN, 2005; JIN; LIU, 2008). Anormalidades na via de sinalização *Wnt* podem levar ao desenvolvimento de tumores e outras doenças, incluindo diabetes tipo 2 (CLEVERS, 2006; YANG, 2012).

As proteínas *Wnt* são moléculas-sinal secretadas que ativam pelo menos 3 tipos de vias de sinalização intracelular. A principal via de sinalização efetora é a *Wnt/β-catenina*, também conhecida como via *Wnt* canônica (Figura 2). As três vias iniciam com a ligação das *Wnts* aos receptores de superfície celular da família *Frizzled*, proteínas transmembrana de sete passos, com estrutura semelhante aos receptores acoplados às proteínas G (CPCR - *G-protein-coupled receptors*). Quando ativadas pela ligação de *Wnt*, as proteínas *Frizzled* recrutam a proteína de suporte *Dishevelled* (*Dvl*) (IP; CHIANG; JIN, 2012).

A via *Wnt/β-catenina* atua pela regulação da proteólise de uma proteína multifuncional chamada de β -catenina (ou *Armadillo*, em moscas), que atua na adesão célula-célula e regulação gênica. As *Wnts* atuam somente nesta via pela

interação com a proteína *Frizzled* e com a proteína correceptora relacionada ao receptor de lipoproteína de baixa densidade (LDL – *low density protein*), sendo, por isso, denominada de proteína relacionada ao receptor de LDL (*LRP – LDL receptor-related protein*). A degradação das β -cateninas citoplasmáticas depende de um grande complexo de degradação proteico, que se liga à β -catenina e a mantém fora do núcleo enquanto promove sua degradação. O complexo contém, pelo menos, outras quatro proteínas: uma serinatreonona-quinase, chamada de caseína-quinase 1 (CK1 – *Casein kinase 1*) que fosforila uma serina da β -catenina, marcando-a assim, para outra fosforilação por outra serinatreonina-quinase, chamada de glicogênio sintase quinase 3 (GSK3 - *Glycogen synthase kinase 3*); esta última fosforilação marca a proteína para ubiquitinação e degradação rápida nos proteossomas (DIERICK; BEJSOVEC, 1999; ZENG *et al.*, 2005). Duas proteínas de suporte, chamadas de axina e polipose adenomatosa de cólon (APC - *adenomatous polyposis coli*), estabilizam o complexo (STAMBOLIC; RUEL; WOODGETT, 1996) (figura 2A).

A ligação de proteínas *Wnt* a *Frizzled* e LRP promove a inibição da fosforilação e degradação de β -catenina. O mecanismo não é compreendido em detalhes, mas requer *Dishevelled* (Dvl) e várias outras proteínas que se ligam à *Dishevelled*, incluindo CK1. Como resultado, β -catenina não fosforilada acumula no citosol e núcleo. O aumento de β -catenina não degradada causado pela sinalização *Wnt* permite a entrada de β -catenina ao núcleo e ligação a fatores transcricionais, formando o fator de transcrição bipartido (β -catenina/LEF1 ou β -catenina/TCF) formado por β -catenina livre e fator de transcrição de célula T (TCF - *T cell factor*) ou fator linfóide intensificador-1 (LEF-1 - *lymphoid enhancer factor-1*). A formação do fator de transcrição bipartido desloca *Groucho*, e induz a transcrição de genes-alvo *Wnt* (Figura 2B) (KORINEK *et al.*, 1998).

A GSK-3 tem sido reconhecida como uma importante moduladora negativa da via de sinalização *Wnt* (STAMBOLIC; RUEL; WOODGETT, 1996). Lítio e outros inibidores de GSK-3 podem mimetizar a função de ligantes *Wnt* e estimular a expressão de genes-alvo a *Wnt* (figura 2B) (STAMBOLIC; RUEL; WOODGETT, 1996).

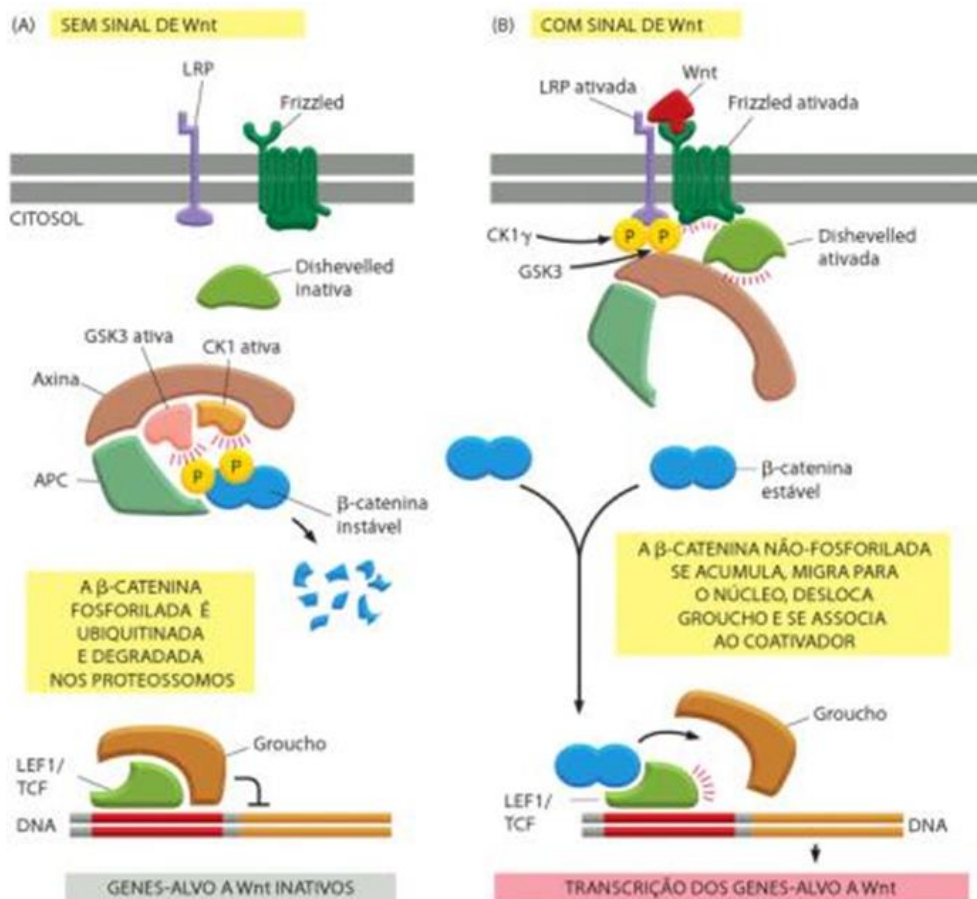


FIGURA 2 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA VIA DE SINALIZAÇÃO WNT CANÔNICA

A) Na ausência de sinal de *Wnt*, algumas β -cateninas que não estão ligadas à cauda citosólica das caderinas (não mostrado) e as β -cateninas citosólicas ligam-se ao complexo de degradação formado pela APC (polipose adenomatosa de cólon), axina, GSK3 (glicogênio-sintase-quinase-3) e CK-1 α (caseína quinase 1 α). Nesse complexo, a β -catenina é fosforilada pela CK-1 α e pela GSK3, o que desencadeia sua ubiquitinação e degradação nos proteossomos. Os genes que respondem a *Wnt* são mantidos inativos pela ligação da proteína corressora *Groucho* à proteína reguladora gênica LEF1 (fator lífóide intensificador-1)/TCF (fator de transcrição de célula T).

B) A ligação de *Wnt* a *Frizzled* e a LRP-5/6 (proteína relacionada ao receptor de LDL-5/6) reúne os dois tipos de receptores, resultando no recrutamento do complexo de degradação para a membrana plasmática e na fosforilação da cauda citosólica de LRP pela GSK-3 e pela CK-1 α . A axina se liga à LRP fosforilada, sendo inativada e/ou degradada. O complexo de degradação, agora sem axina, torna-se inativo e, desta forma, a ubiquitinação e a degradação de β -catenina são bloqueadas, o que permite o acúmulo e a translocação da β -catenina não fosforilada para o núcleo. A Dishevelled e, provavelmente, uma proteína G são necessárias para a atuação dessa via de sinalização; ambas se ligam à *Frizzled*, e Dishevelled se torna fosforilada (não mostrado), mas seus papéis funcionais são desconhecidos. No núcleo, a β -catenina se liga à LEF1/TCF, desloca o corressor *Groucho* e atua como um coativador na estimulação da transcrição de genes-alvo *Wnt*.

FONTE: (ALBERTS; WILSON; HUNT, 2010).

O fator de transcrição bipartido β -catenina/TCF também pode funcionar como um efetor para outras cascatas de sinalização, incluindo a insulina, fator de crescimento semelhante à insulina 1 (IGF-1), peptídeo 1 semelhante ao glucagon (GLP-1; glucagon-like peptide-1) e um número de outros hormônios peptídicos e

neurotransmissores que utilizam o AMP cíclico como um segundo mensageiro (JIN; GEORGE FANTUS; SUN, 2008).

TCF7L2 é requerido para a sobrevivência e proliferação das células β do pâncreas, contudo seu papel é controverso, estudos mostram tanto efeitos deletérios (LYSSENKO *et al.*, 2007; SAVIC *et al.*, 2011) como benéficos (SHU *et al.*, 2008; SHU *et al.*, 2009). *TCF7L2* também é requerido para a secreção de insulina pelas células pancreáticas em resposta à glicose e incretinas (SHU *et al.*, 2008). Foi mostrado que a expressão do gene de insulina se correlaciona fortemente com a expressão de *TCF7L2* (LYSSENKO *et al.*, 2007) e que a expressão de GLP-1 e receptor do peptídeo inibitório gástrico (GIP – *gastric inhibitory polypeptide*) depende da presença do fator de transcrição *TCF7L2* (SHU *et al.*, 2009), fornecendo uma explicação plausível para o envolvimento deste gene na responsividade das células β às incretinas. Foi mostrado por Norton e colaboradores (2011) que *TCF7L2* constitui um regulador negativo potencial da gluconeogênese. Também foi demonstrado o efeito metabólico de *TCF7L2* em outros órgãos, sua expressão em adipócitos é regulada pela insulina (AHLZEN *et al.*, 2008). A figura 3 demonstra um resumo com as potenciais funções metabólicas do gene *TCF7L2*.

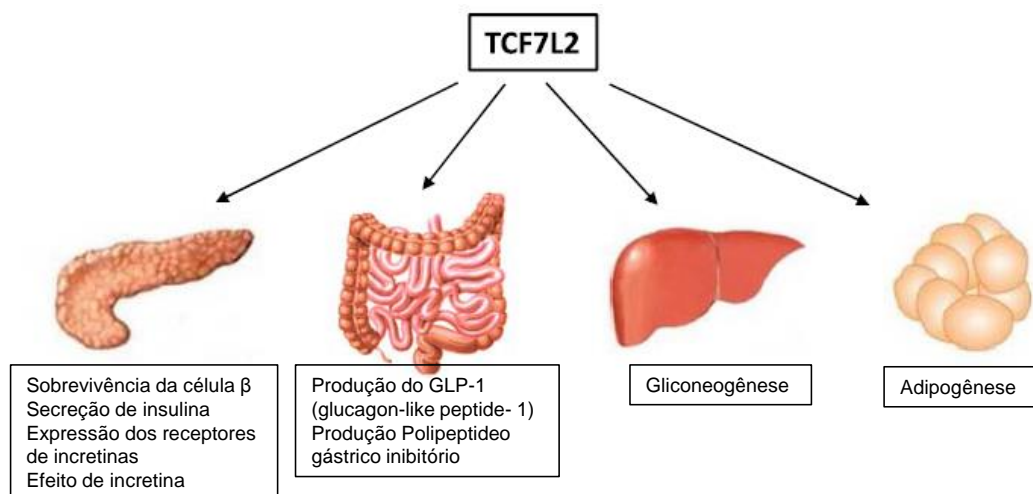


FIGURA 3 – RESUMO DAS POTENCIAIS FUNÇÕES METABÓLICAS DO *TCF7L2*

FONTE: Adaptado de (IP *et al.*, 2012).

TCFL2 é o fator de risco para o diabetes mais significativo e consistente identificado até hoje (CHANDAK *et al.*, 2007). Foi primeiramente identificado como um gene que conferia risco para o diabetes em 2006 (BARRETT; CARDON, 2006). Posteriormente, o polimorfismo mais comum no gene *TCFL2* foi associado com o DM2 em diferentes estudos populacionais (JIN; LIU, 2008).

Os polimorfismos mais significantes foram detectados para dois SNPs intrônicos rs7903146 e rs12255372 localizados 50 pb um do outro (GRANT *et al.*, 2006; GROVES *et al.*, 2006; HUMPHRIES *et al.*, 2006; SAXENA *et al.*, 2006; ZHANG *et al.*, 2006; CHANDAK *et al.*, 2007; SCOTT *et al.*, 2007; ZEGGINI *et al.*, 2007; TABARA *et al.*, 2009), sendo assim, estes foram selecionados para este estudo. O gene *TCFL2* possui 14 exons e 13 introns, que ocupam 215.863 pares de bases (figura 4). O polimorfismo rs7903146 se encontra no intron 3 e é constituído pelos alelos C e T (alelo de risco), e rs12255372 no intron 4, sendo constituído pelos alelos G e T (alelo de risco) (SCOTT *et al.*, 2006; PROKUNINA-OLSSON *et al.*, 2009; TONG *et al.*, 2009; PANG; SMITH; HUMPHRIES, 2013).

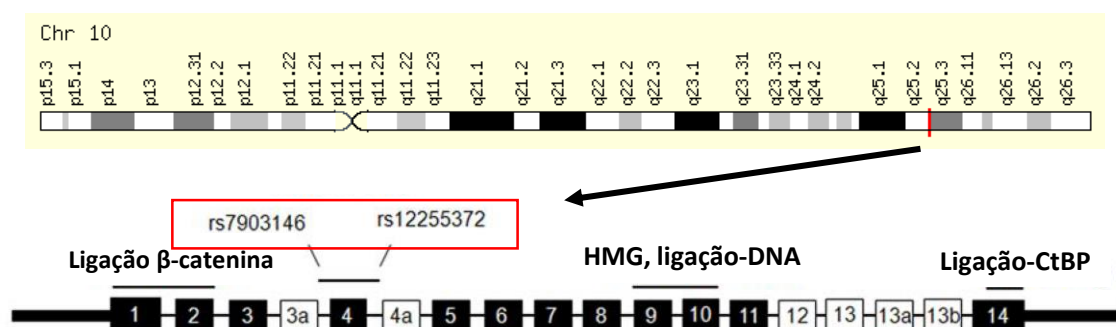


FIGURA 4 – LOCALIZAÇÃO E ORGANIZAÇÃO GENÔMICA DO GENE *TCF7L2*

O gene *TCF7L2* apresenta 14 exons (caixas) e 13 introns. Em destaque na parte superior da figura a localização dos polimorfismos em estudo

Ligação β -catenina: Domínio de Interação β -catenina

HMG, ligação DNA: Domínio de proteína de grupo de alta mobilidade

Ligação-CtBP: Domínio de ligação proteína C-terminal

A marcação em vermelho da figura indica o braço longo (q) do cromossomo 10, na posição 25.3.

FONTE: Adaptado de (PROKUNINA-OLSSON *et al.*, 2009; GENECARDS, 2014d).

Os polimorfismos rs7903146 e rs12255372 do gene *TCF7L2* foram associados significativamente com o DM2 por muitos pesquisadores (FLOREZ *et al.*, 2006; THORSBY *et al.*, 2009; CRUZ *et al.*, 2010; PENG *et al.*, 2013), na população do leste asiático (LUO *et al.*, 2009), em indianos (GUPTA *et al.*, 2012; UMA JYOTHI *et al.*, 2013), em árabes da Tunísia (TURKI *et al.*, 2013), em libaneses (NEMR *et al.*, 2012), na população da Letônia (KALNINA *et al.*, 2012), em mexicanos (MARTINEZ-GOMEZ *et al.*, 2011), em suecos (NORDMAN *et al.*, 2009), em japoneses (TABARA *et al.*, 2009), em espanhóis (GONZALEZ-SANCHEZ *et al.*, 2008).

O polimorfismo rs7903146 do gene *TCF7L2* foi correlacionado com o DM2 na população inglesa (GROVES *et al.*, 2006), em uma população mista (Escandinávia, Polônia e EUA) (SAXENA *et al.*, 2006), em chineses Han (DOU *et al.*, 2013), em jovens afro-americanos (DABELEA *et al.*, 2011), em suecos finlandeses (LYSSENKO *et al.*, 2007) e não foi associado ao DM2 na população de jovens brancos não hispânicos (DABELEA *et al.*, 2011).

O polimorfismo rs12255372 do *TCF7L2* não apresentou associação significativa com o DM2 na população de chineses han (DOU *et al.*, 2013).

Um estudo investigou a associação entre os polimorfismos do gene *TCF7L2* e a doença arterial coronariana (DAC) em pacientes diabéticos e não-diabéticos. Foram genotipados os polimorfismos rs7903146, rs12255372 e rs11196205 em um estudo transversal, incluindo 1.650 pacientes consecutivos submetidos à angiografia coronariana para avaliação de DAC estável ou suspeita. O rs7903146 foi significativamente associado com a DAC. Esta associação era forte e significativa em pacientes com DM2, mas não em indivíduos não diabéticos. Os polimorfismos rs12255372 e rs11196205 também foram significativamente associados com DAC em pacientes diabéticos. Portanto *TCF7L2* representa uma forte associação entre o diabetes e a aterosclerose (MUENDLEIN *et al.*, 2011).

HAUPT e colaboradores (2010) estudaram polimorfismos do *TCF7L2* em relação à composição corporal e perda de peso durante a intervenção de estilo de vida. Neste estudo foram genotipados 309 indivíduos alemães com risco aumentado de desenvolver DM2 para os polimorfismos rs7903146, rs12255372 do *TCF7L2*, sendo realizado o teste de tolerância à glicose e medidas de gordura abdominal, antes e depois, da intervenção no estilo de vida após 9 meses. Foi observado que os portadores do alelo de risco (T) apresentavam menor secreção de insulina e menor redução de IMC com a mudança do estilo de vida. Essencialmente, os mesmos resultados foram obtidos com rs12255372. Os dados demonstram que os alelos (T) do gene *TCF7L2* estão associados ao diabetes e com uma menor perda de peso em resposta à intervenção de estilo de vida.

Variantes do gene *TCF7L2* estão associadas à redução na secreção de insulina e conseqüentemente ao DM2 (HAUPT *et al.*, 2010). Em estudo que genotipou os polimorfismos rs7903146, rs12255372 em 2512 indivíduos, o alelo de risco T do rs7903146 foi associado a maior concentração de glicemia em jejum ($p = 0,01$). Homozigotos T/T apresentaram um aumento de 23,5% da razão pró-

insulina/insulina ($p < 0,001$) em comparação com os homocigotos C/C. Não foi identificado neste estudo associação com IMC ($p = 0,98$), circunferência da cintura ($p = 0,89$), o tecido adiposo subcutâneo ($p = 0,32$) ou tecido adiposo visceral (STOLERMAN *et al.*, 2009).

Curiosamente, os polimorfismos em *TCF7L2* que afetam a função das células em relação à responsividade das células β à incretinas (LYSSENKO *et al.*, 2007; SCHAFER *et al.*, 2007; SHU *et al.*, 2008; SHU *et al.*, 2009) e conversão de pró-insulina em insulina (LOOS *et al.*, 2007), concomitantemente parecem influenciar em todo o corpo (DAMCOTT *et al.*, 2006; ELBEIN *et al.*, 2007; REINEHR *et al.*, 2008) e função hepática quanto à sensibilidade à insulina (ADAIR; RAO, 2010).

2.2.3 Gene *ABCC8* (*ATP-binding cassette, sub-family C; cassete de ligação ao ATP, subfamília C, membro 8*)

Este gene está localizado no cromossomo 11 (Cromossomo 11p15.1; NC_000011.9 - 17414432.17498449). Codifica uma proteína membro da subfamília de proteína de resistência à multidroga (MRP - *multidrug resistance protein*) também conhecida como receptor de sulfoniluréia-1 (SUR1 - *sulfonylurea receptor-1*) e está envolvido na resistência à múltiplas drogas (DE WET *et al.*, 2012). A SUR é membro da superfamília de ligação ao ATP (AGUILAR-BRYAN *et al.*, 1998). *Splicing* alternativo deste gene tem sido observado, no entanto, as variantes de transcrição não foram completamente descritas (SHI, N. Q.; YE; MAKIELSKI, 2005).

Os canais de potássio ATP-dependentes (K_{ATP}) pancreáticos são complexos hetero-octoméricos compostos de quatro subunidades canais de K^+ retificadores internos (Kir6.2 - *inward-rectifier K⁺*) com uma região específica que serve como um filtro seletivo acoplados a quatro subunidades do receptor SUR1 (*high-affinity sulfonylurea receptor*) (AGUILAR-BRYAN *et al.*, 1995). A figura 5 mostra a representação esquemática deste canal.

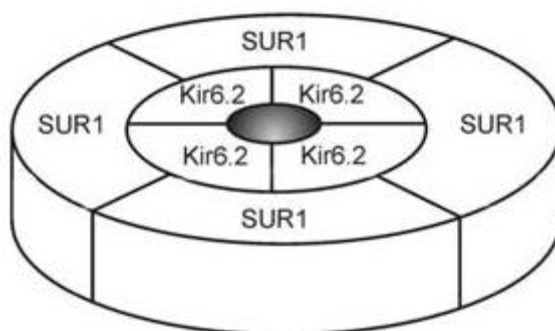


FIGURA 5 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO CANAL DE POTÁSSIO DEPENDENTE DE ATP

As quatro subunidades Kir6.2 (*inward-rectifier K⁺*) estão envolvidas pelas quatro subunidades SUR1 (*high-affinity sulfonylurea receptor*).

FONTE: Adaptado de (RIEDEL; STECKLEY; LIGHT, 2005).

Os canais K_{ATP} são amplamente expressos pelo corpo e importantes mediadores na homeostase da glicose (RIEDEL; STECKLEY; LIGHT, 2005). O K_{ATP} modula a captação de glicose do músculo esquelético e contribui para o controle central da saída de glicose hepática e do apetite, facilitando a resposta contra-regulatória à glicemia, tanto central quanto periférica, aumentando a liberação de hormônios como o glucagon (MIKI; SEINO, 2005). Nas células β -pancreáticas os canais K_{ATP} possuem função importante na regulação da secreção da insulina pelo acoplamento do metabolismo celular com o potencial de membrana (BELL; POLONSKY, 2001). A insulina é secretada pelas células β do pâncreas em resposta a alguns metabólitos como glicose, ácidos graxos, e alguns aminoácidos (RIEDEL; STECKLEY; LIGHT, 2005).

No período pós-prandial a glicose aumenta, estimulando o metabolismo da glicose na mitocôndria da célula β pancreática, levando a formação de ATP com o consumo de ADP. O aumento da concentração de ATP no citosol fecha os canais K_{ATP} , o que resulta na despolarização da membrana pela diminuição do efluxo de K^+ , sequencialmente ocorre uma ativação dos canais de cálcio (Ca^{++}) voltagem dependente, aumentando a concentração de Ca^{++} no citosol. O aumento significativo de cálcio na célula estimula a exocitose de grânulos de insulina (ASHCROFT, F. M.; RORSMAN, 1989), conforme demonstrado na figura 6.

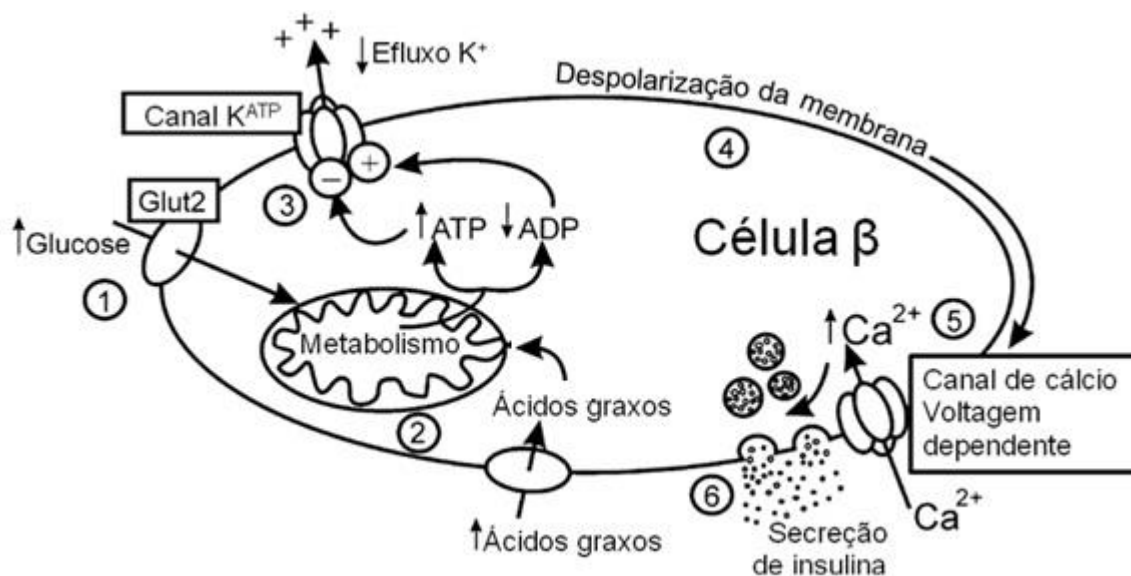


FIGURA 6 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA LIBERAÇÃO DE INSULINA DEPENDENTE DE GLICOSE

Etapa 1: O aumento da concentração plasmática de glicose promove sua internalização na célula pancreática através do transportador de glicose GLUT2; Etapa 2: A acetil-CoA proveniente do metabolismo da glicose (via glicolítica) e dos ácidos graxos é internalizada na mitocôndria e sua oxidação (ciclo dos ácidos tricarboxílicos) e o transporte dos elétrons resultam na síntese de ATP (↑) e consumo de ADP (↓);

Etapa 3: O aumento da concentração de ATP no citosol fecha os canais K_{ATP} levando a despolarização da membrana pela diminuição do efluxo de K^+ ;

Etapa 4: A diminuição do efluxo de potássio (K^+) resulta na despolarização da membrana que promove a abertura dos canais de cálcio (Ca^{2+}) voltagem dependentes;

Etapa 5: A abertura dos canais de cálcio resulta no aumento da concentração de cálcio intracelular, que estimula a fusão de vesículas secretoras de insulina com a membrana plasmática;

Etapa 6: Secreção da insulina para o sangue.

FONTE: Adaptado de (RIEDEL; STECKLEY; LIGHT, 2005).

O canal K_{ATP} nas células β pode ser regulado farmacologicamente pelo medicamento sulfaniluréia, que age se ligando no canal, fechando-o, por isso amplamente utilizado para o tratamento do DM2. Inversamente, uma segunda classe de fármacos, tais como o diazóxido, agem abrindo o canal (GRANT *et al.*, 2006).

Mutações no gene *ABCC8* que resultam na perda de função do canal K_{ATP} promovem hiperinsulinismo da infância, uma desordem séria caracterizada por secreção não regulada e excessiva de insulina (SEINO; MIKI, 2003; DUNNE *et al.*, 2004). Em contraste, mutações no gene *KCNJ11* que levam a ganho de função na subunidade formadora do poro (Kir6.2) prejudicam a secreção de insulina e produzem diabetes neonatal permanente (GLOYN *et al.*, 2004). Defeitos na regulação metabólica do canal K_{ATP} , como uma consequência de alterações do

metabolismo, também resultam em diabetes (KOSTER *et al.*, 2000; SEINO; MIKI, 2003; ASHCROFT, F.; RORSMAN, 2004).

Huopio e colaboradores (2003) descreveram uma mutação *missense* heterozigótica (E1506K) no gene *ABCC8* como responsável por alguns casos de diabetes autossômica dominante. Indivíduos afetados se caracterizam por hiperinsulinismo congênito na infância, perda da capacidade secretória de insulina no início da fase adulta e *diabetes mellitus* na meia idade. O mecanismo pelo qual essas mutações levam à intolerância à glicose e ao DM ainda não foi elucidado. Algumas hipóteses incluem a falência progressiva na função das células β devido à sua exaustão; aumento da apoptose das células β como resultado da grande concentração de cálcio intracelular, e a interferência de outros fatores genéticos ou ambientais (FLANAGAN *et al.*, 2011). Este achado levou a sugestão para o abandono da descrição do termo MODY (*maturity onset diabetes of the young*; diabetes da maturidade de início precoce) e substituição pela designação diabetes dominante autossômica, do qual *ABCC8* constituiria o sétimo tipo deste grupo (GLASER, 2003).

Associações de variantes nos genes que codificam canais K_{ATP} têm sido reportadas em vários estudos (INOUE *et al.*, 1996; HANI *et al.*, 1997; HANI *et al.*, 1998; HANSEN *et al.*, 1998; ISHIYAMA-SHIGEMOTO *et al.*, 1998; JI; HAN; WANG, 1998; HART *et al.*, 1999; REIS *et al.*, 2000; GLOYN *et al.*, 2001; MEIRHAEGHE *et al.*, 2001; BARROSO *et al.*, 2003; GLOYN *et al.*, 2003; LOVE-GREGORY, L. *et al.*, 2003; NIELSEN *et al.*, 2003), com dados conflitantes para variantes no gene *ABCC8* e resultados mais consistentes para a variante E23K no gene *KCNJ11* (Anexo II).

Estudos em mexicanos-americanos e japoneses utilizando como marcadores sítios muito polimórficos no DNA, próximos à região do gene *ABCC8*, localizado no cromossomo 11p15.1, não mostraram evidências para a ligação deste gene com o DM2 (STIRLING *et al.*, 1995). Em contraste, evidências para a relação entre concentrações plasmáticas de glicose após duas horas de administração de glicose com polimorfismos próximos ao gene *ABCC8* foi demonstrada em famílias mexicana-americanas com DM2 (IWASAKI *et al.*, 1996; STERN *et al.*, 1996).

Também é possível que variantes em região promotora, mesmo em regiões distantes como à 100 Kb, possam alterar a expressão de *ABCC8* (HANSEN *et al.*, 2001). O polimorfismo rs3758947 do gene *ABCC8* se localiza na região promotora

do gene (figura 7) e foi associado a um risco aumentado para o desenvolvimento de diabetes tipo 2 (KILPELAINEN *et al.*, 2007).

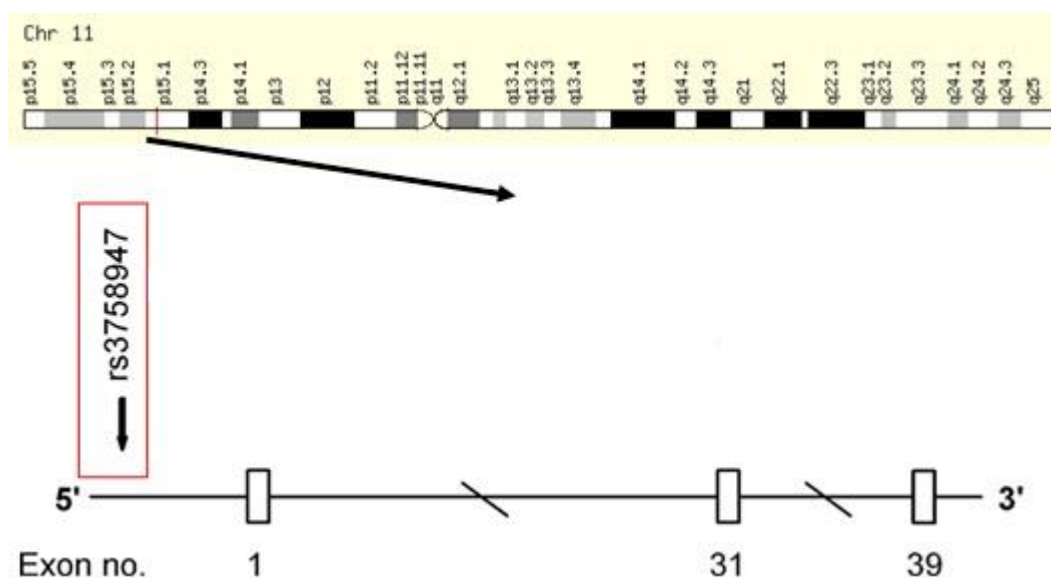


FIGURA 7 - LOCALIZAÇÃO E ORGANIZAÇÃO GENÔMICA SIMPLIFICADA DO GENE *ABCC8*
 O gene *ABCC8* apresenta 39 exons (caixas) e 38 introns. Em destaque na parte superior da figura a localização dos polimorfismos em estudo localizado na região promotora circulado em vermelho.
 FONTE: (KILPELAINEN *et al.*, 2007)

Embora as alterações no gene *ABCC8* possam estar associadas com DM2, uma combinação de estilo de vida, fatores genéticos e fatores ambientais desempenham um papel importante na determinação do risco da doença (GHR, 2013). Também, foi demonstrado que o polimorfismo rs3758947 no gene *ABCC8* modifica o efeito sobre a atividade física e o risco para o desenvolvimento do DM2 (KILPELAINEN *et al.*, 2007).

Como canal K_{ATP} das células β regula a secreção de insulina em resposta à glicose ou tolbutamina, o gene *ABCC8* tem sido considerado um candidato plausível para caracterizar o envolvimento genético no DM2 (HANSEN *et al.*, 2001).

2.2.4 Gene *SLC2A2* (*Solute carrier family 2, facilitated glucose transporter, member 2*; família de transportador de soluto 2 e transportador de glicose facilitada membro 2)

Este gene está localizado no cromossomo 3 (cromossomo 3q26.1-q26.2; NC_000003.11 - 170714137.170744768, Figura 8) (JOOST *et al.*, 2002). Este gene codifica uma glicoproteína integral da membrana plasmática no fígado, células beta das ilhotas, intestino e epitélio renal (FUKUMOTO *et al.*, 1988; GOULD *et al.*, 1991).

O transportador de glicose facilitada também conhecido como GLUT2, atua no transporte facilitado bidirecional de glicose. É responsável pela absorção de glicose pelas células beta (Figura 6, ver item 2.2.3 gene *ABCC8*), compreendendo parte do mecanismo de detecção de glicose pelas células beta. Devido à sua baixa afinidade para a glicose, tem sido sugerido que este transportador possa atuar como um sensor de glicose (WOOD; TRAYHURN, 2003; ZHAO; KEATING, 2007).

A inibição da expressão dos transportadores GLUT nas células β -pancreáticas em roedores está associada com hiperglicemia e a diminuição na secreção de insulina estimulada por glicose, os quais são marcadores precoces na fisiopatologia do diabetes e precedem o desenvolvimento de resistência à insulina (JOHNSON *et al.*, 1990; ORCI *et al.*, 1990; THORENS *et al.*, 1990).

Humanos com mutações que levam a inativação bialélica de *SLC2A2* usualmente não apresentam diabetes, mas desenvolvem síndrome de Fanconi Bickel (FBS – *Fanconi-Bickel syndrome*) (SANTER *et al.*, 1997; SANTER; STEINMANN; SCHAUB, 2002). A Síndrome de Fanconi-Bickel, uma doença recessiva autossômica rara do metabolismo de carboidratos, foi originalmente descrita em 1949 (Fanconi e Bickel 1949). Os sinais clínicos que são considerados típicos são hepatomegalia secundária devido ao acúmulo de glicogênio, intolerância à galactose e glicose, hipoglicemia de jejum (SANTER *et al.*, 1997; SANTER *et al.*, 2002).

Sanbury e colaboradores (2012) identificaram em pacientes com *Diabetes mellitus* neonatal que apenas 4% destes neonatos apresentavam mutações recessivas no gene *SLC2A2*. Até o momento, não há evidências para a relação genótipo-fenótipo para este gene, familiares com a mesma mutação apresentam fenótipos diabéticos contrastantes. Isto sugere que outras forças ou outros transportadores de glicose estão atuando para a entrada de glicose nas células β -pancreáticas, e que talvez a deficiência do *SCL2A2* seja compensada pelos transportadores GLUT1 ou GLUT3, sendo ambos expressos em concentrações maiores que GLUT2 nas células β -pancreáticas humanas (MCCULLOCH *et al.*, 2011). Através deste estudo do gene *SLC2A2* em humanos, GLUT2 ressurgiu como

um concorrente para o transporte de glicose nas células β -pancreáticas humanas. O desafio do presente é compreender toda a amplitude da função deste gene e sua relevância no controle da secreção de insulina em momentos diferentes do desenvolvimento humano (VAN DE BUNT; GLOYN, 2012).

Foram descritos polimorfismos no gene *SCL2A2* que influenciariam o controle glicêmico através das funções do seu produto gênico (GLUT2) como transdutor de sinal e transporte e sensoriamento de glicose (DUPUIS *et al.*, 2010) (Anexo III).

A figura 8 representa a posição de alguns destes polimorfismos, com destaque para o rs5393 em estudo neste trabalho.

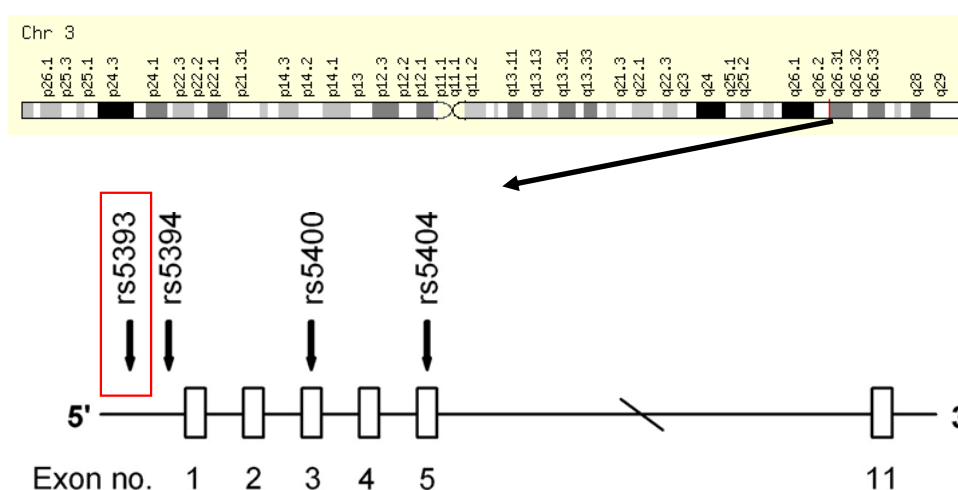


FIGURA 8 – LOCALIZAÇÃO E ORGANIZAÇÃO GENÔMICA SIMPLIFICADA DO GENE *SLC2A2*

O gene *SLC2A2* apresenta 11 exons (caixas) e 10 introns. Em destaque na parte superior da figura a localização do polimorfismo em estudo localizado na região promotora em destaque.

A marcação da figura indica o braço longo (q) do cromossomo 3, na posição 26.2.

FONTE: Adaptado de (KILPELAINEN *et al.*, 2007; GENECARDS, 2014a).

Em um estudo com população dinamarquesa não foi encontrado diferença da frequência genotípica entre o grupo controle e diabéticos tipo 2, e nem associação com as características clínicas do DM2 com os polimorfismos rs5393, rs5394 e rs5396 (MOLLER *et al.*, 2001). Os polimorfismos rs5400 e rs5404 localizados nos exons 3 e 5 do gene *SLC2A2*, respectivamente, da mesma forma que os localizados na região (rs5393 e rs5394) estão imputados como preditores para a progressão para DM2 em indivíduos obesos finlandeses intolerantes à glicose (LAUKKANEN, O. *et al.*, 2005). Kilpelainen e colaboradores (2007) demonstraram

que o efeito destes polimorfismos no desenvolvimento do DM2 é modificado por atividade física.

Foi observada uma associação significativa da variante rs5400 com DM2 numa população finlandesa (GAULTON *et al.*, 2008), a qual está em perfeito desequilíbrio de ligação ($r^2=1$) com os polimorfismos rs5406 e rs6785803 (WILLER *et al.*, 2007). Associação com ao menos uma das três variantes, embora com alelos diferentes, também foram reportadas (ALCOLADO; BARONI; LI, 1991; BARROSO *et al.*, 2003; LAUKKANEN, C., 2005; ABOU-HUSSEIN *et al.*, 2011). Também foi encontrada associação nominal do gene *SLC2A2* com nefropatia diabética, o alelo T do rs5400 foi associado a uma redução do risco de nefropatia diabética (VIONNET *et al.*, 2006).

Um estudo de associação genômica ampla (DUPUIS *et al.*, 2010) reportou que o alelo de risco rs5400 no gene *SLC2A2* está em perfeito desequilíbrio de ligação ($r^2=1,0$) com o polimorfismo rs11920090 do mesmo gene, e foi associado com concentrações plasmáticas maiores de colesterol em jejum (IGL *et al.*, 2010), sugerindo uma explicação biológica possível para a relação estatística entre a variante genética e o risco aumentado para doença cardiovascular. A variante rs11920090 do gene *SLC2A2* também foi associada à sensibilidade da conversão da pró-insulina de jejum a insulina, porém com frequência do AMF (alelo de menor frequência) muito baixa (14%) (WAGNER *et al.*, 2011).

Defeitos na secreção de insulina constituem uma importante característica na patogênese do DM2 em adição a resistência à insulina. Assim, variantes em genes que regulam a secreção da insulina, como o *SLC2A2*, constitui um candidato plausível para o DM2. Polimorfismos no gene *SLC2A2* têm sido associados com risco ao diabetes em alguns estudos (ALCOLADO; BARONI; LI, 1991; BARROSO *et al.*, 2003).

2.2.5 Gene *ADRA2A* (*Adrenoceptor alpha 2a*; adrenoreceptor alfa 2a)

Gene localizado no cromossomo 10 (Cromossomo 10q25.2; NC_000010.10 - 112836790.112840665, figura 9). Este gene codifica o receptor α -adrenérgico subtipo $\alpha 2A$ e não contém introns, quer na sua codificação ou sequências não

traduzidas. Os receptores alfa-2-adrenérgicos são membros da superfamília de receptores acoplados à proteína G. Incluem 3 subtipos de elevada homologia: $\alpha 2A$, $\alpha 2B$, e $\alpha 2C$ (SCOFIELD; DEUPREE; BYLUND, 2002; SMALL *et al.*, 2006). Estes receptores têm uma função relevante na regulação da liberação de neurotransmissores a partir de nervos simpáticos e de neurônios adrenérgicos no sistema nervoso central. Receptores $\alpha 2$ -adrenérgicos modulam a neuro transmissão, suavizam a contração muscular e atuam na termorregulação (RUFFOLO; HIEBLE, 1994).

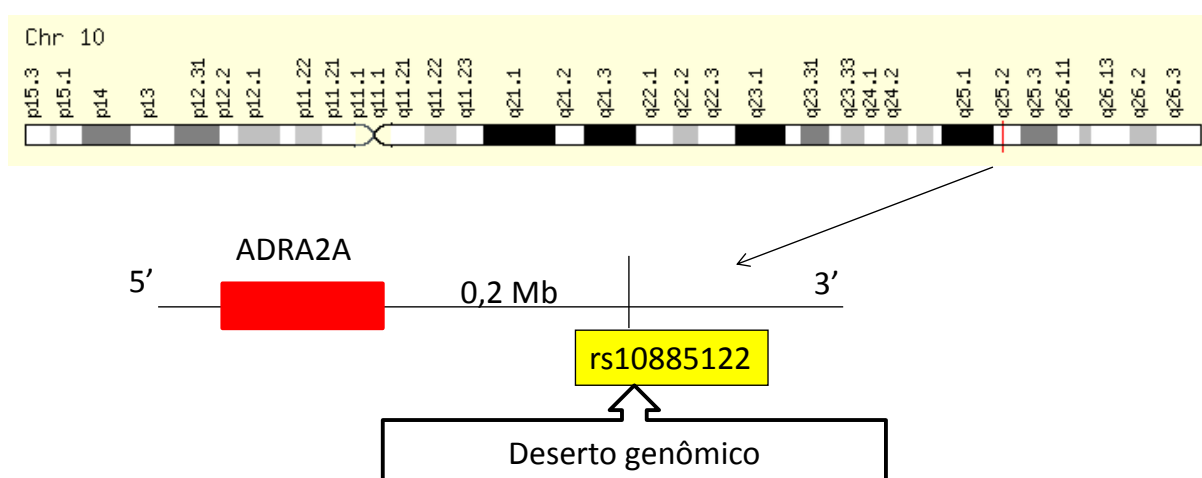


FIGURA 9 – LOCALIZAÇÃO DO GENE *ADRA2A* NO CROMOSSOMO 10

A marcação da figura indica o braço longo (q) do cromossomo 10, na posição 25.2.

FONTE: Adaptado de (DUPUIS *et al.*, 2010; GENECARDS, 2014b).

A norepinefrina é responsável por múltiplos efeitos no organismo e atua como hormônio após ser liberados da medula adrenal juntamente com a epinefrina, e como neurotransmissor quando liberado pelo sistema nervoso central e simpático. Possui funções importantes no sistema cardiovascular, muscular, hepático e tecido adiposo e no controle de todo o metabolismo (RUFFOLO; HIEBLE, 1994). A norepinefrina inibe a liberação de insulina pelo pâncreas através de três efeitos principais (MCDERMOTT; SHARP, 1993; SEQUIST *et al.*, 1994; SHARP, 1996; LANG, 1999). Os três efeitos são: (1) ativação de canais de potássio, ATP-dependente primariamente (PETIT; LOUBATIERES-MARIANI, 1992) e de baixa condutância insensíveis a sulfoniuréia (RORSMAN *et al.*, 1991), para hiperpolarizar a célula. Isto previne ou reverte a despolarização e conseqüentemente reduz a abertura de canais de cálcio acionados por diferença de voltagem, os quais ao abrirem aumentam a concentração intracelular de Ca^{++} , fator responsável pela

liberação de insulina (figura 10, painel B); (2) Inibição das adenilatos ciclases prevenindo o aumento do estímulo de liberação de insulina; e (3) o efeito distal que ocorre posteriormente ao aumento de cálcio intracelular para inibir a exocitose (figura 10, painel B), de maneira semelhante a serotonina no SNC (BLACKMER *et al.*, 2001) e endotelina nos lactotrofos pituitários (ANDRIC *et al.*, 2005). Existe uma concordância geral de que o receptor α_{2A} -adrenérgico é o mediador primário dos efeitos inibitórios da norepinefrina (ANGEL; NIDDAM; LANGER, 1990; NIDDAM *et al.*, 1990; PETERHOFF *et al.*, 2003; HU, X. *et al.*, 2005), mas existe evidência que o receptor α_{2C} -adrenérgico pode ter um pequeno papel (PETERHOFF *et al.*, 2003).

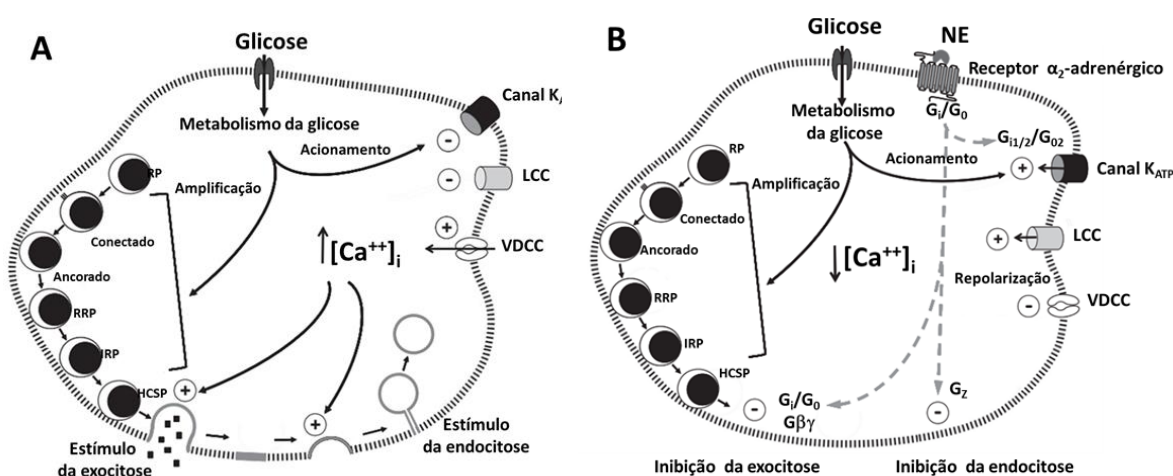


FIGURA 10 - DEMONSTRAÇÃO ESQUEMÁTICA DO MECANISMO DA INIBIÇÃO DA LIBERAÇÃO DE INSULINA PELA NOREPINEFRINA

Painel A. Estímulo da secreção de insulina pela glicose. O metabolismo da glicose estimula a liberação de insulina pelo fechamento de canais de potássio ATP-dependentes (K_{ATP}) e de baixa condutância (LCC - *Low-Conductance K⁺ Channel*), despolarizando a célula, e elevando a concentração intracelular de cálcio ($[Ca^{++}]_i$). Isto é referido como ativação da via de acionamento. A via de amplificação é ativada de modo crescente pelo metabolismo da glicose com o passar do tempo pelo acúmulo de sinal ou sinais ainda desconhecidos da mitocôndria, em conjunto com o cálcio intracelular ainda alto. Esta via aumenta o fluxo de grânulos do pool de reserva (RP – *reserve pool*) para o estado de liberação imediata onde, em uma célula ativada, eles sofrem exocitose. As duas vias são consideradas responsáveis pela 1^o e 2^o fase de secreção da insulina estimulada por glicose, respectivamente. As concentrações elevadas de cálcio também iniciam a endocitose compensatória necessária. RRP (*readily releasable pool*); IRP (*immediately releasable pool*); HCSP (*highly Ca⁺⁺-sensitive pool*); VDCC (canal de cálcio voltagem-dependente).

Painel B. Efeito inibitório de insulina estimulado pela glicose pela norepinefrina. A norepinefrina (NE) inibe a liberação de insulina de duas maneiras, e ambas envolvendo proteínas G sensíveis a pertusis, proteínas G_i e G_o . Em uma, NE abre canais K_{ATP} para hiperpolarizar a célula, e neste mecanismo, $G_{i1/2}$ e G_{o2} são requeridos para o completo efeito nos canais K_{ATP} . No outro, a NE inibe a liberação através das subunidades $\beta\gamma$ das proteínas G (G_i e/ou G_o) que inibem diretamente uma proteína do complexo SNARE envolvido na exocitose. NE inibe a endocitose via ativação de G_z .
 FONTE: Adaptado de (STRAUB; SHARP, 2012).

A inibição excessiva da secreção de insulina pode ser causa de diabetes. Alguns autores sugerem que anormalidades na expressão ou função do gene

ADRA2A pode ser um fator que contribuiria para a secreção deficiente de insulina presente no DM2 (RODRIGUEZ-PENA *et al.*, 1997).

Os primeiros estudos a evidenciar a relevância do gene *ADRA2A* como elemento causal do diabetes foi realizado em animais, a super expressão de *ADRA2A* resultava em intolerância à glicose (DEVEDJIAN *et al.*, 2000), enquanto camundongos com o gene *ADRA2A* mutagenizado (*ADRA2A-knocked out*) apresentavam aumento da secreção de insulina (FAGERHOLM *et al.*, 2004).

Em humanos, Rosengren e colaboradores (2010) demonstraram que a super expressão de receptores α_2 -adrenérgicos contribui para o DM2. Alguns estudos (MICHEL *et al.*, 1999; BOESGAARD *et al.*, 2010; ROSENGREN *et al.*, 2010) apontam para a avaliação do produto gênico de *ADRA2A* (receptor α_2 -adrenérgico) na causa de algumas formas de diabetes.

Rosengren e colaboradores (2010) utilizando abordagem *tagging SNP* identificaram 19 polimorfismos em regiões codificantes desprovidas de *introns* no gene *ADRA2A* ou em regiões próximas, sendo que cinco deles são monomórficos e um está em frequência muito baixa. Entre eles, o rs553668 que se localiza na região 3'UTR do gene *ADRA2A*, foi associado à secreção de insulina (ROSENGREN *et al.*, 2010; BO *et al.*, 2012) e ao risco para DM2 (ROSENGREN *et al.*, 2010; TALMUD *et al.*, 2011; LI, H. *et al.*, 2012; CHEN *et al.*, 2013).

Um estudo de meta-análise de mais de 21 estudos de associação genômica ampla e replicação em mais de 118000 indivíduos identificou associação do rs10885122 com baixas concentrações de glicose. Este polimorfismo está localizado em uma região de “deserto genômico”, aproximadamente 0,2 Mb de distância do gene *ADRA2A* (DUPUIS *et al.*, 2010). O polimorfismo rs10885122 foi identificado pela sua associação com glicemia em jejum, mas não com DM2 (DUPUIS *et al.*, 2010; TALMUD *et al.*, 2011), e com a redução da liberação de insulina estimulada por glicose (BOESGAARD *et al.*, 2010).

Talmud e colaboradores (2011) encontraram associação do rs553668 com glicemia de jejum e risco para o DM2 e não encontraram nenhuma associação significativa com rs10885122. Estes autores também avaliaram o efeito combinado dos polimorfismos rs10885122 e rs553668 e demonstraram que estes polimorfismos não estão em desequilíbrio de ligação, ou seja, seus efeitos são independentes. Adicionalmente, como o gene *TCF7L2* é o mais associado ao DM2 e se encontra 1,8 Mb a montante do gene *ADRA2A* no cromossomo 10, os autores avaliaram se o

rs7903146 no gene *TCF7L2* atenuaria a associação observada para o rs553668 no gene *ADRA2A* e o DM2, fornecendo evidências de associações independentes.

Wagner e colaboradores (2011) observaram associação significativa entre a conversão da pró-insulina à insulina em jejum e o rs10885122 do gene *ADRA2A* em indivíduos não diabéticos com risco aumentado para DM2 (histórico familiar de DM2, histórico de diabetes gestacional, intolerância a glicose ou com excesso de peso). Porém, os autores mencionam que a frequência do AMF é baixa (12%) para estabelecer relação plausível.

Em síntese, os estudos que avaliaram o polimorfismo rs10885122 do gene *ADRA2A* não identificaram associação ao DM2 (DUPUIS *et al.*, 2010; HU, C. *et al.*, 2010; LIU, C. *et al.*, 2011; REES *et al.*, 2011; TALMUD *et al.*, 2011; FLOREZ *et al.*, 2012; FUJITA *et al.*, 2012; CHEN *et al.*, 2013), mas encontraram associação com alterações da glicemia em indivíduos não diabéticos (DUPUIS *et al.*, 2010; RENSTROM *et al.*, 2011) ou insulinemia (BOESGAARD *et al.*, 2010; WAGNER *et al.*, 2011) (ANEXO IV).

3 JUSTIFICATIVA

O *Diabetes mellitus* (DM) é a disfunção endócrina mais comum, afetando em torno de 170 milhões de indivíduos mundialmente, com projeção para atingir 366 milhões no ano de 2030 (WILD *et al.*, 2004).

O Diabetes mellitus tipo 2 (DM2), a forma mais comum da patologia, está rapidamente emergindo como um dos maiores desafios globais para a saúde pública do século 21. Esta epidemia também deverá provocar um aumento acentuado nas complicações associadas com diabetes, tais como doença cardíaca isquêmica, acidente vascular cerebral, neuropatia, retinopatia e nefropatia. Adicionalmente à falência das células β -pancreáticas, o principal evento patofisiológico que contribui para o desenvolvimento do DM2 é a resistência dos tecidos alvos à insulina, que está usualmente associada à secreção anormal da insulina (GINSBERG, 2000).

O Brasil se encontra entre os 10 países do mundo com maior prevalência de DM2, aproximadamente 7,6% (MALERBI; FRANCO, 1992; WILD *et al.*, 2004).

A epidemia do DM2 observada nos últimos anos é indicação da relevância de fatores ambientais para o desenvolvimento do DM, em particular, a obesidade e sedentarismo, que são fatores de risco muito consolidados para a patologia. Embora seja conhecido que o principal fator associado ao aumento da prevalência de diabetes é o resultado da mudança do estilo de vida e da dieta nas últimas décadas, existem também evidências conclusivas para a predisposição genética para esta doença complexa (BARROSO, 2005).

Evidências epidemiológicas, observacionais e experimentais (PYKE; THEOPHANIDES; TATTERSALL, 1976; VISWANATHAN *et al.*, 1985; NEWMAN *et al.*, 1987; KNOWLER *et al.*, 1990) sugerem a função de genes no desenvolvimento do DM2, incluindo variação étnica na prevalência do diabetes e associação de certos polimorfismos genéticos e susceptibilidade para o diabetes. Os genes candidatos são usualmente examinados devido ao seu potencial ou conhecida função em vias metabólicas relacionadas ao diabetes (BARROSO, 2005) ou metabolismo da glicose (BARROSO *et al.*, 2003), sua posição relativa à interação com outros genes reconhecidos como associados, como o gene *CAPN10* no cromossomo 2 (EVANS *et al.*, 2001) e seu envolvimento no diabetes da maturidade de início precoce (MODY

- *maturity-onset diabetes of Young*) (LOVE-GREGORY, L. D. *et al.*, 2004; SILANDER *et al.*, 2004; WEEDON *et al.*, 2005; WINCKLER *et al.*, 2005) ou outras formas de diabetes mendeliana (MINTON *et al.*, 2002).

A identificação de genes envolvidos na predisposição do DM2 pode fornecer subsídios para um melhor entendimento da patogênese da doença e resultar em melhor prevenção, diagnóstico e tratamento. Com o advento de estudos de associação genômica ampla, numerosas variantes de risco têm sido identificadas como candidatos para conferir susceptibilidade para o DM2, mas a maioria deles apenas com um efeito modesto (FRAYLING, 2007).

A seleção de genes candidatos para este trabalho tem como base sua função biológica relacionada: (1) ao risco ambiental, e a obesidade (*FTO*) e (2) a regulação da secreção de insulina (*TCF7L2*, *ABCC8*, *SLC2A2* e *ADRA2A*) (figura 11).

A figura 11 resume o racional do projeto, alocando os sítios em estudo no contexto da fisiologia celular da regulação da homeostasia da glicose.

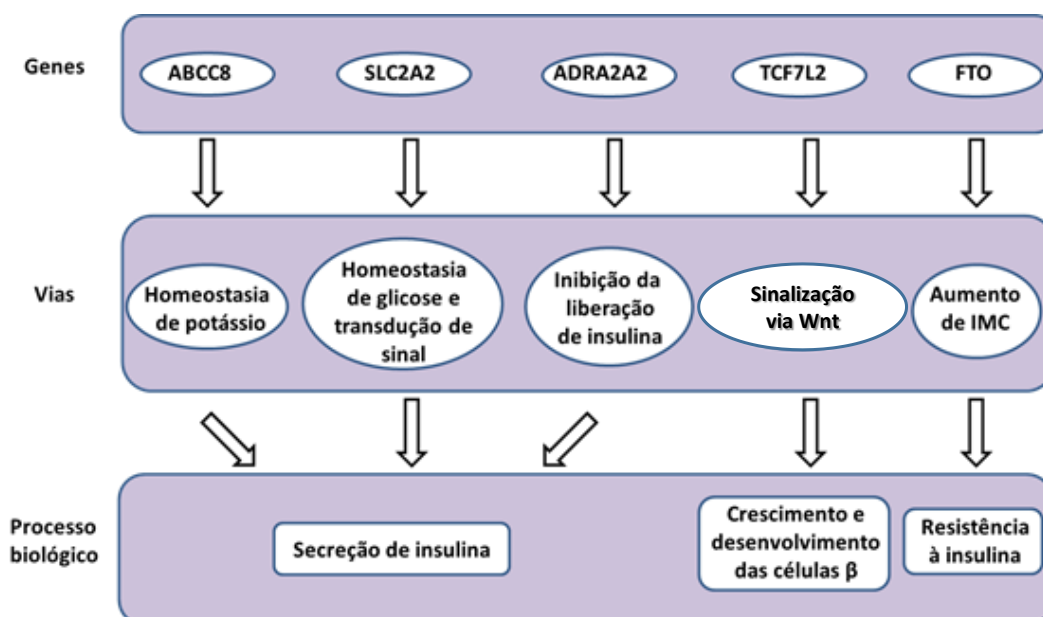


FIGURA 11 - GENES EM ESTUDO E VIAS METABÓLICAS ASSOCIADAS A DISFUNÇÃO DAS CÉLULAS β -PANCREÁTICAS E RESISTÊNCIA À INSULINA

Estes genes são designados para vias e processo biológico, tal como descrito no texto. Abreviações: *ABCC8* (*ATP-binding cassette, sub-family C, member 8*; cassete de ligação ao ATP, sub família C, membro 8; gene associado a modulador dos canais de potássio sensíveis a ATP e a liberação de insulina); *SLC2A2* (*Solute carrier family 2, facilitated glucose transporter, member 2*; família de transportador de soluto 2 e transportador de glicose facilitada membro 2; gene associado ao transporte de glicose facilitada na células beta das ilhotas do pâncreas), *ADRA2A* (*Adrenoceptor alpha 2a*; adrenoceptor alfa 2a; gene associado a proteína G e regulação de neurotransmissores); *TCF7L2* (*Transcription factor 7-like 2*; fator de transcrição 7 como 2; gene associado a homeostase da glicose), *FTO* (*Fat Mass and Obesity Associated*; gene associado à massa corporal e da obesidade), IMC (índice de massa corpórea).

FONTE: Adaptado de (WOLFS *et al.*, 2009).

A susceptibilidade humana às doenças herdadas está mais comumente associada com polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs - *single nucleotide polymorphisms*) (WANG, Z.; MOULT, 2001). Devido a sua alta frequência nas populações humanas e facilidade de sua análise, os polimorfismos têm sido utilizados em estudos de associação tipo caso-controle para identificar a susceptibilidade de genes para muitas doenças (OZAKI *et al.*, 2002; HELGADOTTIR *et al.*, 2004; CONNELLY *et al.*, 2006; SHEN *et al.*, 2007; SUN *et al.*, 2007; WANG, L.; LUHM; LEI, 2007; ZHU *et al.*, 2007; BOUATIA-NAJI *et al.*, 2008). Embora os polimorfismos constituam uma ferramenta poderosa para a pesquisa genética, torna-se aparente a dificuldade para a genotipagem de milhares de polimorfismos para estudos de associação tipo caso-controle em grande escala. Métodos com alta produtividade, acurácia e custo-efetivo para a genotipagem de polimorfismos se tornaram muito populares nos últimos anos (DEARLOVE, 2002; JENKINS; GIBSON, 2002; OHNISHI, 2002; TSUCHIHASHI; DRACOPOLI, 2002; SHEN; LUO; WANG, 2006; LEE, 2007). Uma técnica conveniente para genotipagem com número moderado de marcadores nestes tipos de estudo é a plataforma ® TaqMan (Applied Biosystems; Foster City, CA), que utiliza reação de amplificação em cadeia da polimerase e discriminação alélica de forma fácil e eficiente, gerando dados de genótipo de uma maneira custo-efetiva (SCHLEINITZ; DISTEFANO; KOVACS, 2011).

Neste contexto resolvemos estudar vários genes e seus polimorfismos (*FTO* rs9939609 e rs8050136), (*TCF7L2* rs7903146 e rs12255372), (*ABCC8* rs3758947), (*SLC2A2* rs5393) e (*ADRA2A* rs10885122) utilizando a plataforma ® TaqMan para a genotipagem.

4 OBJETIVO GERAL

Estudar variações genéticas associadas ao *Diabetes* tipo 2 e correlacionar com biomarcadores de controle glicêmico, perfil lipídico e função renal.

4.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar a frequência dos polimorfismos dos genes *FTO* (SNPs rs9939609 e rs8050136), *TCF7L2* (SNPs rs7903146 e rs12255372), *SLC2A2* (SNP rs5393), *ABCC8* (SNP rs3758947) e *ADRA2A* (SNP rs10885122) em pacientes com *Diabetes mellitus* tipo 2 e indivíduos saudáveis (controles).
- Identificar as frequências genóticas e alélicas de variações genéticas associadas ao diabetes tipo 2 em uma amostra da população brasileira.
- Correlacionar as variações genéticas nos grupos estudados com biomarcadores de controle glicêmico, perfil lipídico e função renal.
- Associar as variações genéticas em estudo com as características dos pacientes estudados e biomarcadores séricos.

5 MATERIAL E MÉTODOS

Este projeto foi submetido pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Paraná – Setor de Ciências da Saúde/SCS e foi aprovado sob o CAAE: 05335612.4.0000.0102 com número de parecer 170094 na Plataforma Brasil (Anexo V).

5.1 AMOSTRA POPULACIONAL

Uma amostra de 241 indivíduos, classificados em diabéticos tipo 2 (Grupo DM2, n=120) e indivíduos saudáveis (Grupo Controle, n=121), sem diabetes, foram estudados.

Apenas participaram da pesquisa, os pacientes que não manifestarem objeção à proposta científica, através de assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido autorizado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos do Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná.

5.1.1 Critérios para caracterização da amostra

Este projeto é descrito como um estudo tipo caso-controle em uma população brasileira.

Os critérios para caracterização destes grupos foram:

- Grupo pacientes diabéticos tipo 2 (DM2): foram caracterizados como DM2 aqueles que se enquadraram nos critérios da Sociedade Americana de Diabetes (ADA 2013) e Sociedade Brasileira de Diabetes (SBD 2012-13).
- Grupo controle (CTRL, indivíduos saudáveis): foi obtido junto ao banco de sangue do Hospital de Clínicas da UFPR considerando os critérios de glicemia em jejum <100 mg/dL e ausência de quaisquer outras patologias conhecidas, reportadas pelo paciente ou identificadas no processo de doação de sangue.

As amostras de sangue total e soro foram obtidas durante os exames de rotina, conforme o protocolo do serviço de atendimento aos pacientes do laboratório de Análises Clínicas do HC (Unidade de Diabetes do Serviço de Endocrinologia e Metabologia do Hospital de Clínicas da UFPR- SEMPR) ver anexo VI, não sendo necessária coleta específica para este projeto. Os grupos em estudo foram pareados por sexo. Os dados antropométricos, clínicos e laboratoriais dos pacientes foram obtidos nos prontuários do Serviço do Hospital de Clínicas e pela entrevista do pesquisador.

A criação do biorepositório foi baseada na Portaria N° 2.201, de 14 de setembro de 2011.

5.2 QUANTIFICAÇÃO DOS BIOMARCADORES

A amostra de soro (Vacuette com gel separador, Greiner Bio One) foi utilizada nas análises. Alíquotas das amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 3200 x g (Centrífuga 1420 – *Eppendorf*) e após centrifugação, separadas em alíquotas (~1,5mL) e mantido em freezer a -20°C até a realização das análises. Amostras hemolisadas, lipemicas e ictéricas foram excluídas de todos os ensaios. Sangue total (Vacuette EDTAK₃, Greiner) foi utilizado para os ensaios de HbA1C.

Dosagens bioquímicas como marcadores de função renal, perfil lipídico e processo inflamatório (tabela 2) foram realizadas em equipamento abbott – Architect Ci8200, no laboratório de Imunoquímica da Unidade de Apoio e Diagnóstico do Hospital de Clínicas.

TABELA 2 - CARACTERÍSTICAS DA METODOLOGIA EMPREGADA PARA A QUANTIFICAÇÃO DOS BIOMARCADORES EM ESTUDO

Dosagem	Princípio do Método	CVa (%)	Intervalo de Referência
1,5 anidroglicitol	Enzimático Glycomark	3,4	>10 µg/mL
Ácido úrico	Uricase, 4-aminoantipirina (4-AAP), ácido 2,4,6-tribromo-3-hidroxibenzóico	1,6	2,6 – 6,0 mg/dL
Albumina	Reação com verde de bromocresol	1,3	3,5 –5,0 g/dL
Colesterol Total	Enzimático colorimétrico com colesterol esterase, colesterol oxidase e peroxidase (Reação de Trinder)	1,3	<200 mg/dL
Creatinina	Picrato alcalino cinético	3,2	0,6–1,1 mg/dL
Glicose	Hexoquinase	1,71	60-100 mg/dL
HbA1C	Imunoturbidimétrico	0,74	<6,5%
HDL-colesterol	Ensaio homogêneo enzimático colorimétrico	5,1	Desejável > 60 mg/dL Baixo < 45 mg/dL
LDL-colesterol*	Cálculo pela equação de Friedewald		<130 mg/dL
Proteínas Totais	Reação do Biureto	1,4	6,0 – 8,0 g/dL
Triglicerídeos	Ensaio enzimático com lipase, glicerol-3-fosfato oxidase e peroxidase com Reação de Trinder	1,6	< 150 mg/dL
Uréia	Ensaio cinético com uréase, GLDH e NADH.	1,1	15 – 44 mg/dL

Determinações realizadas com reagentes, padrões e calibradores da Abbott, em sistema automatizado Architect Ci8200 (Abbott Diagnóstica Laboratórios do Brasil) empregando-se reagentes, calibradores e controles fornecidos pelo fabricante.

CVa, coeficiente de variação analítica interensaio, em porcentagem, para soro controle com concentração “normal”.

*Equação de Friedewald, LDL-colesterol = Colesterol total – HDL-colesterol – Triglicérides/5.

5.3 ANÁLISES MOLECULARES

5.3.1 Variabilidades genéticas em estudo

Na tabela 3 são apresentados os genes e os polimorfismos genéticos estudados.

TABELA 3 – CARACTERIZAÇÃO DOS POLIMORFISMOS EM ESTUDO

Designação OMIM	Cromossomo Posição	Localização Região	Gene	Polimorfismos	
610966	16q12.2	Intron 1	<i>FTO</i>	rs9939609	A/T
	16q12.2	Intron 1	<i>FTO</i>	rs8050136	A/C
602228	10q25.2-q25.3	Intron 3	<i>TCF7L2</i>	rs7903146	C/T
	10q25.2-q25.3	Intron 4	<i>TCF7L2</i>	rs12255372	G/T
104210	10q24-q26	Intergênica	<i>ADRA2A</i>	rs10885122	G/T
138160	3q26.1-q26.2	Promotora	<i>SLC2A2</i>	rs5393	G/T
600509	11p15.1	Promotora	<i>ABCC8</i>	rs3758947	A/G

rs: dbrs: reference SNP database

OMIM, *Online Mendelian Inheritance in Man*®.

FONTE: (NCBI, 2013b; OMIM, 2014)

5.3.2 Isolamento do DNA genômico

O DNA genômico foi extraído a partir do sangue total (Vacuette EDTAK₃, Greiner) com o reagente *Blood Genomic Prep Mini Spin* (GE Healthcare, art. 28-9042-65) e também a partir do método de *salting out* modificado (LAHIRI; NURNBERGER, 1991).

5.3.3 Determinação da concentração de DNA genômico

A quantificação do DNA genômico foi realizada por espectrofotometria em 260 nm e 280 nm (*NanoDrop; Thermo Scientific*). Amostras que apresentaram concentrações inferiores a 20 ng/μL e razão A_{260}/A_{280} menor que 1,7 ou superior a 2,1 o que caracteriza contaminação e baixa qualidade da amostra, foram extraídas novamente até atingirem a qualidade e concentração otimizadas.

A qualidade do DNA foi avaliada também por eletroforese em gel de agarose a 1,5% em tampão TBE 1X (Tris 10,781 μg/mL, ácido bórico 5,5 μg/mL, EDTA 0,744 μg/mL) corada com brometo de etídeo (Concentração final 0,666 μg/mL e registro por fotodocumentação (L-Pix Molecular Image, Locus Biotecnologia).

Todas as amostras foram diluídas a uma concentração de 100 ng/ μ L com água ultrapura e estocadas em freezer a -20°C. Para as análises de genotipagem com o sistema *TaqMan*[®], as amostras foram diluídas à concentração final de 20 ng/ μ L com água ultrapura estéril.

As amostras foram estocadas em freezer a -20°C.

5.3.4 Reação de PCR em tempo real com sondas fluorescentes (TAQMAN)

As reações foram realizadas conforme preconizado pelo fabricante do reagente (*Applied Biosystems*, Foster City, CA, Estados Unidos) em equipamento de PCR em tempo real *StepOnePlus* (*Applied Biosystems*) disponível no Departamento de Bioquímica da UFPR. O procedimento foi realizado com as etapas descritas na sequência.

Em cabine de fluxo laminar, para evitar contaminação, os ensaios *TaqMan* foram realizados em placas de 96-poços. Em cada placa foram adicionados dois controles negativos (*NTC: no template control*) os quais continham apenas o *mix* de reação e água (sem DNA). Os grupos DM2 e CTRL foram ensaiados de forma aleatória, na mesma placa. Na tabela 4 estão descritas as condições de ensaio utilizadas para a PCR tempo real.

As sondas fluorescentes *TaqMan* validadas (*Applied Biosystems*) para os genes em estudo foram: *ADRA2A* rs10885122 (C_175459_10); *ABCC8* rs3758947 (C_2991268_50); *FTO* rs9939609 (C_30090620_10); *FTO* rs8050136 (C_20311259_10); *SLC2A2* rs5393 (C_11676794_10). *TCF7L2* rs7903146 (C_29347861_10) e *TCF7L2* rs12255372 (C_291484_20). As sequências de nucleotídeos das sondas utilizadas no trabalho, estão no site da *Applied Biosystems* e são informadas através do código citado acima.

TABELA 4- CONDIÇÕES OTIMIZADAS PARA A REAÇÃO DE PCR EM TEMPO REAL

Reagentes	Volume para reação de 6µL	Concentração final
SNP genotyping assay mix (20x)	0,3 µL	1 X
Master Mix (2X)	3,0 µL	1 X
Água ultrapura estéril	1,7 µL	-
DNA (20 ng/µL)*	1,0 µL	3,33 ng/µL
Ciclos térmicos	1 ciclo Pré-PCR 60°C → 30 seg. 1 ciclo 95°C → 10 min. 55 ciclos: 95°C → 15 seg. 60°C → 1 min. 1 ciclo Pós-PCR 60°C → 30 seg.	-

Mix, Master Mix (DNA polimerase, Mg⁺⁺, tampão, ROX, ativadores), TaqMan® Genotyping Master Mix, código:4371355, composição: A enzima Ampli Taq gold DNA Polimerase inicia atividade após o primeiro ciclo de 95°C (ativação da enzima) e a referência passiva interna ROX normaliza a fluorescência nos diferentes poços da placa.

*Para os polimorfismos do gene *FTO*, rs9939609 e rs8050136, foram utilizados o dobro do volume de DNA (2,0 µL; concentração final = 6,7 ng/µL) para otimizar a reação.

FONTE: O autor (2014)

Exemplos das discriminações alélicas observada nos ensaios TaqMan para os polimorfismos em estudo estão apresentadas no anexo I. Todas as genotipagens consideradas neste trabalho apresentaram qualidade superior a 95% identificada pelo software do sistema StepOnePlus.

5.4 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As variáveis contínuas foram analisadas para normalidade com o teste de Kolmogorov-Smirnov. A verificação de *outliers* foi realizada pelo método gráfico disponível no programa Statistica 8.0.

Variáveis com distribuição normal foram comparadas pelo teste “t” de Student para amostras não pareadas (bidirecional) ou análise de variância (ANOVA) quando a comparação envolvia mais de dois grupos, sendo os valores expressos em média e desvio padrão.

As variáveis que não apresentaram distribuição normal foram comparadas com o teste U de Mann-Whitney, ou o teste de Kruskal-Wallis (mais de 2 grupos), sendo os valores apresentados como mediana e intervalo interquartil (25%-75%).

Para as variáveis categóricas foram utilizados o teste do Chi-quadrado (χ^2) ou o teste Exato de Fischer bidirecional, conforme apropriado.

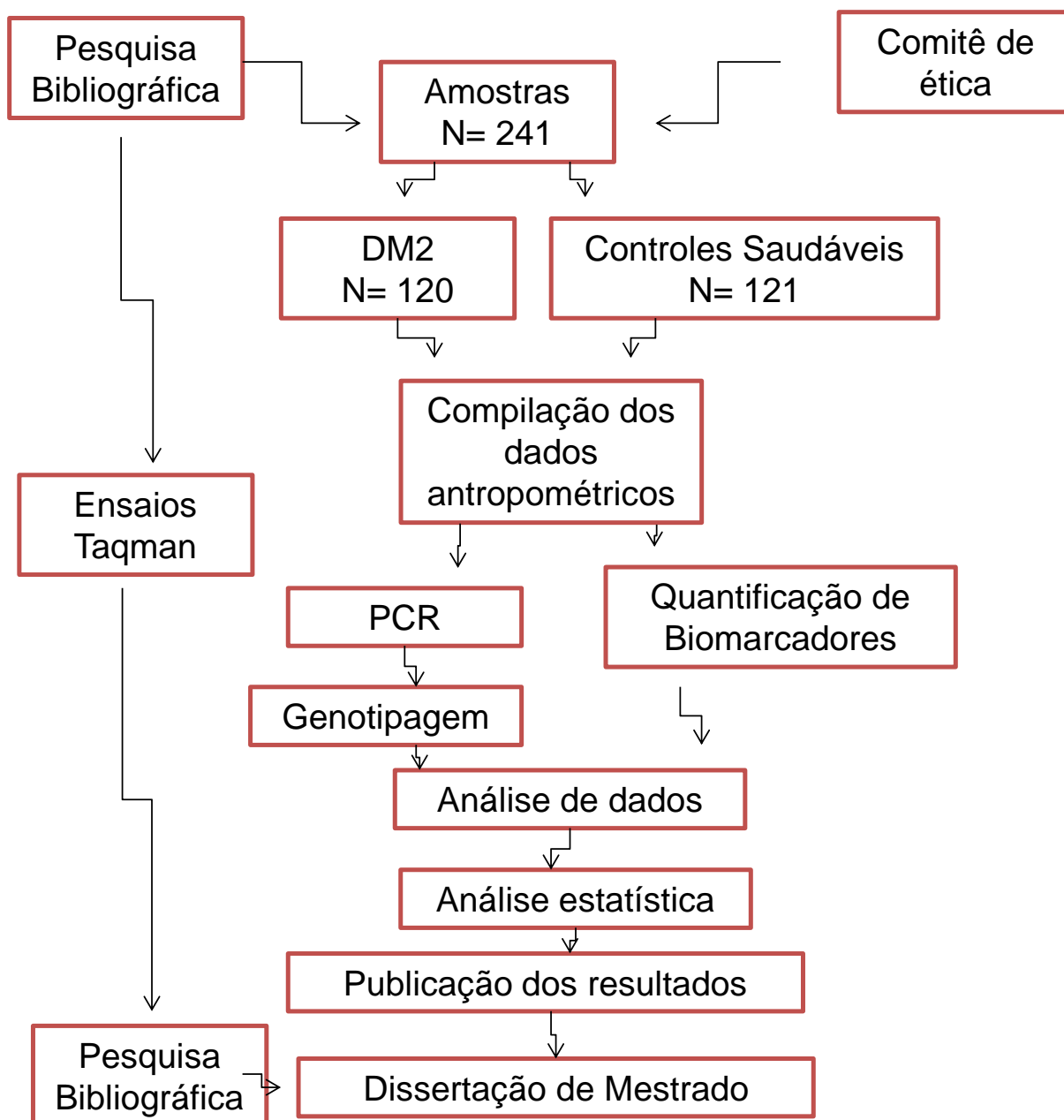
Análises de correlação foram realizadas com os testes descritos por Pearson (variáveis com distribuição normal) ou Spearman (variáveis sem distribuição normal). Para as análises de correlação, os genótipos foram caracterizados como 1 (homozigoto usual); 2 (heterozigoto) e 3 (homozigoto raro) em todas as análises.

O programa Statistica para windows 8.0 (StatSoft Inc, Tulsa OK, USA) foi utilizado nas análises de dados.

A verificação do equilíbrio de Hardy-Weinberg, cálculos das frequências genotípicas e alélicas, bem como o intervalo de confiança de 95% (IC95%) para os alelos de menor frequência (AMF) foram calculadas com o programa DeFinetti (<http://ihg.gsf.de/cgi-bin/hw/hwa1.pl>). Para as comparações das frequências alélicas com outras populações, foi considerado semelhante quando a frequência do AMF (menos frequente) se encontra dentro do limite de 95% do intervalo de confiança. Frequências acima ou abaixo do 95%IC foram consideradas diferentes.

Uma probabilidade inferior a 5% ($P < 0,05$) foi considerada significativa em todas as análises.

5.5 FLUXOGRAMA DO TRABALHO



6 RESULTADOS E DISCUSSÕES

6.1 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA

A estatística descritiva dos parâmetros antropométricos para os grupos em estudo (CTRL e DM2) é apresentada na tabela 5. A etnia Euro-Brasileira predomina na amostra (85%) ou seja uma população mista. Os resultados do presente estudo refletem primariamente este segmento populacional.

TABELA 5.- CARACTERIZAÇÃO DOS GRUPOS

Parâmetros	Controle (n=121)	DM2 (n=120)	P
Idade (anos)	39,5±14,4	61,9±9,8	<0,001
Homens/mulheres, n	61/60	60/60	0,949*
Peso (kg)	72,9±14,4	79,1±15,1	0,002
Altura (m)	160,4±6,0	163,7±9,9	0,151
IMC (kg/m ²)	23,1±3,7	29,6±5,5	<0,001
Hipertensão, %	16,5	66,0	<0,001
Tabagismo, %	--	70,0	
Doença arterial coronariana, %	--	34,0	
História familiar de diabetes, %	--	61,7	
História familiar de obesidade, %	--	35,0	

Os valores são média±1-desvio padrão ou n

P, probabilidade, teste t-Student

*teste do Chi-quadrado

Tabagismo, ex-fumantes + fumantes

--, sem informação disponível

FONTE: O autor (2014)

A idade dos pacientes com DM2 é significativamente maior quando comparado ao grupo controle (tabela 5). Este achado era esperado uma vez que o DM2 é uma patologia cujo prevalência aumenta após os 40 anos e média de idade semelhante também foi encontrada em uma pesquisa com pacientes de DM2 no Rio de Janeiro, cuja média de idade foi de 59 anos (CASTRO; MATOS; GOMES, 2006), enquanto que o perfil dos doadores de sangue do Hospital de Clínicas da UFPR (grupo controle) é representado por indivíduos mais jovens, com uma média de 39,5 anos, concordando com outra pesquisa realizada no HC-UFPR que encontrou perfil semelhante de idade com média de 36 anos para doadores de banco de sangue (UTIYAMA *et al.*, 2009).

O IMC, relacionado à obesidade, está de acordo com o esperado, valores médios ($29,6 \text{ kg/m}^2$) indicando sobrepeso e média de IMC semelhante também foi encontrada em uma pesquisa com pacientes de DM2 no Rio de Janeiro, cuja média de IMC foi de 28 kg/m^2 (CASTRO; MATOS; GOMES, 2006).

A obesidade e forte histórico familiar são fatores de risco associados ao diabetes tipo 2 (ADA, 2014b). Os pacientes em estudo com DM2 são obesos, hipertensos e apresentam alterações do perfil lipídico, como esperado. A obesidade ($\text{IMC}=29,6\pm 5,5$), idade ($61,9\pm 9,8$) e elevada prevalência de histórico familiar de diabetes (61,7%), fatores de risco observados em nosso estudo, também foram descritos de forma semelhante em outros estudos com população brasileira (MALERBI; FRANCO, 1992). King, Aubert and Herman (1998) reportaram que o número de diabéticos entre 45-64 anos é maior em países em desenvolvimento e a idade ≥ 65 anos em países desenvolvidos. O grupo DM2 apresentou os componentes da síndrome metabólica, entre eles: hipertensão (66%), obesidade e dislipidemia (tabela 5). A prevalência de hipertensão é maior nos diabéticos do que na população em geral, com uma proporção de até 60% na idade de 75 anos (HDS, 1993).

A estatística descritiva dos parâmetros bioquímicos para os grupos em estudo (CTRL e DM2) é apresentada na tabela 6. A etnia Euro-Brasileira predomina na amostra (85%). Os resultados refletem as características da amostra populacional estudada.

TABELA 6 - CONCENTRAÇÕES SÉRICAS DE PARÂMETROS BIOQUÍMICOS PARA OS GRUPOS EM ESTUDO

Parâmetros	Controle (n=121)	DM2 (n=120)	P
Glicemia de jejum (mg/dL)	92 (88-97)	136,5 (110-183)	<0,001*
1,5 AG (µg/mL)	21,3 (15,5-27,1)	8,5 (3,5-16,4)	<0,001*
HbA1C (%)	-	7,9±2,3	
Colesterol (mg/dL)	189,1±39,9	173,8±40,3	0,003
HDL-C (mg/dL)	47,2±12,2	42,8±13,1	0,008
LDL-C (mg/dL)	114,5±33,6	98,9±31,2	<0,001
Triglicérides (mg/dL)	130 (92-191)	146 (101-201)	0,267*
Proteína Total (g/dL)	7,3 (6,9-7,7)	7,2 (6,8-7,5)	0,187*
Albumina (g/dL)	4,2 (3,9-4,4)	3,9 (3,7-4,0)	<0,001*
Ácido úrico (mg/dL)	5,6±1,5	5,4±1,5	0,437
Creatinina (mg/dL)	0,8 (0,7-0,9)	0,9 (0,7-1,1)	0,002*
Uréia (mg/dL)	30,5 (25-36)	37,0 (28-48)	<0,001*

Os resultados são apresentados como média±1-Desvio Padrão ou mediana (intervalo interquartil).

P_t, probabilidade teste t-Student bidirecional.

P_u, probabilidade, teste U de Mann-Whitney.

-, dados não disponíveis.

FONTE: O autor (2014)

Para o grupo de DM2, as concentrações médias da glicemia, acima de 130 mg/dL, a HbA1C >7,0% e o 1,5AG (<10 µg/mL), indicam que o grupo DM2 em estudo contempla diabéticos com controle pobre da glicemia (tabela 6). As concentrações destes biomarcadores, suplantam os valores de corte supracitados, preconizados para caracterizar bom controle glicêmico, nos principais guidelines atuais (ADA, 2014, SBD 2013, VAN LEEUWEN, POELHUIS-LETH and BLADH, 2013). Embora o estudo em tela não tenha desenho experimental para avaliar o controle glicêmico em termos populacionais, é possível especular que se a amostra em estudo representa uma amostra da nossa população, nossos diabéticos carecem de melhor atenção quanto ao controle do processo patológico e conseqüentemente um melhor suporte para o tratamento. Este dado está em concordância com o estudo realizado por Viana e colaboradores (2013), que mostra que pacientes brasileiros com DM2 atendidos pelo SUS apresentam pobre controle glicêmico. O desenvolvimento de programas de Atenção Farmacêutica, voltados para o controle glicêmico do paciente com DM2, pode ser sugerido, como uma ferramenta efetiva para minimizar as complicações e melhorar a qualidade de vida destes indivíduos.

O DM2 está associado com alterações no perfil lipídico, no sentido aterogênico (*V Diretrizes Brasileiras em Dislipidemias, 2013*). As concentrações do colesterol total e LDL-C significativamente menores no grupo DM2 comparado à controles saudáveis, sugerem que os pacientes fazem uso extensivo de drogas

antilipemiantes. Também estes medicamentos podem ser os responsáveis pela concentração de triglicérides, reconhecidamente elevada no DM2, ao se mostrarem semelhantes entre os grupos (tabela 6). O HDL-C teve concentrações médias significativamente menores no grupo DM2, sugerindo maior risco de doença cardiovascular, como descrito em múltiplos estudos (SBC, 2013). Este parâmetro, portanto, captou melhor o risco deste grupo, associado ao perfil lipídico, possivelmente pela menor eficiência dos antilipemiantes em aumentar a concentração do HDL-C (SBC, 2013).

As concentrações de proteínas totais não diferiram entre os grupos em estudo e os valores observados sugerem pacientes com bom aporte alimentar. A redução significativa na albumina, mas discreta, pode sugerir que nos pacientes com DM2, uma pequena fração desta molécula está sendo perdida, pela associação da hipertensão com a microalbuminúria (ROSHAN; STANTON, 2013). Não é possível no presente estudo uma explicação com base em evidência, em relação a menor concentração de albuminúria, no grupo DM2, pela ausência de informações quanto à proteinúria ou microalbuminúria, parâmetros que recomendamos sejam analisados em futuros estudos com o mesmo desenho experimental.

As concentrações de ácido úrico não diferiram entre os grupos.

As concentrações de creatinina e ureia, biomarcadores de filtração glomerular, foram maiores no grupo com DM2, comparado a controles saudáveis (tabela 6). Dois fatores podem explicar estes achados. A idade significativamente maior dos pacientes com DM2 e o próprio diabetes estão associados à perda progressiva da função renal (MACISAAC; EKINCI; JERUMS, 2014). Também é relevante pontuar que as concentrações observadas destes marcadores, dentro do intervalo de referência, sugerem que os pacientes em estudo não apresentam lesão renal manifesta, preservando, portanto, a maior parte da função renal.

6.2 ANÁLISES MOLECULARES

As frequências genótípicas e alélicas para os polimorfismos em estudo estão apresentadas nas tabelas 7, 10, 13, 14 e 15.

As frequências genótípicas e alélicas dos genes (*FTO*, *TCF7L2*, *ABCC8*, *SLC2A2* e *ADRA2A*) para todos os polimorfismos em estudo (indivíduos DM2 e

controles) estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg ($P > 0,05$) (GUO; THOMPSON, 1992).

6.2.1 Gene *FTO*

As frequências genotípicas e alélicas para os polimorfismos rs9939609 e rs8050136 do gene *FTO*, as comparações entre os grupos são apresentados na tabela 7.

TABELA 7 - FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS DOS POLIMORFISMOS rs9939609 e rs8050136 DO GENE *FTO*, NA AMOSTRA EM ESTUDO

Polimorfismos		Controle (n= 121)	DM2 (n= 120)	P
(rs9939609)				0,776
T>A	T/T	54 (44,6)	50 (41,7)	
FTO	T/A	47 (38,8)	52 (43,3)	
	A/A	20 (16,5)	18 (15,0)	
Frequência do Alelo [95% IC]	A	36,0 [30,0-42,0]	37,0 [31,0-43,0]	0,870
(rs8050136)				0,753
C>A	C/C	53 (43,8)	50 (41,7)	
FTO	C/A	47 (38,8)	52 (43,3)	
	A/A	21 (17,4)	18 (15,0)	
Frequência do Alelo [95% IC]	A	37,0 [31,0-43,0]	37,0 [31,0-43,0]	0,980

Valores dos genótipos são n (%);

95% IC: Intervalo de confiança de 95%;

P, probabilidade, teste de χ^2 .

Equilíbrio de Hardy-Weinberg (teste de χ^2). SNP rs9939609 grupo controle ($P=0,085$) e DM2 ($P=0,463$). SNP rs8050136 grupo controle ($P=0,070$) e DM2 ($P=0,463$).

FONTE: O autor (2014)

Na tabela 8 estão demonstrados vários estudos de frequência alélica do gene *FTO* rs9939609 comparando com o presente estudo (negrito) e destacados os estudos com valores mais diferentes (sombreados).

TABELA 8 - COMPARAÇÕES ENTRE FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS DO POLIMORFISMO rs9939609 DO GENE *FTO* COM DADOS DA LITERATURA

<i>FTO</i> rs9939609			Genótipo (%)			Alelo (%)
Grupo étnico	Características	n	TT	TA	AA	A
Euro-brasileiros	DM2	120	41,7	43,3	15,0	37,0
	Saudáveis	121	44,6	38,8	16,5	36,0
Chineses Han		3.210	-	-	-	12,0
LI, H. <i>et al.</i> , 2008						
Britânicos brancos	DM1	7.647	36,0	48,0	16,0	40,0
	Saudáveis	7.156	37,0	48,0	15,0	40,0
FIELD <i>et al.</i> , 2007						
Afro-americanos	Diabetes	670	30,1	47,3	22,6	37,0
	Saudáveis	2.780	27,3	48,8	23,9	48,0
Branços	Diabetes	1.004	31,8	47,8	20,4	44,0
	Saudáveis	10.038	36,0	47,8	16,2	40,0
BRESSLER <i>et al.</i> , 2010						
Branca	Mulheres Diabéticas	936	34,6	46,3	19,1	41,9
	Mulheres saudáveis	935	38,3	44,1	17,6	39,8
Negra	Mulheres Diabéticas	365	30,8	44,2	25,0	41,6
	Mulheres saudáveis	749	31,9	46,9	21,2	42,0
Hispanica	Mulheres Diabéticas	139	54,0	38,1	7,9	26,6
	Mulheres saudáveis	276	49,8	38,9	11,3	29,5
Asiática Ilhas do Pacífico	Mulheres Diabéticas	77	64,9	30,0	5,2	19,5
	Mulheres saudáveis	163	69,9	26,4	3,7	18,0
SONG <i>et al.</i> , 2008						
Crianças Indianas	Peso normal	2.230	45,0	44,0	11,0	32,3
	Sobrepeso/obeso	896	41,0	44,0	15,0	36,9
DWIVEDI <i>et al.</i> , 2012						
Caucasianos	Obeso	2.819	-	-	-	43,0
	Não obeso	1.852	-	-	-	39,0
Asiático	Obeso	794	-	-	-	23,0
	Não obeso	1.845	-	-	-	20,0
Hispanico	Obeso	207	-	-	-	45,0
	Não obeso	518	-	-	-	37,0
Africano	Obeso	365	-	-	-	47,0
	Não obeso	749	-	-	-	45,0
PENG <i>et al.</i> , 2011						

Em negrito, dados obtidos neste estudo; DM2: diabetes *mellitus* tipo 2.

Sombreadas as frequências mais diferentes comparadas com o presente estudo.

-, dados não disponíveis.

Frequências genotípicas e alélicas para o rs9939609 não são diferentes ($P > 0,05$) entre os grupos na população estudada, sugerindo que este marcador não

esta associado ao DM2 na população em estudo. Para um estudo semelhante de indivíduos DM2 de Porto Alegre - RS, também não foi encontrada diferença significativa para este polimorfismo (STEEMBURGO *et al.*, 2012). Em chineses Han também não foi encontrado correlação deste polimorfismo com o diabetes (LI, H. *et al.*, 2008). Numa população de indianos do norte da Índia um estudo também não demonstrou associação com o DM2, porém demonstrou associação com a obesidade (CHAUHAN *et al.*, 2011). Não foi encontrada associação significativa entre os polimorfismo rs9939609 e o risco de desenvolver diabetes tipo 2 em uma meta-análise com a população do leste da Ásia (XI; MI, 2009).

Em um estudo do rs9939609 da população britânica entre indivíduos DM1 e controles uma associação significativa com obesidade infantil e DM2, mas sem correlação com DM1 (FIELD *et al.*, 2007). Bressler e colaboradores (2010), avaliando uma população de Caucasoides encontraram associação significativa do rs9939609 com o risco de desenvolver diabetes e a obesidade. Em Escoceses portadores do alelo A do polimorfismo rs9939609 foi associado o aumento do risco de DM2, também com o aumento em alterações lipídicas, bem como o infarto do miocárdio (DONEY *et al.*, 2009).

O genótipo homozigoto AA do rs9939609 foi associada a um maior risco de DM2, independentemente do IMC em um estudo da população francesa de indivíduos obesos e não obesos (LEGRY *et al.*, 2009).

Nosso resultado para este polimorfismo se alinha aqueles que não observaram associações com o DM2.

Na tabela 9 estão demonstrados vários estudos de frequência alélica do gene *FTO* rs8050136 comparando com o presente estudo (negrito) e destacados os estudos com valores mais diferentes (sombreados).

TABELA 9 - COMPARAÇÕES ENTRE FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS DO POLIMORFISMO rs8050136 DO GENE *FTO* COM DADOS DA LITERATURA

<i>FTO</i> rs8050136			Genótipo (%)			Alelo (%)
Grupo étnico	Características	n	CC	CA	AA	A
Euro-brasileiros	DM2	120	41,7	43,3	15,0	37,0
	Saudáveis	121	53,8	38,8	17,4	37,0
Afro-americanos	Diabetes	670	34,2	46,6	19,2	37,0
	Saudáveis	2.780	31,6	48,9	19,5	48,0
Branco	Diabetes	1.004	31,6	48,1	20,3	43,0
	Saudáveis	10.038	35,9	47,8	16,3	44,0
BRESSLER <i>et al.</i> , 2010						
Chineses Han		3.210	-	-	-	12
LI, H. <i>et al.</i> , 2008						
Branca	Mulheres Diabéticas	936	34,8	46,8	18,5	41,9
	Mulheres saudáveis	935	38,0	44,4	17,6	39,8
Negra	Mulheres Diabéticas	365	36,4	44,1	19,6	41,6
	Mulheres saudáveis	749	34,3	47,5	18,3	42,0
Hispânica	Mulheres Diabéticas	139	54,7	37,4	7,9	26,6
	Mulheres saudáveis	276	52,2	36,6	11,2	29,5
Asiática Ilhas do Pacífico	Mulheres Diabéticas	77	67,5	26,0	6,5	19,5
	Mulheres saudáveis	163	68,3	27,3	4,4	18,0
SONG <i>et al.</i> , 2008						
Crianças Indianas	Peso normal	2.230	45,0	44,0	11,0	32,8
	Sobrepeso/obeso	896	40,0	45,0	15,0	37,1
DWIVEDI <i>et al.</i> , 2012						
Caucasianos	Obeso	418	-	-	-	45,0
	Não obeso	2.270	-	-	-	39,0
Asiático	Obeso	77	-	-	-	20,0
	Não obeso	163	-	-	-	18,0
Africano	Obeso	365	-	-	-	42,0
	Não obeso	749	-	-	-	42,0
PENG <i>et al.</i> , 2011						

Em negrito, dados obtidos neste estudo; DM2: diabetes *mellitus* tipo 2.

Sombreadas as frequências mais diferentes comparadas com o presente estudo.

-, dados não disponíveis.

Para o rs8050136 as frequências genotípicas e alélicas não são diferentes ($P > 0,05$) entre os grupos na população estudada, sugerindo que este marcador não está associado ao DM2.

Em um estudo de coorte (caso-controle) multiétnico com mulheres diabéticas e não diabéticas pós menopausa nos Estados Unidos, este polimorfismo também não foi associado ao diabetes (SONG *et al.*, 2008). Também, não foi encontrada

correlação deste polimorfismo com o diabetes em um estudo da população de chineses Han (LI, H. *et al.*, 2008). Em Indianos do norte da Índia um estudo demonstrou associação com a obesidade, porém não demonstrou associação com o DM2 (CHAUHAN *et al.*, 2011). Em uma meta-análise com a população do leste da Ásia, não foi encontrada associação significativa entre os polimorfismo rs8050136 e o risco de desenvolver diabetes tipo 2 (XI; MI, 2009).

Em um estudo com a população coreana o polimorfismo rs8050136 do gene *FTO* foi significativamente associado com o peso, mas não com o IMC (SULL; LEE; JEE, 2013). A variante rs8050136 mostrou associação significativa com o risco de obesidade e as suas medidas de IMC, peso, circunferência da cintura e circunferência do quadril em crianças da Índia (DWIVEDI *et al.*, 2012). Foi confirmada forte associação do polimorfismo rs8050136 do gene *FTO* com a síndrome metabólica por meta-análise advinda de estudos de várias etnias (WANG, H. *et al.*, 2012). Foram analisadas 298 crianças multi-étnicas, o rs8050136 do *FTO* foi associado com o IMC e circunferência da cintura (KLIMENTIDIS *et al.*, 2011).

As frequências para o alelo menor (A; 95%IC: 30-43%) identificadas em nosso estudo são semelhantes para os dois polimorfismos do gene *FTO* (rs9939609 e rs8050136). A mesma similaridade também foi reportada em uma meta-análise (PENG *et al.*, 2011).

Nossa expectativa era encontrar uma associação entre os polimorfismos do gene *FTO* com o IMC ou peso dos pacientes, como sugerido em outros diferentes estudos supra mencionados. Neste estudo de triagem fica demonstrado que para a população em estudo os polimorfismos rs9939609 e rs8050136 do gene *FTO* não são marcadores para o DM2 ou associados com indicadores de obesidade. O efeito do tamanho amostral, desenhado para estudo de triagem, e a forma de seleção dos grupos são fatores que podem ter contribuído para esta conclusão, que precisa ser confirmada através de estudo com maior tamanho amostral.

6.2.2 Gene *TCF7L2*

As frequências genóticas e alélicas do gene *TCF7L2* com seus polimorfismos rs7903146 e rs12255372, bem como as análises para o equilíbrio de Hardy-Weinberg e as comparações entre os grupos encontram-se na tabela 10.

TABELA 10 - FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS DOS POLIMORFISMOS rs7903146 e rs12255372 DO GENE *TCF7L2* NA AMOSTRA EM ESTUDO

Polimorfismos		Controle (n= 121)	DM2 (n= 120)	P
(rs7903146)				0,130
C>T	C/C	62 (51,3)	50 (41,7)	
<i>TCF7L2</i>	C/T	43 (35,5)	58 (48,3)	
	T/T	16 (13,2)	12 (10,0)	
Frequência do Alelo	T	31,0	34,0	0,457
[95% IC]		[25,0-37,0]	[28,0-40,0]	
(rs12255372)				0,543
G>T	G/G	63 (52,1)	57 (47,5)	
<i>TCF7L2</i>	G/T	47 (38,8)	47 (39,2)	
	T/T	11 (9,1)	16 (13,3)	
Frequência do alelo	T	28,0	33,0	0,294
[95% IC]		[23,0-34,0]	[27,0-39,0]	

Valores dos genótipos são n (%);

95% IC: Intervalo de confiança de 95%;

P, probabilidade, teste de χ^2 .

Equilíbrio de Hardy-Weinberg (teste de χ^2). SNP rs7903146 grupo controle (P=0,063) e DM2 (P=0,415). SNP rs12255372 grupo controle (P=0,604) e DM2 (P=0,215).

FONTE: O autor (2014)

As tabelas 11 e 12 descrevem comparações entre as frequências genóticas e alélicas para os polimorfismos do gene *TCF7L2* em estudo.

TABELA 11 - COMPARAÇÕES ENTRE FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS DO POLIMORFISMO rs7903146 DO GENE *TCF7L2* COM DADOS DA LITERATURA

<i>TCF7L2</i> rs7903146			Genótipo (%)			Alelo (%)
Grupo étnico	Características	n	CC	CT	TT	T
Euro-brasileiros	DM2	120	41,7	48,3	10,0	34,0
	Saudáveis	121	51,3	35,5	13,2	31,0
Jovens Brancos não hispânicos	DM2	86	52,0	32,0	16,0	33,0
	Saudáveis	608	51,0	40,0	9,0	29,0
Jovens Afro-Americano	DM2	154	39,0	40,0	21,0	44,0
	Saudáveis	391	53,0	40,0	7,0	27,0
DABELEA et al., 2011						
Caucasoides	Saudáveis	100	55,0	37,0	8,0	34,0
PANG; SMITH; HUMPHRIES, 2013						
Brasileiros (Brasília)	DM2	113	43,4	41,6	15,0	35,8
	Saudáveis	139	50,4	45,6	4,3	27,0
BARRA et al., 2012						
Caucasoides	DM2	16	-	-	-	40,1
	Saudáveis	143	-	-	-	26,2
PROKUNINA-OLSSON et al., 2009						
Britânicos	DM2	2.158	38,5	48,0	13,5	37,5
	Saudáveis	2.574	47,4	43,8	8,8	30,7
GROVES et al., 2006						
Escandinavos		946	-	-	-	23,0
Suecos		966	-	-	-	28,0
Polones		1.942	-	-	-	27,0
Americanos		2.246	-	-	-	32,0
SAXENA et al., 2006						
Indianos	DM2	758	-	-	-	33,0
	Saudáveis	621	-	-	-	21,0
UMA JYOTHI et al., 2013						
Arabes da Tunisia	DM2	848	-	-	-	47,0
	Saudáveis	682	-	-	-	39,0
TURKI et al., 2013						
Mexicanos	DM2	719	-	-	-	18
	Saudáveis	746	-	-	-	12
MARTINEZ-GOMEZ et al., 2011						
Chineses		1.520	-	-	-	2,9
Japoneses		4.087	-	-	-	3,8
LUO et al., 2009						

Em negrito, dados obtidos neste estudo; DM2: diabetes *mellitus* tipo 2

Sombreadas as frequências mais diferentes comparadas com o presente estudo.

-, dados não disponíveis.

TABELA 12 - COMPARAÇÕES ENTRE FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS DO POLIMORFISMO rs12255372 DO GENE *TCF7L2* COM DADOS DA LITERATURA

<i>TCF7L2</i> rs12255372			Genótipo (%)			Alelo (%)
Grupo étnico	Características	n	GG	GT	TT	T
Euro-brasileiros	DM2	120	47,5	39,2	13,3	33,0
	Saudáveis	121	52,1	38,8	9,1	28,0
Jovens Brancos não hispânicos	DM2	86	56,0	32,0	12,0	32,0
	Saudáveis	608	53,0	39,0	8,0	27,5
Jovens Americano Africano	DM2	154	49,0	41,0	10,0	31,0
	Saudáveis	391	51,0	42,0	7,0	28,0
DABELEA et al., 2011						
Caucasoides	Saudáveis	100	56,0	31,0	13,0	36,0
PANG; SMITH; HUMPHRIES, 2013						
Caucasoides	DM2	16	-	-	-	37,5
	Saudáveis	143	-	-	-	25,2
PROKUNINA-OLSSON et al., 2009						
Britânicos	DM2	2.158	36,3	50,3	13,4	35,4
	Saudáveis	2.574	49,0	42,4	8,6	29,8
GROVES et al., 2006						
Indianos	DM2	758	-	-	-	24,0
	Saudáveis	621	-	-	-	18,0
UMA JYOTHI et al., 2013						
Árabes da Tunisia	DM2	738	-	-	-	41,0
	Saudáveis	590	-	-	-	34,0
URKI et al., 2013						
Mexicanos	DM2	719	-	-	-	15,6
	Saudáveis	746	-	-	-	11,4
MARTINEZ-GOMEZ et al., 2011						
Chineses		1.520	-	-	-	4,0
Japoneses		4.087	-	-	-	2,2
LUO et al., 2009						

Em negrito, dados obtidos neste estudo; DM2: diabetes *mellitus* tipo 2

Sombreadas as frequências mais diferentes comparadas com o presente estudo.

-, dados não disponíveis.

As frequências do AMF (T) observadas para os polimorfismos rs7903146 e rs12255372 (23-40%; 95%IC) são semelhantes às descritas em outras populações caucasoides.

Para brancos não hispânicos diabéticos e não diabéticos foi descrita uma frequência deste alelo para o rs7903146 de 33% e 29%, respectivamente, e para os jovens americanos africanos não diabéticos foi encontrado uma frequência de 27%

(DABELEA *et al.*, 2011). Frequências semelhantes para o rs12255372 foram descritas para os mesmos grupos (DABELEA *et al.*, 2011).

Inglêses genotiparam 100 indivíduos saudáveis e obtiveram frequências para o alelo T de 34% e 36%, respectivamente para os polimorfismos rs7903146 para o rs 12255372, em franca concordância com nossos dados (PANG; SMITH; HUMPHRIES, 2013).

Barra e colaboradores (2012) descreveram uma associação significativa rs7903146 com o DM2 em uma população de Brasília. As frequências para o alelo T do rs7903146 descritas neste estudo, 35,8% e 27%, para DM2 e controle, respectivamente, estão no intervalo de confiança dos valores observados em nosso estudo. Portanto, variações étnicas ou diferenças no desenho amostral podem propiciar resultados diferentes em estudo de associação. Corrobora esta afirmação o estudo de Melo e colaboradores, desenvolvido em nosso laboratório. Os autores estudaram estes polimorfismos do gene *TCF7L2* em estudo caso-controle com diabetes gestacional (MELO, 2013). O polimorfismo rs12255372 não diferiu entre os grupos e a frequência do alelo T foi de 30-32%, semelhante às descritas neste estudo. Para o polimorfismo rs7903146, as frequências alélicas entre gestantes saudáveis e diabéticas, para o alelo T, foi 29% e 36%, para saudáveis e diabéticas, próximo à significância ($P=0,05$) e similar aos descritos para no projeto em tela (MELO, 2013).

A frequência do AMF (T) para o rs7903146 observada é semelhante às descritas em outras populações como europeus 31% e 29%, para africanos 26%, americanos africanos 35%, mexicanos 25% (NCBI, 2013a). Para o rs12255372 foram descritas as frequências de 28% e 25% para europeus, 27% africanos e 35% para italianos (NCBI, 2013a).

Em outros estudos do tipo caso-controle os polimorfismos rs7903146 e rs12255372 encontraram associações significativas com o diabetes em diferentes populações, com destaque para Britânicos (GROVES *et al.*, 2006), Americanos (FLOREZ *et al.*, 2006), Finlandeses (LYSSENKO *et al.*, 2007), Escandinávia, Polônia e EUA (SAXENA *et al.*, 2006), Leste asiático (LUO *et al.*, 2009), Indianos (UMA JYOTHI *et al.*, 2013) (GUPTA *et al.*, 2012), Chineses han (DOU *et al.*, 2013), Árabe Tunisia (TURKI *et al.*, 2013), Libanesa (NEMR *et al.*, 2012), Letônia (KALNINA *et al.*, 2012), mexicana (MARTINEZ-GOMEZ *et al.*, 2011), sueca (NORDMAN *et al.*, 2009) e japonesa (TABARA *et al.*, 2009).

Outro elemento de destaque para estes polimorfismos é a expressiva baixa frequência observada em orientais para os alelos raros (~2-4%), como descrito nas tabelas 11 e 12.

No estudo presente não foi identificada associação com o DM2 e as frequências observadas são semelhantes às descritas para Caucasoides para os polimorfismos do gene *TCF7L2* em estudo.

6.2.3 Gene ABCC8

As frequências genóticas e alélicas do gene *ABCC8* com seu SNP rs3758947, bem como as análises para o equilíbrio de Hardy-Weinberg e as comparações entre os grupos encontram-se na tabela 13.

TABELA 13 - FREQUÊNCIA GENOTÍPICA E ALÉLICA DO POLIMORFISMO rs3758947 DO GENE *ABCC8*, NA AMOSTRA EM ESTUDO

Polimorfismos		Controle (n= 121)	DM2 (n= 120)	P
(rs3758947)				0,262
C>T	C/C	78 (64,4)	75 (62,5)	
ABCC8	C/T	34 (28,1)	41 (34,2)	
	T/T	9 (7,4)	4,0(3,3)	
Frequência do Alelo [95% IC]	T	22,0 [16,0-27,0]	20,0 [15,0-26,0]	0,773

Valores dos genótipos são n (%);

95% IC: Intervalo de confiança de 95%;

P, probabilidade, teste de χ^2 .

Equilíbrio de Hardy-Weinberg (teste de χ^2). SNP rs3758947 grupo controle (P=0,066) e DM2 (P=0,573).

FONTE: O autor (2014)

As frequências do AMF (T) para o polimorfismo rs3758947 são semelhantes às descritas em outras populações caucasoides como europeus 17%, asiática 26%, índios americanos 23% e chineses 26% (HAPMAP, 2013a; NCBI, 2013c). Kilpelainen e colaboradores (2007) encontraram uma frequência do menor alelo (25%) numa população da Finlândia, dentro do intervalo de confiança observado neste estudo (tabela 13), contudo, estes autores descrevem uma associação significativa do polimorfismo rs3758947 com o DM2, ao contrário de nosso estudo.

Estudos de associações com variantes dos genes dos canais de potássio ATP-dependente têm apresentado resultados conflitantes para o *ABCC8* (VAN DAM *et al.*, 2005).

Dois estudos de polimorfismo na região promotora do gene não identificaram associação com o DM2 (GLOYN *et al.*, 2001; HANSEN *et al.*, 2001). Diferentemente Kilpelainen e colaboradores (2007) que descreveram associação do polimorfismo em estudo com o DM2. Os mesmos autores evidenciaram experimentalmente a interação entre a atividade física e a variante (rs3758947).

Apresentamos, como hipótese, que um desenho amostral diferente, considerando elementos associados à dieta, condicionamento físico e estilo de vida dos indivíduos envolvidos, possa levar a resultados diferentes dos obtidos neste estudo.

Em síntese o polimorfismo rs3758947 do gene *ABCC8* não está associado ao DM2 na população em estudo e a frequência do AMF é semelhante a outras populações Caucasoides.

6.2.4 Gene *SLC2A2*

As frequências genotípicas e alélicas do gene *SLC2A2* com seu polimorfismo rs5393, bem como as análises para o equilíbrio de Hardy-Weinberg e as comparações entre os grupos encontram-se na tabela 14.

TABELA 14 - FREQUÊNCIA GENOTÍPICA E ALÉLICA DO POLIMORFISMO rs5393 DO GENE *SLC2A2*, NA AMOSTRA EM ESTUDO

Polimorfismos		Controle (n= 121)	DM2 (n= 120)	P
(rs5393)				0,939
A>C	A/A	81 (66,9)	78 (65,0)	
SLC2A2	A/C	32 (26,4)	33 (27,5)	
	C/C	8 (6,7)	9,0 (7,5)	
Frequência do Alelo	C	20,0	21,0	0,701
[95% IC]		[15,0-25,0]	[16,0-26,0]	

Valores dos genótipos são n (%);

95% IC: Intervalo de confiança de 95%;

P, probabilidade, teste de χ^2 .

Equilíbrio de Hardy-Weinberg (teste de χ^2). SNP rs5393 grupo controle (P=0,064) e DM2 (P=0,051).

FONTE: O autor (2014)

As frequências do AMF (C) observada (rs5393) são semelhantes às descritas em outras populações de Índios americanos 20%, mexicanos 21% e italianos da toscana 16% (HAPMAP, 2013b; NCBI, 2013b).

A distribuição dos alelos estudados do gene *SLC2A2* está em concordância com o descrito para outras populações, contudo não foi observada associação com o DM2.

De modo similar ao nosso estudo, outros também não demonstraram associação com o DM2 com este polimorfismo (MATSUTANI *et al.*, 1990; LI, S. R. *et al.*, 1991; PATEL *et al.*, 1991; BARONI *et al.*, 1992; TANIZAWA *et al.*, 1994; MATSUBARA *et al.*, 1995; SHIMADA *et al.*, 1995; MOLLER *et al.*, 2001).

Polimorfismos em regiões promotoras podem afetar a ligação de fatores transcricionais que regulam a transcrição gênica. Três polimorfismos na região promotora do gene *SLC2A2*, -149A>C (rs5393), -122T>C (rs5394) e -44G>A (rs5396), foram identificados na população dinamarquesa. Estes polimorfismos não tiveram as frequências genotípicas significativamente diferentes entre indivíduos saudáveis e pacientes com DM2 (MOLLER *et al.*, 2001).

Os indivíduos com genótipos AA do polimorfismo rs5393 do gene *SLC2A2* foi proposto como indicador de risco com capacidade de prever a conversão de Finlandeses obesos intolerantes à glicose para diabéticos tipo 2 (LAUKKANEN, O. *et al.*, 2005).

Barroso e colaboradores (BARROSO *et al.*, 2003) acreditam que muitos dos resultados negativos reportados em trabalhos publicados (LI, S. R. *et al.*, 1991; BARONI *et al.*, 1992; TANIZAWA *et al.*, 1994; MOLLER *et al.*, 2001) se deve ao

pequeno tamanho amostral, insuficiente em poder estatístico para detectar efeitos modestos ou sutis. Esta abordagem é uma explicação compatível ao nosso estudo em tela, que tem ênfase na triagem de genes associados ao DM2.

Também é relevante pontuar que a falta de associação dos polimorfismos no gene *SCL2A2* com DM2 neste e demais estudos poderia se justificar pelo mascaramento do seu efeito genético pelos fatores de estilo de vida, uma vez que Kilpelainen e colaboradores (2007) descreveram que a atividade física é um moderador do efeito genético de *SLC2A2* sobre o DM2. Este efeito tem suporte com a forte relação entre os polimorfismos do gene *SLC2A2* e o risco para doença cardiovascular (DAC).

Em síntese em nosso estudo o polimorfismo da região promotora rs5393 do gene *SLC2A2*, não está associado ao DM2 na população em estudo. A frequência do AMF observada para a população brasileira é 20% para o grupo controle e 21% para DM2.

Novos estudos com o polimorfismo em tela poderão ser realizados, considerando marcadores para estilo de vida na classificação dos grupos.

6.2.5 Gene *ADRA2A*

As frequências genotípicas e alélicas do gene *ADRA2A* com seu polimorfismo rs10885122, bem como as análises para o equilíbrio de Hardy-Weinberg e as comparações entre os grupos encontram-se na tabela 15.

TABELA 15 - FREQUÊNCIA GENOTÍPICA E ALÉLICA DO POLIMORFISMO rs10885122 DO GENE *ADRA2A*, NA AMOSTRA EM ESTUDO

Polimorfismos		Controle (n= 121)	DM2 (n= 120)	P
(rs10885122)				0,891
G>T	G/G	82 (67,8)	78 (65,0)	
ADRA2A	G/T	32 (26,4)	35 (29,2)	
	T/T	7 (5,8)	7,0 (5,8)	
Frequência do Alelo	T	19,0	20,0	0,698
[95% IC]		[14,0-24,0]	[15,0-26,0]	

Valores dos genótipos são n (%);

95% IC: Intervalo de confiança de 95%;

P, probabilidade, teste de χ^2 .

Equilíbrio de Hardy-Weinberg (teste de χ^2). SNP rs10885122 grupo controle (P=0,121) e DM2 (P=0,262).

FONTE: O autor (2014)

As frequências genotípicas e alélicas não diferiram entre os grupos em estudo. Outros estudos com conclusão similar estão descritos para as populações inglesa (TALMUD *et al.*, 2011), chinesa (TALMUD *et al.*, 2011; CHEN *et al.*, 2013), japonesa (FUJITA *et al.*, 2012) e europeia (DUPUIS *et al.*, 2010; REES *et al.*, 2011). A comparação deste polimorfismo entre diversas etnias 56,4% de origem europeia; 20,2% Africano-americanos; 16,8% hispânicos; 4,3% asiáticos; e 2,4% Índio Americano) também não encontrou correlação com o diabetes (FLOREZ *et al.*, 2012).

O polimorfismo rs10885122 foi associado com hiperglicemia ou redução na insulinemia em caucasianos não diabéticos (BOESGAARD *et al.*, 2010; DUPUIS *et al.*, 2010; RENSTROM *et al.*, 2011; WAGNER *et al.*, 2011). Nosso estudo não evidenciou associação com a glicemia ou outros marcadores para o controle glicêmico, em concordância com estudos que utilizaram tamanho amostral grande de diabéticos e intolerantes à glicose (TALMUD *et al.*, 2011; FLOREZ *et al.*, 2012).

Na tabela 16 estão demonstrados vários estudos de frequência alélica do gene *ADRA2A* rs10885122 comparando com o presente estudo (negrito) e destacados os estudos com valores mais diferentes (sombreados).

TABELA 16 - COMPARAÇÕES ENTRE FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS DO POLIMORFISMO rs10885122 DO GENE *ADRA2A* COM DADOS DA LITERATURA

ADRA2A rs10885122			Genótipo (%)			Alelo (%)
Grupo étnico	Características	n	GG	GT	TT	T
Euro-brasileiros	DM2	120	65,0	29,2	5,8	20,0
	Saudáveis	121	67,8	26,4	5,8	19,0
Meta - análise	Não diabético	46.186	-	-	-	13,0
Dupuis <i>et al.</i> , 2010						
Meta - análise	Não diabético com risco de DM2	1.782	-	-	-	12,0
Wagner <i>et al.</i> , 2011						
Suécos	Adultos de meia idade	4.059	-	-	-	11,0
Renstrom <i>et al.</i> , 2011						
Estudo de Whitehall II	DM2	365	78,1	21,1	0,8	11,0
	Saudáveis	4.788	77,4	21,2	1,3	12,0
Estudo do coração e saúde de mulheres britânicas	DM2	327	83,0	15,0	2,0	9,0
	Saudáveis	2.969	76,0	23,0	2,0	13,0
Estudo longitudinal Inglês de envelhecimento	DM2	432	73,2	26,4	0,5	14,0
	Saudáveis	5.021	76,8	21,7	1,5	12,0
Estudo de coração do Parque Northwick II	DM2	155	73,6	24,5	1,9	14,0
	Saudáveis	2.502	77,0	21,5	1,5	12,0
Talmud <i>et al.</i> , 2011						
Caucasianos Ingleses	DM2	439	-	-	-	14,0
	Saudáveis	5.091	-	-	-	12,0
Caucasianos Estudo do Coração Northwick (Britânico)	DM2	159	-	-	-	14,0
	Saudáveis	2.546	-	-	-	12,0
Caucasianos Asiático do Reino Unido	DM2	857	-	-	-	22,0
	Saudáveis	417	-	-	-	21,0
Caucasianos do Paquistão	DM2	821	-	-	-	23,0
	Saudáveis	1.167	-	-	-	25,0
Asiático do Japão	DM2	2.561	-	-	-	9,0
	Saudáveis	1.994	-	-	-	9,0
Asiático da China	DM2	3.410	-	-	-	7,6
	Saudáveis	3.412	-	-	-	8,0

Em negrito, dados obtidos neste estudo; DM2: diabetes *mellitus* tipo 2.

Sombreadas as frequências mais diferentes comparadas com o presente estudo.

-, dados não disponíveis.

As frequências do alelo T observadas para a população brasileira em estudo (tabela 16) não são diferentes da população caucasóide saudável e diabética de asiáticos do Reino Unido (21% e 22%) e do Paquistão (25% e 23%), mas superiores

a população japonesa (9%), chinesa (7,6 % e 8%) e britânica em quatro estudos (12% e 11%; 13% e 9%; 12% e 14% em dois estudos) (TALMUD *et al.*, 2011; FLOREZ *et al.*, 2012; CHEN *et al.*, 2013). Rees e colaboradores (2011) não encontraram associação do polimorfismo rs10885122 do gene *ADRA2A* com o DM2, em populações de asiáticos do Reino Unido e do Paquistão, que apresentaram frequência do alelo T semelhante à descrita neste trabalho.

Portanto, o polimorfismo rs10885122 do gene *ADRA2A* não está associado ao DM2 na população em estudo e as frequências do AMF são semelhantes a caucasóides e maiores quando comparados com orientais (tabela16).

6.3 ANÁLISES DE CORRELAÇÃO LINEAR DE PEARSON

Foram identificadas correlações significativas entre os polimorfismos e os parâmetros bioquímicos com a amostra controle bem como com a amostra DM2 (tabela 17).

TABELA 17 - CORRELAÇÕES SIGNIFICATIVAS ($P < 0,05$) ENTRE OS POLIMORFISMOS EM ESTUDO E PARÂMETROS LABORATORIAIS E ANTROPOMÉTRICOS NOS GRUPOS EM ESTUDO

Genes/Polimorfismos	Grupo Controle	Grupo DM2	
	Triglicérides	Peso	IMC
<i>ABCC8</i> rs3758947	r=0,238 P=0,017	-	-
<i>ADRA2A</i> rs10885122	-	r=0,277 P=0,006	-
<i>FTO</i> rs8050136	r=0,235 P=0,019	-	-
<i>FTO</i> rs9939609	r=0,238 P=0,017	-	-
<i>TCF7L2</i> rs7903146	-	-	r=0,186 P=0,042

Os SNPs entraram na análise com os códigos: Gene *FTO*, 1=TT; 2=TA e 3=AA para o rs9939609 e 1=CC, 2=CA e 3=AA para o rs8050136, Gene *ABCC8* rs3758947, 1=GG, 2=GA, 3=AA e Gene *ADRA2A* rs10885122, 1=GG, 2=GT, 3=TT e Gene *TCF7L2*, 1=GG, 2=GT e 3=TT.

r, coeficiente de correção de Pearson, P, probabilidade da correlação

FONTE: O autor (2014)

A análise de correlação linear (tabela 17) foi realizada na busca de associações entre os polimorfismos e os biomarcadores laboratoriais e antropométricos. Os valores do coeficiente de correlação (r) observados indicam

correlações fracas ($r < 0,5$), sugerindo que o efeito dos polimorfismos sobre estes marcadores é pequeno. Em todas as correlações significativas foram realizados análises de variância (ANOVA) para identificar possíveis efeitos das variantes genéticas sobre os parâmetros correlacionados.

6.4 ANÁLISES DE VARIÂNCIA

Foram comparados por análise de variância (ANOVA) os genótipos dos polimorfismos com os parâmetros que apresentaram correlação significativa mostrada na tabela 17.

As associações entre os genótipos somente foram consideradas nos casos em que o efeito da presença do alelo apresentou alteração direcionada e consistente com probabilidade significativa ($P < 0,05$).

As figuras 12 e 13 mostram as análises de associação utilizando ANOVA.

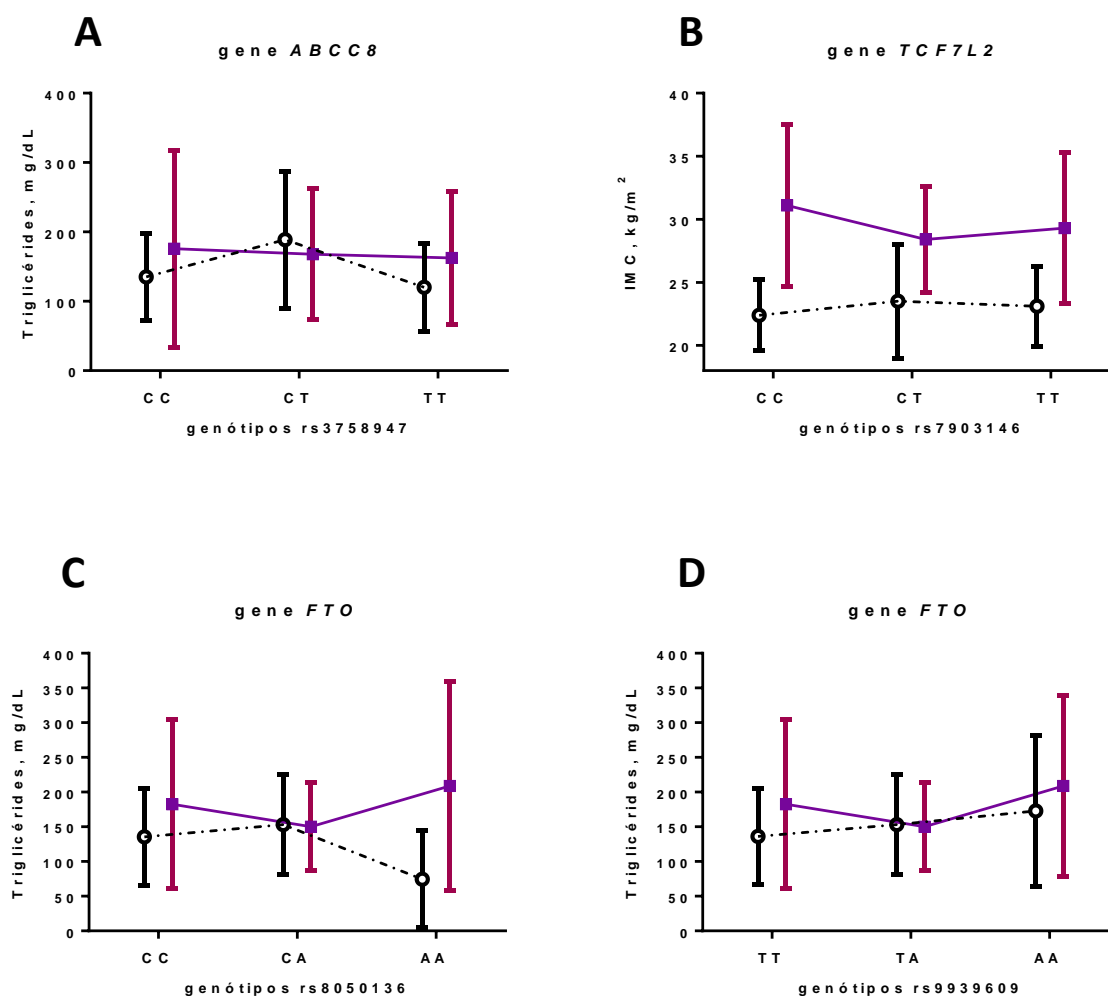


FIGURA 12 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA

Os símbolos são médias e as barras verticais 1-*DP*. O grupo controle esta representado por círculo aberto e linhas pretas e o grupo DM2 por quadrado e linhas vermelhas.

Painel	Gene	SNP	Parâmetros	Probabilidade ANOVA	
				Controle	DM2
A	<i>ABCC8</i>	rs3758947	Triglicérides	0,001	0,939
B	<i>TCF7L2</i>	rs7903146	IMC	0,870	0,035
C	<i>FTO</i>	rs8050136	Triglicérides	0,135	0,179
D	<i>FTO</i>	rs9939609	Triglicérides	0,182	0,179

FONTE: O autor (2014)

A associação dos polimorfismos com os parâmetros apresentados na figura 12 (Paineis A-D), não foi considerada relevante. Apenas os rs3758947 do *ABCC8* no grupo controle com os triglicérides (figura 12-A) e *TCF7L2* rs7903146 para IMC no grupo DM2 (figura 12-B) apresentaram probabilidade significativa na ANOVA. No entanto, a elevada dispersão dos resultados (monitorado pelo desvio padrão) e a ausência de evidência do efeito do alelo sobre o parâmetro analisado, sugere que

estas observações sejam decorrentes de variações ao acaso, possivelmente associadas ao tamanho amostral relativamente pequeno.

Para o polimorfismo rs10885122 do gene *ADRA2A*, foi identificada uma associação significativa entre os genótipos e o peso (figura 13).

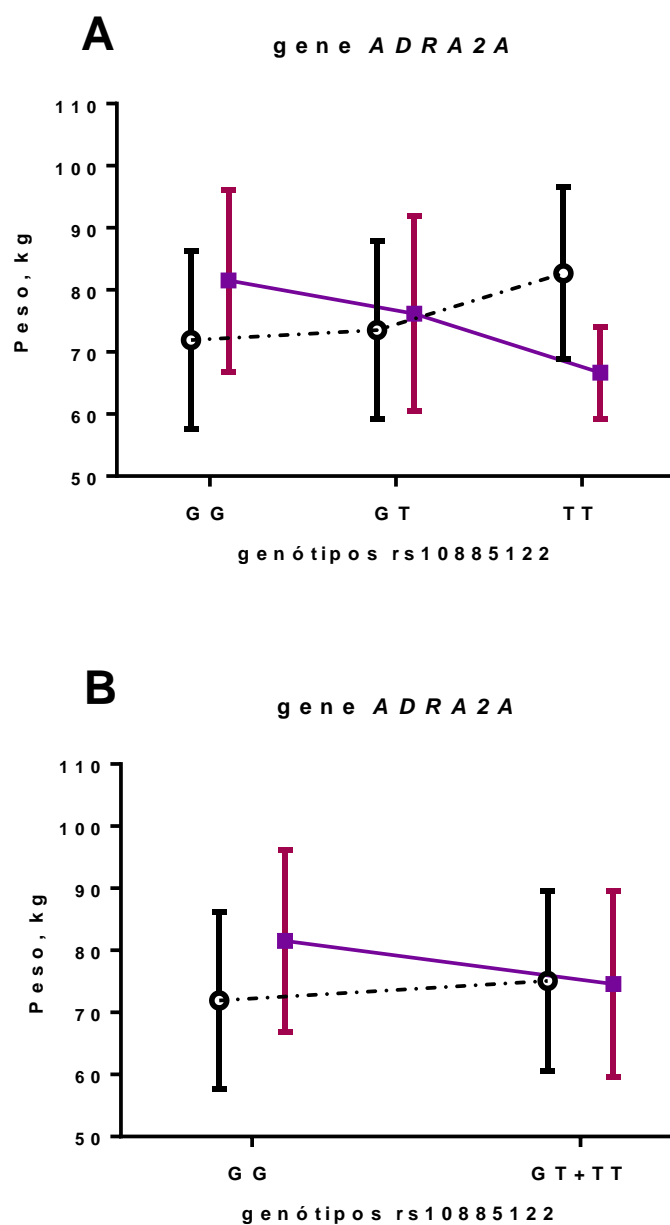


FIGURA 13 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA ENTRE GENÓTIPOS DO RS10885122 DO GENE *ADRA2A* E O PESO NOS GRUPOS EM ESTUDO

Os símbolos são médias e as barras verticais 1-DE. O grupo controle está representado por círculo aberto e linhas pretas e o grupo DM2 por quadrado e linhas vermelhas.

Painel	Controle	DM2	Statística (P)
A	0,156	0,017	ANOVA
B	0,247	0,016	Teste t Student

FONTE: O autor (2014)

A figura 13-A mostra que nos pacientes com DM2, o alelo de menor frequência T está associado a um peso menor. Portadores do genótipo TT apresentaram uma redução de 14,8 kg em relação aos homozigotos GG para o polimorfismo rs10885122. Este efeito não foi significativo em controles saudáveis.

Para confirmar o efeito, foi realizada a comparação no modo “dominante”, genótipo GG vs GT+TT, o que minimiza possíveis efeitos aleatórios devido ao menor tamanho amostral do genótipo TT (figura 13-B). A significância para o grupo DM2 foi mantida, confirmando o menor peso associado ao alelo T do polimorfismo rs10885122.

Para este polimorfismo, não foi observada uma associação com índice de massa corpórea (IMC). Possíveis efeitos do tamanho amostral e outros fatores como a distribuição da gordura corporal, não captados pelo IMC, podem ser elencados como uma explicação plausível para este fenômeno.

O alelo de menor frequência (T) do polimorfismo rs10885122 tem sido associado à menor concentração de glicose no soro (DUPUIS et al., 2010). Postulamos que este efeito metabólico, associado a outros elementos não conhecidos, tenha como efeito acelerar o ritmo metabólico ou inibir o acúmulo de gordura, fatores que isoladamente ou de forma combinada promoveriam uma redução no peso, associada a este alelo. Novos estudos, com adequado tamanho amostral e medidas da distribuição da gordura corporal com métodos avançados são recomendados para melhor estudo do fenômeno observado neste estudo de triagem.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Está disponível grande número de publicações mostrando associação entre variantes genéticas e o DM2, mas não raro, estudos com o mesmo polimorfismo apresentam achados inconsistentes (HIRSCHHORN; ALTSHULER, 2002). Esta dificuldade de replicar resultados pode refletir falso-positivos em estudos originais, em particular naqueles com tamanho amostral pequeno. O poder para a detecção de impactos modestos de um locus individual no DM2, ou a identificação de uma heterogeneidade etiológica em diferentes populações, pode requerer grande tamanho amostral. Também, muitos estudos avaliando genes candidatos para o DM2 possuem falta de rigor e baixa sensibilidade (ALTSHULER *et al.*, 2000).

A diversidade nas conclusões de diferentes estudos também refletir diferenças populacionais genuínas ou a heterogeneidade da doença (IOANNIDIS *et al.*, 2001; VAN DAM *et al.*, 2005). É neste contexto que se encontra um dos pontos relevantes do trabalho em tela. A quantidade de informações sobre as frequências de polimorfismos associados ao DM2 disponíveis para a população brasileira são inexistentes ou escassas. Nosso trabalho procura minimizar a falta de informações para nossa população brasileira, miscigenada e busca marcadores moleculares para o *Diabetes mellitus* tipo 2.

8 CONCLUSÕES

- Os polimorfismos dos genes *FTO* (rs9939609 e rs8050136), *TCF7L2* (rs7903146 e rs12255372), *SLC2A2* (rs5393), *ABCC8* (rs3758947) e *ADRA2A* (rs10885122) não estão associados ao diabetes tipo 2 na população em estudo.
- A frequência do AMF (95%IC) para os polimorfismos em estudo no grupo saudável (controles) para uma população mista com predominância de Euro-Brasileiros foi *FTO* rs9939609 alelo A 36% (30-42%), rs8050136 alelo A 37% (31-43%), *TCF7L2* rs7903146 alelo T 31% (25-37%), rs12255372 alelo T 28% (23-34%), *ABCC8* rs3758947 alelo T 22% (16-27%), *SLC2A2* rs5393 alelo C 20% (15-25%) e *ADRA2A* rs10885122 alelo T 19% (14-24%).
- As frequências alélicas e genotípicas para os polimorfismos em estudo foram semelhantes às observadas em outras populações Caucasoides e significativamente maiores quando comparadas à Orientais.
- Foi identificada uma associação significativa do polimorfismo rs10885122 do gene *ADRA2A* com o peso em pacientes com diabetes tipo 2. O alelo menos frequente T está associado à menor peso corporal.

REFERÊNCIAS

ABOU-HUSSEIN, S. *et al.* Genetic factors in risk assessment for the development of type 2 diabetes mellitus in a small case series. **Int J Risk Saf Med.** v. 23, n.2, p. 119-23. 2011.

ADA. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. **Diabetes Care.** v. 37 Suppl 1, p. S81-90. 2014a.

ADA. Standards of medical care in diabetes--2014. **Diabetes Care.** v. 37 Suppl 1, p. S14-80. 2014b.

ADAIR, T.; RAO, C. Changes in certification of diabetes with cardiovascular diseases increased reported diabetes mortality in Australia and the United States. **J Clin Epidemiol.** v. 63, n.2, p. 199-204. 2010.

AGUILAR-BRYAN, L. *et al.* Toward understanding the assembly and structure of KATP channels. **Physiol Rev.** v. 78, n.1, p. 227-45. 1998.

AGUILAR-BRYAN, L. *et al.* Cloning of the beta cell high-affinity sulfonylurea receptor: a regulator of insulin secretion. **Science.** v. 268, n.5209, p. 423-6. 1995.

AHLZEN, M. *et al.* Expression of the transcription factor 7-like 2 gene (TCF7L2) in human adipocytes is down regulated by insulin. **Biochem Biophys Res Commun.** v. 370, n.1, p. 49-52. 2008.

ALBERTS, B.; WILSON, J. H.; HUNT, T. **Biologia molecular da célula.** 5ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.

ALCOLADO, J. C.; BARONI, M. G.; LI, S. R. Association between a restriction fragment length polymorphism at the liver/islet cell (GluT 2) glucose transporter and familial type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus. **Diabetologia.** v. 34, n.10, p. 734-6. 1991.

ALTSHULER, D. *et al.* The common PPARgamma Pro12Ala polymorphism is associated with decreased risk of type 2 diabetes. **Nat Genet.** v. 26, n.1, p. 76-80. 2000.

ANDERSON, J. L. *et al.* Progress in unraveling the genetics of coronary artery disease and myocardial infarction. **Curr Atheroscler Rep.** v. 9, n.3, p. 179-86. 2007.

ANDREASEN, C. H. *et al.* Low physical activity accentuates the effect of the FTO rs9939609 polymorphism on body fat accumulation. **Diabetes.** v. 57, n.1, p. 95-101. 2008.

ANDRIC, S. A. *et al.* Endothelin-induced, long lasting, and Ca²⁺ influx-independent blockade of intrinsic secretion in pituitary cells by Gz subunits. **J Biol Chem.** v. 280, n.29, p. 26896-903. 2005.

ANGEL, I.; NIDDAM, R.; LANGER, S. Z. Involvement of alpha-2 adrenergic receptor subtypes in hyperglycemia. **J Pharmacol Exp Ther.** v. 254, n.3, p. 877-82. 1990.

ASHCROFT, F.; RORSMAN, P. Type 2 diabetes mellitus: not quite exciting enough? **Hum Mol Genet.** v. 13 Spec No 1, p. R21-31. 2004.

ASHCROFT, F. M.; RORSMAN, P. Electrophysiology of the pancreatic beta-cell. **Prog Biophys Mol Biol.** v. 54, n.2, p. 87-143. 1989.

BARONI, M. G. *et al.* Polymorphisms at the GLUT2 (beta-cell/liver) glucose transporter gene and non-insulin-dependent diabetes mellitus (NIDDM): analysis in affected pedigree members. **Clin Genet.** v. 41, n.5, p. 229-34. 1992.

BARRETT, J. C.; CARDON, L. R. Evaluating coverage of genome-wide association studies. **Nat Genet.** v. 38, n.6, p. 659-62. 2006.

BARROSO, I. Genetics of Type 2 diabetes. **Diabet Med.** v. 22, n.5, p. 517-35. 2005.

BARROSO, I. *et al.* Candidate gene association study in type 2 diabetes indicates a role for genes involved in beta-cell function as well as insulin action. **PLoS Biol.** v. 1, n.1, p. E20. 2003.

BELL, G. I.; POLONSKY, K. S. Diabetes mellitus and genetically programmed defects in beta-cell function. **Nature.** v. 414, n.6865, p. 788-91. 2001.

BERULAVA, T.; HORSTHEMKE, B. The obesity-associated SNPs in intron 1 of the FTO gene affect primary transcript levels. **Eur J Hum Genet.** v. 18, n.9, p. 1054-6. 2010.

BLACKMER, T. *et al.* G protein betagamma subunit-mediated presynaptic inhibition: regulation of exocytotic fusion downstream of Ca²⁺ entry. **Science**. v. 292, n.5515, p. 293-7. 2001.

BO, S. *et al.* The rs553668 polymorphism of the ADRA2A gene predicts the worsening of fasting glucose values in a cohort of subjects without diabetes. A population-based study. **Diabet Med**. v. 29, n.4, p. 549-52. 2012.

BOESGAARD, T. W. *et al.* Variants at DGKB/TMEM195, ADRA2A, GLIS3 and C2CD4B loci are associated with reduced glucose-stimulated beta cell function in middle-aged Danish people. **Diabetologia**. v. 53, n.8, p. 1647-55. 2010.

BONADIO, W. Pediatric diabetic ketoacidosis: an outpatient perspective on evaluation and management. **Pediatr Emerg Med Pract**. v. 10, n.3, p. 1-13; quiz 14. 2013.

BOUATIA-NAJI, N. *et al.* A polymorphism within the G6PC2 gene is associated with fasting plasma glucose levels. **Science**. v. 320, n.5879, p. 1085-8. 2008.

BRATUSCH-MARRAIN, P.; WALDHAUSL, W. [Hepatic and peripheral insulin resistance as a cause of hyperglycemia in non-insulin-dependent (type 2) diabetes mellitus: a review]. **Wien Klin Wochenschr**. v. 99, n.7, p. 211-6. 1987.

BRESSLER, J. *et al.* Risk of type 2 diabetes and obesity is differentially associated with variation in FTO in whites and African-Americans in the ARIC study. **PLoS One**. v. 5, n.5, p. e10521. 2010.

BROOKES, A. J. The essence of SNPs. **Gene**. v. 234, n.2, p. 177-86. 1999.

BUTCHER, M. J. *et al.* Association of proinflammatory cytokines and islet resident leucocytes with islet dysfunction in type 2 diabetes. **Diabetologia**. v. p. 2014.

CASTRO, S. H.; MATOS, H. J.; GOMES, M. B. Parâmetros antropométricos e síndrome metabólica em diabetes tipo 2. **Arq Bras Endocrinol Metab**. v. 50, n.3, p. 2006.

CHANDAK, G. R. *et al.* Common variants in the TCF7L2 gene are strongly associated with type 2 diabetes mellitus in the Indian population. **Diabetologia**. v. 50, n.1, p. 63-7. 2007.

CHAUHAN, G. *et al.* Common variants of FTO and the risk of obesity and type 2 diabetes in Indians. **J Hum Genet**. v. 56, n.10, p. 720-6. 2011.

CHEN, X. *et al.* Association of the ADRA2A polymorphisms with the risk of type 2 diabetes: A meta-analysis. **Clin Biochem**. v. 46, n.9, p. 722-6. 2013.

CHEUNG, M. K.; YEO, G. S. FTO Biology and Obesity: Why Do a Billion of Us Weigh 3 kg More? **Front Endocrinol (Lausanne)**. v. 2, p. 4. 2011.

CHIANG, Y. T.; IP, W.; JIN, T. The role of the Wnt signaling pathway in incretin hormone production and function. **Front Physiol**. v. 3, p. 273. 2012.

CHUANG, L. M. *et al.* Sibling-based association study of the PPARgamma2 Pro12Ala polymorphism and metabolic variables in Chinese and Japanese hypertension families: a SAPHIRe study. Stanford Asian-Pacific Program in Hypertension and Insulin Resistance. **J Mol Med (Berl)**. v. 79, n.11, p. 656-64. 2001.

CLEVERS, H. Wnt/beta-catenin signaling in development and disease. **Cell**. v. 127, n.3, p. 469-80. 2006.

CONNELLY, J. J. *et al.* GATA2 is associated with familial early-onset coronary artery disease. **PLoS Genet**. v. 2, n.8, p. e139. 2006.

CONSORTIUM, W. T. C. C. Genome-wide association study of 14,000 cases of seven common diseases and 3,000 shared controls. **Nature**. v. 447, n.7145, p. 661-78. 2007.

CRUZ, M. *et al.* Candidate gene association study conditioning on individual ancestry in patients with type 2 diabetes and metabolic syndrome from Mexico City. **Diabetes Metab Res Rev**. v. 26, n.4, p. 261-70. 2010.

DABELEA, D. *et al.* Association testing of TCF7L2 polymorphisms with type 2 diabetes in multi-ethnic youth. **Diabetologia**. v. 54, n.3, p. 535-9. 2011.

DAMCOTT, C. M. *et al.* Polymorphisms in the transcription factor 7-like 2 (TCF7L2) gene are associated with type 2 diabetes in the Amish: replication and evidence for a role in both insulin secretion and insulin resistance. **Diabetes**. v. 55, n.9, p. 2654-9. 2006.

DANAEI, G. *et al.* National, regional, and global trends in systolic blood pressure since 1980: systematic analysis of health examination surveys and epidemiological studies with 786 country-years and 5.4 million participants. **Lancet**. v. 377, n.9765, p. 568-77. 2011.

DE WET, H. *et al.* A universally conserved residue in the SUR1 subunit of the KATP channel is essential for translating nucleotide binding at SUR1 into channel opening. **J Physiol**. v. 590, n.Pt 20, p. 5025-36. 2012.

DEARLOVE, A. M. High throughput genotyping technologies. **Brief Funct Genomic Proteomic**. v. 1, n.2, p. 139-50. 2002.

DEVEDJIAN, J. C. *et al.* Transgenic mice overexpressing alpha2A-adrenoceptors in pancreatic beta-cells show altered regulation of glucose homeostasis. **Diabetologia**. v. 43, n.7, p. 899-906. 2000.

DIERICK, H.; BEJSOVEC, A. Cellular mechanisms of wingless/Wnt signal transduction. **Curr Top Dev Biol**. v. 43, p. 153-90. 1999.

DONEY, A. S. *et al.* The FTO gene is associated with an atherogenic lipid profile and myocardial infarction in patients with type 2 diabetes: a Genetics of Diabetes Audit and Research Study in Tayside Scotland (Go-DARTS) study. **Circ Cardiovasc Genet**. v. 2, n.3, p. 255-9. 2009.

DOU, H. *et al.* The association between gene polymorphism of TCF7L2 and type 2 diabetes in Chinese Han population: a meta-analysis. **PLoS One**. v. 8, n.3, p. e59495. 2013.

DUNNE, M. J. *et al.* Hyperinsulinism in infancy: from basic science to clinical disease. **Physiol Rev**. v. 84, n.1, p. 239-75. 2004.

DUPUIS, J. *et al.* New genetic loci implicated in fasting glucose homeostasis and their impact on type 2 diabetes risk. **Nat Genet**. v. 42, n.2, p. 105-16. 2010.

DWIVEDI, O. P. *et al.* Common variants of FTO are associated with childhood obesity in a cross-sectional study of 3,126 urban Indian children. **PLoS One**. v. 7, n.10, p. e47772. 2012.

EK, J. *et al.* Studies of the Pro12Ala polymorphism of the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma2 (PPAR-gamma2) gene in relation to insulin sensitivity among glucose tolerant caucasians. **Diabetologia**. v. 44, n.9, p. 1170-6. 2001.

ELBEIN, S. C. *et al.* Transcription factor 7-like 2 polymorphisms and type 2 diabetes, glucose homeostasis traits and gene expression in US participants of European and African descent. **Diabetologia**. v. 50, n.8, p. 1621-30. 2007.

EVANS, J. C. *et al.* Studies of association between the gene for calpain-10 and type 2 diabetes mellitus in the United Kingdom. **Am J Hum Genet**. v. 69, n.3, p. 544-52. 2001.

FAGERHOLM, V. *et al.* Altered glucose homeostasis in alpha2A-adrenoceptor knockout mice. **Eur J Pharmacol**. v. 505, n.1-3, p. 243-52. 2004.

FIELD, S. F. *et al.* Analysis of the obesity gene FTO in 14,803 type 1 diabetes cases and controls. **Diabetologia**. v. 50, n.10, p. 2218-20. 2007.

FLANAGAN, S. E. *et al.* Dominantly acting ABCC8 mutations in patients with medically unresponsive hyperinsulinaemic hypoglycaemia. **Clin Genet**. v. 79, n.6, p. 582-7. 2011.

FLOREZ, J. C. *et al.* TCF7L2 polymorphisms and progression to diabetes in the Diabetes Prevention Program. **N Engl J Med**. v. 355, n.3, p. 241-50. 2006.

FLOREZ, J. C. *et al.* Effects of genetic variants previously associated with fasting glucose and insulin in the Diabetes Prevention Program. **PLoS One**. v. 7, n.9, p. e44424. 2012.

FRAYLING, T. M. Genome-wide association studies provide new insights into type 2 diabetes aetiology. **Nat Rev Genet**. v. 8, n.9, p. 657-62. 2007.

FRAYLING, T. M.; MCCARTHY, M. I. Genetic studies of diabetes following the advent of the genome-wide association study: where do we go from here? **Diabetologia**. v. 50, n.11, p. 2229-33. 2007.

FRAYLING, T. M. *et al.* A common variant in the FTO gene is associated with body mass index and predisposes to childhood and adult obesity. **Science**. v. 316, n.5826, p. 889-94. 2007.

FUJITA, H. *et al.* Variations with modest effects have an important role in the genetic background of type 2 diabetes and diabetes-related traits. **J Hum Genet**. v. 57, n.12, p. 776-9. 2012.

FUKUMOTO, H. *et al.* Sequence, tissue distribution, and chromosomal localization of mRNA encoding a human glucose transporter-like protein. **Proc Natl Acad Sci U S A**. v. 85, n.15, p. 5434-8. 1988.

GAULTON, K. J. *et al.* Comprehensive association study of type 2 diabetes and related quantitative traits with 222 candidate genes. **Diabetes**. v. 57, n.11, p. 3136-44. 2008.

GENECARDS. **The Human Gene Compendium SLC2A2**. Disponível em: <<http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=SLC2A2&search=SLC2A2>>. Acesso em: 06/02/2014.

GENECARDS. **The human Gene Compendium ADRA2A**. Disponível em: <<http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=ADRA2A&search=ADRA2A>>. Acesso em: 06/02/14.

GENECARDS. **The Human Gene Compendium FTO**. Disponível em: <<http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=FTO&search=FTO>>. Acesso em: 05/02/2014.

GENECARDS. **The Human Gene Compendium TCF7L2**. Disponível em: <<http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=TCF7L2&search=TCF7L2>>. Acesso em: 06/02/14.

GERKEN, T. *et al.* The obesity-associated FTO gene encodes a 2-oxoglutarate-dependent nucleic acid demethylase. **Science**. v. 318, n.5855, p. 1469-72. 2007.

GHR. **ABCC8**. Disponível em: <<http://ghr.nlm.nih.gov/gene/ABCC8>>. Acesso em: 26/11/2013

GINSBERG, H. N. Insulin resistance and cardiovascular disease. **J Clin Invest.** v. 106, n.4, p. 453-8. 2000.

GLASER, B. Dominant SUR1 mutation causing autosomal dominant type 2 diabetes. **Lancet.** v. 361, n.9354, p. 272-3. 2003.

GLOYN, A. L. *et al.* Association studies of variants in promoter and coding regions of beta-cell ATP-sensitive K-channel genes SUR1 and Kir6.2 with Type 2 diabetes mellitus (UKPDS 53). **Diabet Med.** v. 18, n.3, p. 206-12. 2001.

GLOYN, A. L. *et al.* Activating mutations in the gene encoding the ATP-sensitive potassium-channel subunit Kir6.2 and permanent neonatal diabetes. **N Engl J Med.** v. 350, n.18, p. 1838-49. 2004.

GLOYN, A. L. *et al.* Large-scale association studies of variants in genes encoding the pancreatic beta-cell KATP channel subunits Kir6.2 (KCNJ11) and SUR1 (ABCC8) confirm that the KCNJ11 E23K variant is associated with type 2 diabetes. **Diabetes.** v. 52, n.2, p. 568-72. 2003.

GONZALEZ-SANCHEZ, J. L. *et al.* Association of variants of the TCF7L2 gene with increases in the risk of type 2 diabetes and the proinsulin:insulin ratio in the Spanish population. **Diabetologia.** v. 51, n.11, p. 1993-7. 2008.

GONZALEZ SANCHEZ, J. L. *et al.* Effect of the Pro12Ala polymorphism of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma-2 gene on adiposity, insulin sensitivity and lipid profile in the Spanish population. **Eur J Endocrinol.** v. 147, n.4, p. 495-501. 2002.

GOULD, G. W. *et al.* Expression of human glucose transporters in *Xenopus* oocytes: kinetic characterization and substrate specificities of the erythrocyte, liver, and brain isoforms. **Biochemistry.** v. 30, n.21, p. 5139-45. 1991.

GRANT, S. F. *et al.* Variant of transcription factor 7-like 2 (TCF7L2) gene confers risk of type 2 diabetes. **Nat Genet.** v. 38, n.3, p. 320-3. 2006.

GRARUP, N.; SPARSO, T.; HANSEN, T. Physiologic characterization of type 2 diabetes-related loci. **Curr Diab Rep.** v. 10, n.6, p. 485-97. 2010.

GROVES, C. J. *et al.* Association analysis of 6,736 U.K. subjects provides replication and confirms TCF7L2 as a type 2 diabetes susceptibility gene with a substantial effect on individual risk. **Diabetes**. v. 55, n.9, p. 2640-4. 2006.

GUO, S. W.; THOMPSON, E. A. Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. **Biometrics**. v. 48, n.2, p. 361-72. 1992.

GUPTA, V. *et al.* Association analysis of 31 common polymorphisms with type 2 diabetes and its related traits in Indian sib pairs. **Diabetologia**. v. 55, n.2, p. 349-57. 2012.

HANI, E. H. *et al.* Missense mutations in the pancreatic islet beta cell inwardly rectifying K⁺ channel gene (KIR6.2/BIR): a meta-analysis suggests a role in the polygenic basis of Type II diabetes mellitus in Caucasians. **Diabetologia**. v. 41, n.12, p. 1511-5. 1998.

HANI, E. H. *et al.* Genetic studies of the sulfonylurea receptor gene locus in NIDDM and in morbid obesity among French Caucasians. **Diabetes**. v. 46, n.4, p. 688-94. 1997.

HANSEN, T. *et al.* Genetic variability of the SUR1 promoter in relation to beta-cell function and Type II diabetes mellitus. **Diabetologia**. v. 44, n.10, p. 1330-4. 2001.

HANSEN, T. *et al.* Decreased tolbutamide-stimulated insulin secretion in healthy subjects with sequence variants in the high-affinity sulfonylurea receptor gene. **Diabetes**. v. 47, n.4, p. 598-605. 1998.

HAPMAP. **International HapMap Project.** Disponível em: http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-perl/snp_details_phase3?name=rs3758947&source=hapmap28_B36&tmpl=snp_details_phase3. Acesso em: 26/09/13.

HAPMAP. **International HapMap Project.** Disponível em: http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-perl/snp_details_phase3?name=rs5393&source=hapmap28_B36&tmpl=snp_details_phase3. Acesso em: 23/09/2013.

HART, L. M. *et al.* Variants in the sulphonylurea receptor gene: association of the exon 16-3t variant with Type II diabetes mellitus in Dutch Caucasians. **Diabetologia**. v. 42, n.5, p. 617-20. 1999.

HAUPT, A. *et al.* Gene variants of TCF7L2 influence weight loss and body composition during lifestyle intervention in a population at risk for type 2 diabetes. **Diabetes**. v. 59, n.3, p. 747-50. 2010.

HAVRANKOVA, J.; ROTH, J.; BROWNSTEIN, M. Insulin receptors are widely distributed in the central nervous system of the rat. **Nature**. v. 272, n.5656, p. 827-9. 1978.

HDS. Hypertension in Diabetes Study (HDS): I. Prevalence of hypertension in newly presenting type 2 diabetic patients and the association with risk factors for cardiovascular and diabetic complications. **J Hypertens**. v. 11, n.3, p. 309-17. 1993.

HELGADOTTIR, A. *et al.* The gene encoding 5-lipoxygenase activating protein confers risk of myocardial infarction and stroke. **Nat Genet**. v. 36, n.3, p. 233-9. 2004.

HEMMINKI, K.; BERMEJO, J. L. Relationships between familial risks of cancer and the effects of heritable genes and their SNP variants. **Mutat Res**. v. 592, n.1-2, p. 6-17. 2005.

HIRSCHHORN, J. N.; ALTSHULER, D. Once and again-issues surrounding replication in genetic association studies. **J Clin Endocrinol Metab**. v. 87, n.10, p. 4438-41. 2002.

HOTAMISLIGIL, G. S. *et al.* Increased adipose tissue expression of tumor necrosis factor-alpha in human obesity and insulin resistance. **J Clin Invest**. v. 95, n.5, p. 2409-15. 1995.

HOTTA, K. *et al.* Association of variations in the FTO, SCG3 and MTMR9 genes with metabolic syndrome in a Japanese population. **J Hum Genet**. v. 56, n.9, p. 647-51. 2011.

HU, C. *et al.* Variants from GIPR, TCF7L2, DGKB, MADD, CRY2, GLIS3, PROX1, SLC30A8 and IGF1 are associated with glucose metabolism in the Chinese. **PLoS One**. v. 5, n.11, p. e15542. 2010.

HU, X. *et al.* Proteomic exploration of pancreatic islets in mice null for the alpha2A adrenergic receptor. **J Mol Endocrinol**. v. 35, n.1, p. 73-88. 2005.

HUMPHRIES, S. E. *et al.* Common variants in the TCF7L2 gene and predisposition to type 2 diabetes in UK European Whites, Indian Asians and Afro-Caribbean men and women. **J Mol Med (Berl)**. v. 84, n.12, p. 1005-14. 2006.

HUOPIO, H. *et al.* A new subtype of autosomal dominant diabetes attributable to a mutation in the gene for sulfonylurea receptor 1. **Lancet**. v. 361, n.9354, p. 301-7. 2003.

IGL, W. *et al.* Modeling of environmental effects in genome-wide association studies identifies SLC2A2 and HP as novel loci influencing serum cholesterol levels. **PLoS Genet**. v. 6, n.1, p. e1000798. 2010.

INOUE, H. *et al.* Sequence variants in the sulfonylurea receptor (SUR) gene are associated with NIDDM in Caucasians. **Diabetes**. v. 45, n.6, p. 825-31. 1996.

IOANNIDIS, J. P. *et al.* Replication validity of genetic association studies. **Nat Genet**. v. 29, n.3, p. 306-9. 2001.

IP, W.; CHIANG, Y. T.; JIN, T. The involvement of the wnt signaling pathway and TCF7L2 in diabetes mellitus: The current understanding, dispute, and perspective. **Cell Biosci**. v. 2, n.1, p. 28. 2012.

IP, W. *et al.* The Wnt signaling pathway effector TCF7L2 is upregulated by insulin and represses hepatic gluconeogenesis. **Am J Physiol Endocrinol Metab**. v. 303, n.9, p. E1166-76. 2012.

ISHIYAMA-SHIGEMOTO, S. *et al.* Clinical characterization of polymorphisms in the sulphonylurea receptor 1 gene in Japanese subjects with Type 2 diabetes mellitus. **Diabet Med**. v. 15, n.10, p. 826-9. 1998.

IWASAKI, N. *et al.* Identification of microsatellite markers near the human genes encoding the beta-cell ATP-sensitive K⁺ channel and linkage studies with NIDDM in Japanese. **Diabetes**. v. 45, n.2, p. 267-9. 1996.

JACOB, S. *et al.* The PPARgamma2 polymorphism pro12Ala is associated with better insulin sensitivity in the offspring of type 2 diabetic patients. **Horm Metab Res**. v. 32, n.10, p. 413-6. 2000.

JENKINS, S.; GIBSON, N. High-throughput SNP genotyping. **Comp Funct Genomics**. v. 3, n.1, p. 57-66. 2002.

JI, L.; HAN, X.; WANG, H. [Sulfonylurea receptor gene polymorphism is associated with non-insulin dependent diabetes mellitus in Chinese population]. **Zhonghua Yi Xue Za Zhi**. v. 78, n.10, p. 774-5. 1998.

JIN, T.; GEORGE FANTUS, I.; SUN, J. Wnt and beyond Wnt: multiple mechanisms control the transcriptional property of beta-catenin. **Cell Signal**. v. 20, n.10, p. 1697-704. 2008.

JIN, T.; LIU, L. The Wnt signaling pathway effector TCF7L2 and type 2 diabetes mellitus. **Mol Endocrinol**. v. 22, n.11, p. 2383-92. 2008.

JOHNSON, J. H. *et al.* Underexpression of beta cell high Km glucose transporters in noninsulin-dependent diabetes. **Science**. v. 250, n.4980, p. 546-9. 1990.

JOOST, H. G. *et al.* Nomenclature of the GLUT/SLC2A family of sugar/polyol transport facilitators. **Am J Physiol Endocrinol Metab**. v. 282, n.4, p. E974-6. 2002.

KALNINA, I. *et al.* Stronger association of common variants in TCF7L2 gene with nonobese type 2 diabetes in the Latvian population. **Exp Clin Endocrinol Diabetes**. v. 120, n.8, p. 466-8. 2012.

KHOVIDHUNKIT, W. *et al.* Effects of infection and inflammation on lipid and lipoprotein metabolism: mechanisms and consequences to the host. **J Lipid Res**. v. 45, n.7, p. 1169-96. 2004.

KILPELAINEN, T. O. *et al.* Physical activity modifies the effect of SNPs in the SLC2A2 (GLUT2) and ABCC8 (SUR1) genes on the risk of developing type 2 diabetes. **Physiol Genomics**. v. 31, n.2, p. 264-72. 2007.

KING, H.; AUBERT, R. E.; HERMAN, W. H. Global burden of diabetes, 1995-2025: prevalence, numerical estimates, and projections. **Diabetes Care**. v. 21, n.9, p. 1414-31. 1998.

KLIMENTIDIS, Y. C. *et al.* Associations of obesity genes with obesity-related outcomes in multiethnic children. **Arch Med Res**. v. 42, n.6, p. 509-14. 2011.

KNOWLER, W. C. *et al.* Diabetes mellitus in the Pima Indians: incidence, risk factors and pathogenesis. **Diabetes Metab Rev**. v. 6, n.1, p. 1-27. 1990.

KORINEK, V. *et al.* Depletion of epithelial stem-cell compartments in the small intestine of mice lacking Tcf-4. **Nat Genet.** v. 19, n.4, p. 379-83. 1998.

KOSTER, J. C. *et al.* Targeted overactivity of beta cell K(ATP) channels induces profound neonatal diabetes. **Cell.** v. 100, n.6, p. 645-54. 2000.

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

LANG, J. Molecular mechanisms and regulation of insulin exocytosis as a paradigm of endocrine secretion. **Eur J Biochem.** v. 259, n.1-2, p. 3-17. 1999.

LAUKKANEN, C. Leadership in health care--orchestrating change. **Can Oper Room Nurs J.** v. 23, n.2, p. 37-8, 40, 42. 2005.

LAUKKANEN, O. *et al.* Polymorphisms in the SLC2A2 (GLUT2) gene are associated with the conversion from impaired glucose tolerance to type 2 diabetes: the Finnish Diabetes Prevention Study. **Diabetes.** v. 54, n.7, p. 2256-60. 2005.

LEE, J. E. High-throughput genotyping. **Forum Nutr.** v. 60, p. 97-101. 2007.

LEGRY, V. *et al.* Effect of an FTO polymorphism on fat mass, obesity, and type 2 diabetes mellitus in the French MONICA Study. **Metabolism.** v. 58, n.7, p. 971-5. 2009.

LI, H. *et al.* Association of genetic variation in FTO with risk of obesity and type 2 diabetes with data from 96,551 East and South Asians. **Diabetologia.** v. 55, n.4, p. 981-95. 2012.

LI, H. *et al.* Variants in the fat mass- and obesity-associated (FTO) gene are not associated with obesity in a Chinese Han population. **Diabetes.** v. 57, n.1, p. 264-8. 2008.

LI, S. R. *et al.* Genetic polymorphisms at the human liver/islet glucose transporter (GLUT2) gene locus in Caucasian and West Indian subjects with type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus. **Biochim Biophys Acta.** v. 1097, n.4, p. 293-8. 1991.

LIMA, A. W. G., F. M.; TAYLOR, A. P. Fenótipo da gordura, fatores associados e o polimorfismo rs9939609 do gene FTO. **Rev Bras Cineantropom Desempenho Hum.** v. 12(2), p. 164-172. 2010.

LIU, C. *et al.* Variants in GLIS3 and CRY2 are associated with type 2 diabetes and impaired fasting glucose in Chinese Hans. **PLoS One.** v. 6, n.6, p. e21464. 2011.

LIU, Y. *et al.* Meta-analysis added power to identify variants in FTO associated with type 2 diabetes and obesity in the Asian population. **Obesity (Silver Spring).** v. 18, n.8, p. 1619-24. 2010.

LOOS, R. J. *et al.* TCF7L2 polymorphisms modulate proinsulin levels and beta-cell function in a British Europid population. **Diabetes.** v. 56, n.7, p. 1943-7. 2007.

LOVE-GREGORY, L. *et al.* E23K single nucleotide polymorphism in the islet ATP-sensitive potassium channel gene (Kir6.2) contributes as much to the risk of Type II diabetes in Caucasians as the PPARgamma Pro12Ala variant. **Diabetologia.** v. 46, n.1, p. 136-7. 2003.

LOVE-GREGORY, L. D. *et al.* A common polymorphism in the upstream promoter region of the hepatocyte nuclear factor-4 alpha gene on chromosome 20q is associated with type 2 diabetes and appears to contribute to the evidence for linkage in an ashkenazi jewish population. **Diabetes.** v. 53, n.4, p. 1134-40. 2004.

LUO, Y. *et al.* Meta-analysis of the association between SNPs in TCF7L2 and type 2 diabetes in East Asian population. **Diabetes Res Clin Pract.** v. 85, n.2, p. 139-46. 2009.

LYSSENKO, V. *et al.* Mechanisms by which common variants in the TCF7L2 gene increase risk of type 2 diabetes. **J Clin Invest.** v. 117, n.8, p. 2155-63. 2007.

MACISAAC, R. J.; EKINCI, E. I.; JERUMS, G. Markers of and risk factors for the development and progression of diabetic kidney disease. **Am J Kidney Dis.** v. 63, n.2 Suppl 2, p. S39-62. 2014.

MALANDRINO, N.; SMITH, R. J. Personalized medicine in diabetes. **Clin Chem.** v. 57, n.2, p. 231-40. 2011.

MALERBI, D. A.; FRANCO, L. J. Multicenter study of the prevalence of diabetes mellitus and impaired glucose tolerance in the urban Brazilian population aged 30-69 yr. The Brazilian Cooperative Group on the Study of Diabetes Prevalence. **Diabetes Care**. v. 15, n.11, p. 1509-16. 1992.

MANOLIO, T. A. *et al.* Finding the missing heritability of complex diseases. **Nature**. v. 461, n.7265, p. 747-53. 2009.

MARCHETTI, P. *et al.* From genotype to human beta cell phenotype and beyond. **Islets**. v. 4, n.5, p. 323-32. 2012.

MARTINEZ-GOMEZ, L. E. *et al.* A replication study of the IRS1, CAPN10, TCF7L2, and PPARG gene polymorphisms associated with type 2 diabetes in two different populations of Mexico. **Ann Hum Genet**. v. 75, n.5, p. 612-20. 2011.

MATSUBARA, A. *et al.* Sequence variations of the pancreatic islet/liver glucose transporter (GLUT2) gene in Japanese subjects with noninsulin dependent diabetes mellitus. **J Clin Endocrinol Metab**. v. 80, n.11, p. 3131-5. 1995.

MATSUTANI, A. *et al.* Polymorphisms of GLUT2 and GLUT4 genes. Use in evaluation of genetic susceptibility to NIDDM in blacks. **Diabetes**. v. 39, n.12, p. 1534-42. 1990.

MCCULLOCH, L. J. *et al.* GLUT2 (SLC2A2) is not the principal glucose transporter in human pancreatic beta cells: implications for understanding genetic association signals at this locus. **Mol Genet Metab**. v. 104, n.4, p. 648-53. 2011.

MCDERMOTT, A. M.; SHARP, G. W. Inhibition of insulin secretion: a fail-safe system. **Cell Signal**. v. 5, n.3, p. 229-34. 1993.

MEIRHAEGHE, A. *et al.* Impact of sulfonylurea receptor 1 genetic variability on non-insulin-dependent diabetes mellitus prevalence and treatment: a population study. **Am J Med Genet**. v. 101, n.1, p. 4-8. 2001.

MELO, S. F. **Estudo de variações do gene do fator de transcrição 7-semelhante a 2 (TCF7L2) e do gene associado à massa adiposa e Obesidade (FTO) no diabetes gestacional**. 113 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2013.

MICHEL, M. C. *et al.* Functional correlates of alpha(2A)-adrenoceptor gene polymorphism in the HANE study. **Nephrol Dial Transplant.** v. 14, n.11, p. 2657-63. 1999.

MIKI, T.; SEINO, S. Roles of KATP channels as metabolic sensors in acute metabolic changes. **J Mol Cell Cardiol.** v. 38, n.6, p. 917-25. 2005.

MINTON, J. A. *et al.* Association studies of genetic variation in the WFS1 gene and type 2 diabetes in U.K. populations. **Diabetes.** v. 51, n.4, p. 1287-90. 2002.

MOLLER, A. M. *et al.* Studies of genetic variability of the glucose transporter 2 promoter in patients with type 2 diabetes mellitus. **J Clin Endocrinol Metab.** v. 86, n.5, p. 2181-6. 2001.

MOTATAIANU, A. *et al.* Cardiovascular autonomic neuropathy in context of other complications of type 2 diabetes mellitus. **Biomed Res Int.** v. 2013, p. 507216. 2013.

MUENDLEIN, A. *et al.* Single nucleotide polymorphisms of TCF7L2 are linked to diabetic coronary atherosclerosis. **PLoS One.** v. 6, n.3, p. e17978. 2011.

NCBI. dbSNP. v. p. 2013a.

NCBI. **dbSNP Short Genetic Variations.** Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp_ref.cgi?searchType=adhoc_search&type=rs&rs=rs5393. Acesso em: 23/09/2013.

NCBI. **dbSNP Short Genetic Variations.** Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=3758947. Acesso em: 26/09/13.

NEMR, R. *et al.* Transcription factor-7-like 2 gene variants are strongly associated with type 2 diabetes in Lebanese subjects. **Diabetes Res Clin Pract.** v. 98, n.3, p. e23-7. 2012.

NEWELL, A. M. Genetics for targeting disease prevention: diabetes. **Prim Care.** v. 31, n.3, p. 743-66, xii. 2004.

NEWMAN, B. *et al.* Concordance for type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus in male twins. **Diabetologia.** v. 30, n.10, p. 763-8. 1987.

NIDDAM, R. *et al.* Pharmacological characterization of alpha-2 adrenergic receptor subtype involved in the release of insulin from isolated rat pancreatic islets. **J Pharmacol Exp Ther.** v. 254, n.3, p. 883-7. 1990.

NIELSEN, E. M. *et al.* The E23K variant of Kir6.2 associates with impaired post-OGTT serum insulin response and increased risk of type 2 diabetes. **Diabetes.** v. 52, n.2, p. 573-7. 2003.

NORDMAN, S. *et al.* Loci of TCF7L2, HHEX and IDE on chromosome 10q and the susceptibility of their genetic polymorphisms to type 2 diabetes. **Exp Clin Endocrinol Diabetes.** v. 117, n.4, p. 186-90. 2009.

NORTON, L. *et al.* Chromatin occupancy of transcription factor 7-like 2 (TCF7L2) and its role in hepatic glucose metabolism. **Diabetologia.** v. 54, n.12, p. 3132-42. 2011.

NTZANI, E. E.; KAVVOURA, F. K. Genetic risk factors for type 2 diabetes: insights from the emerging genomic evidence. **Curr Vasc Pharmacol.** v. 10, n.2, p. 147-55. 2012.

OHNISHI, Y. [A high-throughput SNP typing system for genome-wide association studies]. **Gan To Kagaku Ryoho.** v. 29, n.11, p. 2031-6. 2002.

OMIM. **Online Mendelian Inheritance in Man.** Disponível em: <<http://www.omim.org/>>. Acesso em: 07/02/14.

ORCI, L. *et al.* Evidence that down-regulation of beta-cell glucose transporters in non-insulin-dependent diabetes may be the cause of diabetic hyperglycemia. **Proc Natl Acad Sci U S A.** v. 87, n.24, p. 9953-7. 1990.

OZAKI, K. *et al.* Functional SNPs in the lymphotoxin-alpha gene that are associated with susceptibility to myocardial infarction. **Nat Genet.** v. 32, n.4, p. 650-4. 2002.

OZER, A.; BRUICK, R. K. Non-heme dioxygenases: cellular sensors and regulators jelly rolled into one? **Nat Chem Biol.** v. 3, n.3, p. 144-53. 2007.

PALLAYOVA, M.; BANERJEE, D.; TAHERI, S. Novel insights into metabolic sequelae of obstructive sleep apnoea: A link between hypoxic stress and chronic diabetes complications. **Diabetes Res Clin Pract.** v. p. 2014.

PANG, D. X.; SMITH, A. J.; HUMPHRIES, S. E. Functional analysis of TCF7L2 genetic variants associated with type 2 diabetes. **Nutr Metab Cardiovasc Dis.** v. 23, n.6, p. 550-6. 2013.

PATEL, P. *et al.* Multiple restriction fragment length polymorphisms at the GLUT2 locus: GLUT2 haplotypes for genetic analysis of type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus. **Diabetologia.** v. 34, n.11, p. 817-21. 1991.

PENG, S. *et al.* TCF7L2 gene polymorphisms and type 2 diabetes risk: a comprehensive and updated meta-analysis involving 121,174 subjects. **Mutagenesis.** v. 28, n.1, p. 25-37. 2013.

PENG, S. *et al.* FTO gene polymorphisms and obesity risk: a meta-analysis. **BMC Med.** v. 9, p. 71. 2011.

PESSIN, J. E.; SALTIEL, A. R. Signaling pathways in insulin action: molecular targets of insulin resistance. **J Clin Invest.** v. 106, n.2, p. 165-9. 2000.

PETERHOFF, M. *et al.* Inhibition of insulin secretion via distinct signaling pathways in alpha2-adrenoceptor knockout mice. **Eur J Endocrinol.** v. 149, n.4, p. 343-50. 2003.

PETIT, P.; LOUBATIERES-MARIANI, M. M. Potassium channels of the insulin-secreting B cell. **Fundam Clin Pharmacol.** v. 6, n.3, p. 123-34. 1992.

PIERCE, M.; KEEN, H.; BRADLEY, C. Risk of diabetes in offspring of parents with non-insulin-dependent diabetes. **Diabet Med.** v. 12, n.1, p. 6-13. 1995.

PLUM, L.; BELGARDT, B. F.; BRUNING, J. C. Central insulin action in energy and glucose homeostasis. **J Clin Invest.** v. 116, n.7, p. 1761-6. 2006.

POULSEN, P. *et al.* Impact of two common polymorphisms in the PPARgamma gene on glucose tolerance and plasma insulin profiles in monozygotic and dizygotic twins: thrifty genotype, thrifty phenotype, or both? **Diabetes.** v. 52, n.1, p. 194-8. 2003.

PROKUNINA-OLSSON, L. *et al.* Alternative splicing of TCF7L2 gene in omental and subcutaneous adipose tissue and risk of type 2 diabetes. **PLoS One.** v. 4, n.9, p. e7231. 2009.

PYKE, D. A.; THEOPHANIDES, C. G.; TATTERSALL, R. B. Genetic origin of diabetes: Re-evaluation of twin data. **Lancet**. v. 2, n.7983, p. 464. 1976.

REES, S. D. *et al.* Effects of 16 genetic variants on fasting glucose and type 2 diabetes in South Asians: ADCY5 and GLIS3 variants may predispose to type 2 diabetes. **PLoS One**. v. 6, n.9, p. e24710. 2011.

REINEHR, T. *et al.* Evidence for an influence of TCF7L2 polymorphism rs7903146 on insulin resistance and sensitivity indices in overweight children and adolescents during a lifestyle intervention. **Int J Obes (Lond)**. v. 32, n.10, p. 1521-4. 2008.

REIS, A. F. *et al.* Association of a variant in exon 31 of the sulfonylurea receptor 1 (SUR1) gene with type 2 diabetes mellitus in French Caucasians. **Hum Genet**. v. 107, n.2, p. 138-44. 2000.

REINSTROM, F. *et al.* Genetic predisposition to long-term nondiabetic deteriorations in glucose homeostasis: Ten-year follow-up of the GLACIER study. **Diabetes**. v. 60, n.1, p. 345-54. 2011.

RIEDEL, M. J.; STECKLEY, D. C.; LIGHT, P. E. Current status of the E23K Kir6.2 polymorphism: implications for type-2 diabetes. **Hum Genet**. v. 116, n.3, p. 133-45. 2005.

RISSANEN, J. *et al.* Sulfonylurea receptor 1 gene variants are associated with gestational diabetes and type 2 diabetes but not with altered secretion of insulin. **Diabetes Care**. v. 23, n.1, p. 70-3. 2000.

RODRIGUEZ-PENA, M. S. *et al.* Decreased insulin content and secretion in RIN 1046-38 cells overexpressing alpha 2-adrenergic receptors. **Endocrine**. v. 7, n.2, p. 255-60. 1997.

RORSMAN, P. *et al.* Activation by adrenaline of a low-conductance G protein-dependent K⁺ channel in mouse pancreatic B cells. **Nature**. v. 349, n.6304, p. 77-9. 1991.

ROSENGREN, A. H. *et al.* Overexpression of alpha2A-adrenergic receptors contributes to type 2 diabetes. **Science**. v. 327, n.5962, p. 217-20. 2010.

ROSHAN, B.; STANTON, R. C. A story of microalbuminuria and diabetic nephropathy. **J Nephropathol.** v. 2, n.4, p. 234-240. 2013.

RUFFOLO, R. R., JR.; HIEBLE, J. P. Alpha-adrenoceptors. **Pharmacol Ther.** v. 61, n.1-2, p. 1-64. 1994.

SANCHEZ-PULIDO, L.; ANDRADE-NAVARRO, M. A. The FTO (fat mass and obesity associated) gene codes for a novel member of the non-heme dioxygenase superfamily. **BMC Biochem.** v. 8, p. 23. 2007.

SANDHU, M. S. *et al.* Common variants in WFS1 confer risk of type 2 diabetes. **Nat Genet.** v. 39, n.8, p. 951-3. 2007.

SANSBURY, F. H. *et al.* SLC2A2 mutations can cause neonatal diabetes, suggesting GLUT2 may have a role in human insulin secretion. **Diabetologia.** v. 55, n.9, p. 2381-5. 2012.

SANTER, R. *et al.* The mutation spectrum of the facilitative glucose transporter gene SLC2A2 (GLUT2) in patients with Fanconi-Bickel syndrome. **Hum Genet.** v. 110, n.1, p. 21-9. 2002.

SANTER, R. *et al.* Mutations in GLUT2, the gene for the liver-type glucose transporter, in patients with Fanconi-Bickel syndrome. **Nat Genet.** v. 17, n.3, p. 324-6. 1997.

SANTER, R.; STEINMANN, B.; SCHAUB, J. Fanconi-Bickel syndrome--a congenital defect of facilitative glucose transport. **Curr Mol Med.** v. 2, n.2, p. 213-27. 2002.

SAVIC, D. *et al.* Alterations in TCF7L2 expression define its role as a key regulator of glucose metabolism. **Genome Res.** v. 21, n.9, p. 1417-25. 2011.

SAXENA, R. *et al.* Common single nucleotide polymorphisms in TCF7L2 are reproducibly associated with type 2 diabetes and reduce the insulin response to glucose in nondiabetic individuals. **Diabetes.** v. 55, n.10, p. 2890-5. 2006.

SAXENA, R. *et al.* Genome-wide association analysis identifies loci for type 2 diabetes and triglyceride levels. **Science.** v. 316, n.5829, p. 1331-6. 2007.

SBC. V DIRETRIZ BRASILEIRA DE DISLIPIDEMIAS E PREVENÇÃO DA ATEROSCLEROSE. **Sociedade Brasileira de Cardiologia**. v. 101, n.4 supl 1, p. 36. 2013.

SBD. Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes. **Sociedade Brasileira de Diabetes**. v. 2/2013, p. 388. 2012-2013.

SBD. **Sociedade Brasileira de Diabetes**. Disponível em: <<http://www.diabetes.org.br/sala-de-noticias/2116-sao-12-milhoes-de-diabeticos-no-brasil>>. Acesso em: 11/11/2013.

SCHAFER, S. A. *et al.* Impaired glucagon-like peptide-1-induced insulin secretion in carriers of transcription factor 7-like 2 (TCF7L2) gene polymorphisms. **Diabetologia**. v. 50, n.12, p. 2443-50. 2007.

SCHEEN, A. J.; PAQUOT, N. [Type 2 diabetes: journey in the heart of a complex disease]. **Rev Med Liege**. v. 67, n.5-6, p. 326-31. 2012.

SCHLEINITZ, D.; DISTEFANO, J. K.; KOVACS, P. Targeted SNP genotyping using the TaqMan(R) assay. **Methods Mol Biol**. v. 700, p. 77-87. 2011.

SCOFIELD, M. A.; DEUPREE, J. D.; BYLUND, D. B. Adrenergic receptor genes: cDNA and genomic library construction. **Mol Biotechnol**. v. 21, n.2, p. 171-97. 2002.

SCOTT, L. J. *et al.* Association of transcription factor 7-like 2 (TCF7L2) variants with type 2 diabetes in a Finnish sample. **Diabetes**. v. 55, n.9, p. 2649-53. 2006.

SCOTT, L. J. *et al.* A genome-wide association study of type 2 diabetes in Finns detects multiple susceptibility variants. **Science**. v. 316, n.5829, p. 1341-5. 2007.

SEAQUIST, E. R. *et al.* G-protein regulation of insulin secretion. **J Lab Clin Med**. v. 123, n.3, p. 338-45. 1994.

SEINO, S.; MIKI, T. Physiological and pathophysiological roles of ATP-sensitive K⁺ channels. **Prog Biophys Mol Biol**. v. 81, n.2, p. 133-76. 2003.

SHARP, G. W. Mechanisms of inhibition of insulin release. **Am J Physiol**. v. 271, n.6 Pt 1, p. C1781-99. 1996.

SHEN, G. Q. *et al.* An LRP8 variant is associated with familial and premature coronary artery disease and myocardial infarction. **Am J Hum Genet.** v. 81, n.4, p. 780-91. 2007.

SHEN, G. Q.; LUO, A.; WANG, Q. K. High-throughput single-nucleotide polymorphisms genotyping: TaqMan assay and pyrosequencing assay. **Methods Mol Med.** v. 128, p. 209-24. 2006.

SHI, C. *et al.* IL-6 and TNF-alpha Induced Obesity-Related Inflammatory Response Through Transcriptional Regulation of miR-146b. **J Interferon Cytokine Res.** v. p. 2014.

SHI, N. Q.; YE, B.; MAKIELSKI, J. C. Function and distribution of the SUR isoforms and splice variants. **J Mol Cell Cardiol.** v. 39, n.1, p. 51-60. 2005.

SHIMADA, F. *et al.* Identification of two novel amino acid polymorphisms in beta-cell/liver (GLUT2) glucose transporter in Japanese subjects. **Diabetologia.** v. 38, n.2, p. 211-5. 1995.

SHU, L. *et al.* Decreased TCF7L2 protein levels in type 2 diabetes mellitus correlate with downregulation of GIP- and GLP-1 receptors and impaired beta-cell function. **Hum Mol Genet.** v. 18, n.13, p. 2388-99. 2009.

SHU, L. *et al.* Transcription factor 7-like 2 regulates beta-cell survival and function in human pancreatic islets. **Diabetes.** v. 57, n.3, p. 645-53. 2008.

SILANDER, K. *et al.* Genetic variation near the hepatocyte nuclear factor-4 alpha gene predicts susceptibility to type 2 diabetes. **Diabetes.** v. 53, n.4, p. 1141-9. 2004.

SIMIC, I. *et al.* Risk factors for microvascular atherosclerotic changes in patients with type 2 diabetes mellitus. **Coll Antropol.** v. 37, n.3, p. 783-7. 2013.

SLADEK, R. *et al.* A genome-wide association study identifies novel risk loci for type 2 diabetes. **Nature.** v. 445, n.7130, p. 881-5. 2007.

SMALL, K. M. *et al.* Complex haplotypes derived from noncoding polymorphisms of the intronless alpha2A-adrenergic gene diversify receptor expression. **Proc Natl Acad Sci U S A.** v. 103, n.14, p. 5472-7. 2006.

SONG, Y. *et al.* FTO polymorphisms are associated with obesity but not diabetes risk in postmenopausal women. **Obesity (Silver Spring)**. v. 16, n.11, p. 2472-80. 2008.

STAMBOLIC, V.; RUEL, L.; WOODGETT, J. R. Lithium inhibits glycogen synthase kinase-3 activity and mimics wingless signalling in intact cells. **Curr Biol**. v. 6, n.12, p. 1664-8. 1996.

STEEMBURGO, T. *et al.* The rs7204609 polymorphism in the fat mass and obesity-associated gene is positively associated with central obesity and microalbuminuria in patients with type 2 diabetes from Southern Brazil. **J Ren Nutr**. v. 22, n.2, p. 228-36. 2012.

STEINTHORSDOTTIR, V. *et al.* A variant in CDKAL1 influences insulin response and risk of type 2 diabetes. **Nat Genet**. v. 39, n.6, p. 770-5. 2007.

STERN, M. P. *et al.* Evidence for linkage of regions on chromosomes 6 and 11 to plasma glucose concentrations in Mexican Americans. **Genome Res**. v. 6, n.8, p. 724-34. 1996.

STIRLING, B. *et al.* Linkage studies in NIDDM with markers near the sulphonylurea receptor gene. **Diabetologia**. v. 38, n.12, p. 1479-81. 1995.

STOLERMAN, E. S. *et al.* TCF7L2 variants are associated with increased proinsulin/insulin ratios but not obesity traits in the Framingham Heart Study. **Diabetologia**. v. 52, n.4, p. 614-20. 2009.

STRASSER, B.; PESTA, D. Resistance Training for Diabetes Prevention and Therapy: Experimental Findings and Molecular Mechanisms. **Biomed Res Int**. v. 2013, p. 805217. 2013.

STRATIGOPOULOS, G. *et al.* Regulation of Fto/Ftm gene expression in mice and humans. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**. v. 294, n.4, p. R1185-96. 2008.

STRAUB, S. G.; SHARP, G. W. Evolving insights regarding mechanisms for the inhibition of insulin release by norepinephrine and heterotrimeric G proteins. **Am J Physiol Cell Physiol**. v. 302, n.12, p. C1687-98. 2012.

STUMVOLL, M. *et al.* Pro12Ala polymorphism in the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma2 gene is associated with increased antilipolytic insulin sensitivity. **Diabetes**. v. 50, n.4, p. 876-81. 2001.

SUH, Y.; VIJG, J. SNP discovery in associating genetic variation with human disease phenotypes. **Mutat Res**. v. 573, n.1-2, p. 41-53. 2005.

SULL, J. W.; LEE, M.; JEE, S. H. Replication of genetic effects of MC4R polymorphisms on body mass index in a Korean population. **Endocrine**. v. p. 2013.

SUN, T. *et al.* A six-nucleotide insertion-deletion polymorphism in the CASP8 promoter is associated with susceptibility to multiple cancers. **Nat Genet**. v. 39, n.5, p. 605-13. 2007.

TABARA, Y. *et al.* Replication study of candidate genes associated with type 2 diabetes based on genome-wide screening. **Diabetes**. v. 58, n.2, p. 493-8. 2009.

TALMUD, P. J. *et al.* Variants of ADRA2A are associated with fasting glucose, blood pressure, body mass index and type 2 diabetes risk: meta-analysis of four prospective studies. **Diabetologia**. v. 54, n.7, p. 1710-9. 2011.

TAN, J. T. *et al.* FTO variants are associated with obesity in the Chinese and Malay populations in Singapore. **Diabetes**. v. 57, n.10, p. 2851-7. 2008.

TANIZAWA, Y. *et al.* Variability of the pancreatic islet beta cell/liver (GLUT 2) glucose transporter gene in NIDDM patients. **Diabetologia**. v. 37, n.4, p. 420-7. 1994.

THORENS, B. *et al.* Reduced expression of the liver/beta-cell glucose transporter isoform in glucose-insensitive pancreatic beta cells of diabetic rats. **Proc Natl Acad Sci U S A**. v. 87, n.17, p. 6492-6. 1990.

THORSBY, P. M. *et al.* Comparison of genetic risk in three candidate genes (TCF7L2, PPARG, KCNJ11) with traditional risk factors for type 2 diabetes in a population-based study--the HUNT study. **Scand J Clin Lab Invest**. v. 69, n.2, p. 282-7. 2009.

TONG, Y. *et al.* Association between TCF7L2 gene polymorphisms and susceptibility to type 2 diabetes mellitus: a large Human Genome Epidemiology (HuGE) review and meta-analysis. **BMC Med Genet**. v. 10, p. 15. 2009.

TSCHRITTER, O. *et al.* The cerebrocortical response to hyperinsulinemia is reduced in overweight humans: a magnetoencephalographic study. **Proc Natl Acad Sci U S A**. v. 103, n.32, p. 12103-8. 2006.

TSCHRITTER, O. *et al.* Variation in the FTO gene locus is associated with cerebrocortical insulin resistance in humans. **Diabetologia**. v. 50, n.12, p. 2602-3. 2007.

TSUCHIHASHI, Z.; DRACOPOLI, N. C. Progress in high throughput SNP genotyping methods. **Pharmacogenomics J**. v. 2, n.2, p. 103-10. 2002.

TURKI, A. *et al.* Transcription factor-7-like 2 gene variants are strongly associated with type 2 diabetes in Tunisian Arab subjects. **Gene**. v. 513, n.2, p. 244-8. 2013.

UMA JYOTHI, K. *et al.* Association of TCF7L2 gene polymorphisms with T2DM in the population of Hyderabad, India. **PLoS One**. v. 8, n.4, p. e60212. 2013.

UTIYAMA, S. R. R. *et al.* Pesquisa de anticorpos anti-endomísio no laboratório de imunopatologia da ufpr: dez anos de experiência na triagem de doença celíaca em pacientes, grupos de risco e populações. **RBAC**. v. 41, n.1, p. 27-33. 2009.

UYSAL, K. T.; WIESBROCK, S. M.; HOTAMISLIGIL, G. S. Functional analysis of tumor necrosis factor (TNF) receptors in TNF-alpha-mediated insulin resistance in genetic obesity. **Endocrinology**. v. 139, n.12, p. 4832-8. 1998.

VAN DAM, R. M. *et al.* Common variants in the ATP-sensitive K⁺ channel genes KCNJ11 (Kir6.2) and ABCC8 (SUR1) in relation to glucose intolerance: population-based studies and meta-analyses. **Diabet Med**. v. 22, n.5, p. 590-8. 2005.

VAN DE BUNT, M.; GLOYN, A. L. A tale of two glucose transporters: how GLUT2 re-emerged as a contender for glucose transport into the human beta cell. **Diabetologia**. v. 55, n.9, p. 2312-5. 2012.

VAN DER HEIDE, L. P.; RAMAKERS, G. M.; SMIDT, M. P. Insulin signaling in the central nervous system: learning to survive. **Prog Neurobiol**. v. 79, n.4, p. 205-21. 2006.

VAN HOUTEN, M. *et al.* Insulin-binding sites in the rat brain: in vivo localization to the circumventricular organs by quantitative radioautography. **Endocrinology**. v. 105, n.3, p. 666-73. 1979.

VENDRELL, J.; CHACON, M. R. TWEAK: A New Player in Obesity and Diabetes. **Front Immunol**. v. 4, p. 488. 2013.

VIANA, L. V. *et al.* Poor glycaemic control in Brazilian patients with type 2 diabetes attending the public healthcare system: a cross-sectional study. **BMJ Open**. v. 3, n.9, p. e003336. 2013.

VIONNET, N. *et al.* Analysis of 14 candidate genes for diabetic nephropathy on chromosome 3q in European populations: strongest evidence for association with a variant in the promoter region of the adiponectin gene. **Diabetes**. v. 55, n.11, p. 3166-74. 2006.

VISWANATHAN, M. *et al.* High prevalence of type 2 (non-insulin-dependent) diabetes among the offspring of conjugal type 2 diabetic parents in India. **Diabetologia**. v. 28, n.12, p. 907-10. 1985.

WAGNER, R. *et al.* Glucose-raising genetic variants in MADD and ADCY5 impair conversion of proinsulin to insulin. **PLoS One**. v. 6, n.8, p. e23639. 2011.

WAHLEN, K.; SJOLIN, E.; HOFFSTEDT, J. The common rs9939609 gene variant of the fat mass- and obesity-associated gene FTO is related to fat cell lipolysis. **J Lipid Res**. v. 49, n.3, p. 607-11. 2008.

WANG, H. *et al.* Genetic variants in FTO associated with metabolic syndrome: a meta- and gene-based analysis. **Mol Biol Rep**. v. 39, n.5, p. 5691-8. 2012.

WANG, L.; LUHM, R.; LEI, M. SNP and mutation analysis. **Adv Exp Med Biol**. v. 593, p. 105-16. 2007.

WANG, Z.; MOULT, J. SNPs, protein structure, and disease. **Hum Mutat**. v. 17, n.4, p. 263-70. 2001.

WEEDON, M. N. *et al.* A large-scale association analysis of common variation of the HNF1alpha gene with type 2 diabetes in the U.K. Caucasian population. **Diabetes**. v. 54, n.8, p. 2487-91. 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.

WILLER, C. J. *et al.* Screening of 134 single nucleotide polymorphisms (SNPs) previously associated with type 2 diabetes replicates association with 12 SNPs in nine genes. **Diabetes**. v. 56, n.1, p. 256-64. 2007.

WINCKLER, W. *et al.* Association of common variation in the HNF1alpha gene region with risk of type 2 diabetes. **Diabetes**. v. 54, n.8, p. 2336-42. 2005.

WING, M. R. *et al.* Analysis of FTO gene variants with measures of obesity and glucose homeostasis in the IRAS Family Study. **Hum Genet**. v. 125, n.5-6, p. 615-26. 2009.

WOLFS, M. G. *et al.* Type 2 Diabetes Mellitus: New Genetic Insights will Lead to New Therapeutics. **Curr Genomics**. v. 10, n.2, p. 110-8. 2009.

WOOD, I. S.; TRAYHURN, P. Glucose transporters (GLUT and SGLT): expanded families of sugar transport proteins. **Br J Nutr**. v. 89, n.1, p. 3-9. 2003.

XI, B.; MI, J. FTO polymorphisms are associated with obesity but not with diabetes in East Asian populations: a meta-analysis. **Biomed Environ Sci**. v. 22, n.6, p. 449-57. 2009.

YAMADA, R. Primer: SNP-associated studies and what they can teach us. **Nat Clin Pract Rheumatol**. v. 4, n.4, p. 210-7. 2008.

YANG, Y. Wnt signaling in development and disease. **Cell Biosci**. v. 2, n.1, p. 14. 2012.

YEO, G. S.; O'RAHILLY, S. Uncovering the biology of FTO. **Mol Metab**. v. 1, n.1-2, p. 32-6. 2012.

YI, F.; BRUBAKER, P. L.; JIN, T. TCF-4 mediates cell type-specific regulation of proglucagon gene expression by beta-catenin and glycogen synthase kinase-3beta. **J Biol Chem**. v. 280, n.2, p. 1457-64. 2005.

ZEGGINI, E. *et al.* Replication of genome-wide association signals in UK samples reveals risk loci for type 2 diabetes. **Science**. v. 316, n.5829, p. 1336-41. 2007.

ZENG, X. *et al.* A dual-kinase mechanism for Wnt co-receptor phosphorylation and activation. **Nature**. v. 438, n.7069, p. 873-7. 2005.

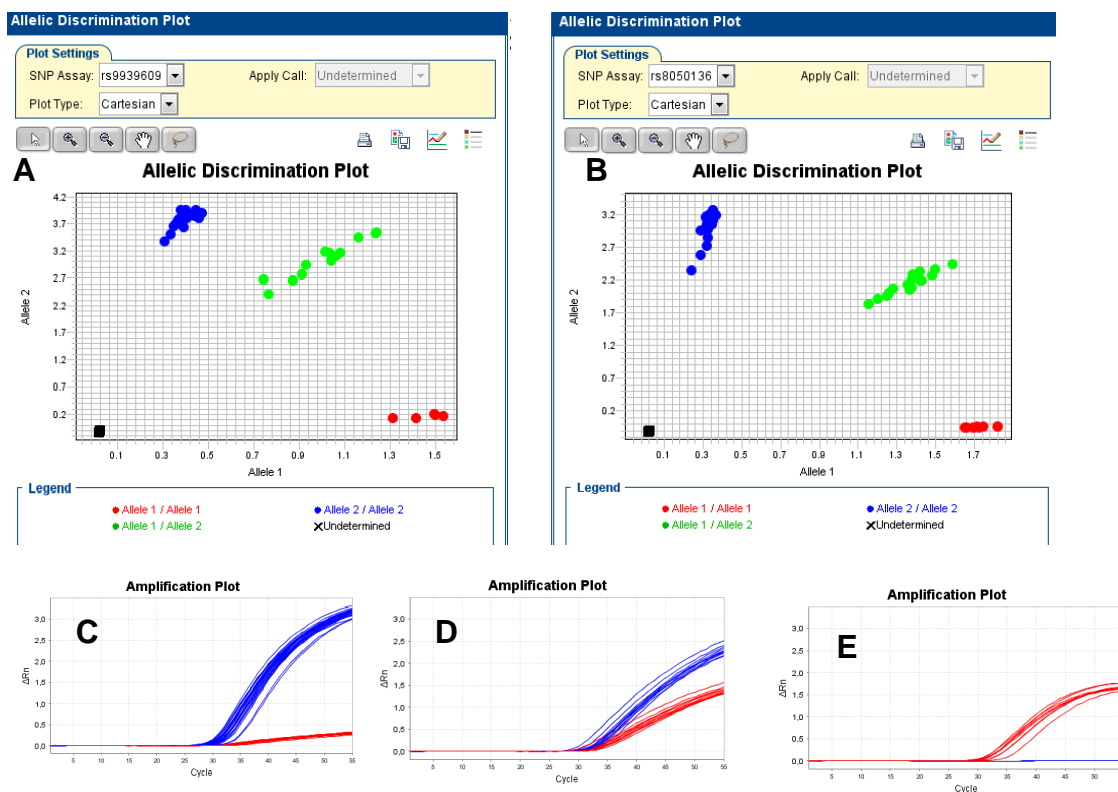
ZHANG, C. *et al.* Variant of transcription factor 7-like 2 (TCF7L2) gene and the risk of type 2 diabetes in large cohorts of U.S. women and men. **Diabetes**. v. 55, n.9, p. 2645-8. 2006.

ZHAO, F. Q.; KEATING, A. F. Functional properties and genomics of glucose transporters. **Curr Genomics**. v. 8, n.2, p. 113-28. 2007.

ZHU, G. *et al.* Association of PTGDR gene polymorphisms with asthma in two Caucasian populations. **Genes Immun**. v. 8, n.5, p. 398-403. 2007.

ANEXOS

ANEXO I



PCR EM TEMPO REAL PARA O GENE FTO (SNPs rs9939609 e rs8050136). **Quadro A.** Gráfico de discriminação alélica SNP rs9939609. Em vermelho estão amostras homocigotas (genótipo A/A); em verde, amostras heterocigotas (genótipo A/T) e em azul, amostras homocigotas (genótipo T/T). **Quadro B.** Gráfico de discriminação alélica SNP rs8050136. Em vermelho estão amostras homocigotas (genótipo A/A); em verde, amostras heterocigotas (genótipo A/C) e em azul, amostras homocigotas (genótipo C/C). **Quadro C.** Gráfico de amplificação dos alelos: Genótipo C/C (rs8050136). Verifica-se a amplificação somente para o alelo C (azul escuro). **Quadro D.** Gráfico de amplificação dos alelos: Genótipo A/C (rs8050136). Verifica-se a amplificação de ambos os alelos, A (vermelho) e C (azul escuro). **Quadro E.** Gráfico de amplificação dos alelos: Genótipo A/A. Verifica-se a amplificação somente do alelo A (vermelho).

ANEXO II

Quadro 1. Polimorfismos do gene *ABCC8* reportados em associação com o DM2 e fenótipos relacionados

Localização no gene <i>ABCC8</i>	Nome usual	dbSNP ID	Variante	Associação	Referências
Exon 18 ou Exon 22 ^Ω	Syn T759T Syn T761T ^Ω	rs1801261	A/G*	Caucasianos UK DM2 ^Ω (P=0,0008) Caucasianos franceses DM2 ^Ω (P=0,030) e OM (P=0,023) Caucasianos dinamarqueses DM2 (P<0,001) Escandinavos aparentados DM2 (P<0,012)	INOUE et al., 1996 HANI et al., 1997 ^Ω HANSEN et al., 1998 ALTSCHULER et al., 2000
Intron 15 ou Intron 24 ^Ψ	IVS15 -3 (-3c-->t) Intron 24 T/C	rs1799854	A/G*	Caucasianos UK DM2 (P<0,0001) Caucasianos holandeses DM2 (P=0,01) Caucasianos filandeses DMG (P=0,024) e DM2 (P=0,009) Franceses DM2 (P= 0,017) Chineses DM2 (P= 0,007) Japoneses DM2 (P=0,0073) Chineses Han [I-2hPP] (P=0,005) Turcos DM2 (P<0,001)	INOUE et al., 1996 ^Ψ HART et al., 1999 RISSANEN et al., 2000 MEIRHAEGHE et al., 2001 JI et al., 1998 ^Ψ YOKOI et al., 2006 WANG et al., 2009 GONEN et al., 2012
Exon 31	Syn R1273R	rs4148643	T/C*	Caucasianos filandeses DMG (P=0,009) e DM2 (P=0,001) Mexicanos americanos ↑ [IJ] (P=0,043) e [I-2h] (P=0,0003) Caucasianos franceses DM2 (P=0,0003) Russos DM2 (P=1,95X10 ⁻⁵) Turcos DM2 (P<0,001) (REIS <i>et al.</i> , 2000; RISSANEN <i>et al.</i> , 2000)	RISSANEN et al., 2000 GOKSEL et al., 1998 REIS et al., 2000 CHISTIYAKOV et al., 2009 GONEN et al., 2012
	IVS38+54	rs4148646	2-sided G/C*	Caucasianos UK DM2 (P=0,0043)	BARROSO et al., 2003
	IVS18-36	rs4148628		Caucasianos UK DM2 (P=0,0163)	BARROSO et al., 2003
Intron 11	IVS11-74	rs2074308	C/T*	Caucasianos UK DM2 (P=0,0480) Norte asiáticos DM2 (P=5x10 ⁻⁴)	BARROSO et al., 2003 ODGEREL et al., 2012
Exon 14	K649	rs1799858	T/C*	Caucasianos UK DM2 (P=0,0157) Norte asiáticos DM2 (P=0,0022)	BARROSO et al., 2003 ODGEREL et al., 2012
Exon 33	S1369A	rs757110 ^{††}	C/A*	Caucasianos UK DM2 (P=0,0048) População global DM2 (P < 0.0001)	BARROSO et al., 2003 QIN, LV and HUANG, 2013
	IMS-JST032704	rs2283257	T/C*	Japoneses DM2 (P<0,01)	DAIMON et al., 2003
Promotor	2240C>T	rs3758947	G/A	Finlandese DM2 (P=0,007)	KILPELAINEN et al., 2007

* Alelo de risco/não risco reportado

2-sided = Bidirecional: indica SNPs testados com teste bidirecional porque previamente o alelo de risco foi difícil de determinar para SNPs ambíguos (tais como C/G) ou o SNP mostrou evidência de associação com ambos os alelos em diferentes estudos.

‡ SNPs não sinônimos

† SNPs em $r^2 > 0,8$ com outro SNP genotipado

Ω: Estes artigos reportaram a como: variante T761T no exon 22

Ψ: Estes artigos reportaram a como: variante -3c-->t no intron 24

Abreviações: IVS: sequência variante intrônica; UK: Reino Unido; DM2: diabetes tipo 2; OB: obesidade mórbida; [I-2hPP]: concentrações plasmáticas de insulina 2 horas pós prandial; [IJ]: concentrações plasmáticas de insulina em jejum; [I-2h]: concentrações plasmáticas de insulina 2 horas após sobrecarga com glicose;

Fonte: Adaptado de (WILLER *et al.*, 2007)

ANEXO III

Quadro 2. SNPs no gene SLC2A2 reportados em associação com o DM2 e fenótipos relacionados
Alelo de risco/não risco reportado

Localização no gene SLC2A2	Nome usual	dbSNP ID	Variante	Associação	Referências
	TaqI	rs6785803 [†]	2-sided C/G*	Britânicos DM2 (P<0,03)	ALCOLADO, BARONI and Li, 1991
Intron 5	IVS5-15	rs5406 [†]	2-sided A/G*	Caucasianos UK DM2 (OR= 1,44 e P=0,0117)	(BARROSO <i>et al.</i> , 2003)
Exon 5	T198	rs5404	2-sided T/C*	Caucasianos UK DM2 (OR= 1,39 e P=0,0318) Preditor de progressão indivíduos obesos finlandeses intolerantes à glicose para DM2	BARROSO <i>et al.</i> , 2003 LAUKKANEN <i>et al.</i> , 2005
Exon 3	T110I	rs5400 [‡]	2-sided A/G*	Caucasianos UK DM2 (OR= 1,49 e P=0,0059) Preditor de progressão indivíduos obesos finlandeses intolerantes à glicose para DM2 Filandeses DM2 (P=0,014 e 0,01) Europeus CT (P=3,57X10 ⁻⁵) e LDL-C (P=4,22X10 ⁻⁴) Europeus risco diminuído de nefropatia (P=0,016)	BARROSO <i>et al.</i> , 2003 LAUKKANEN <i>et al.</i> , 2005 WILLER <i>et al.</i> , 2007 e GAULTON <i>et al.</i> , 2008 IGL <i>et al.</i> , 2010 VIONNET <i>et al.</i> , 2006
Exon 10	Phe497	rs5398	2-sided A/G*	Índios Pima DM2	YASUDA and SEINO, 1994
Promotor (-149)	-461A>C -149A>C	rs5393	C/A	Preditor de progressão indivíduos obesos finlandeses intolerantes à glicose para DM2	LAUKKANEN <i>et al.</i> , 2005
Promotor (-122)	-434C>T -122C>T	rs5394	T/C	Preditor de progressão indivíduos obesos finlandeses intolerantes à glicose para DM2	LAUKKANEN <i>et al.</i> , 2005
	1069-566A>T, 170717521T>A, 32248A>T, 77212667T>A	rs11920090 [†]	T/A	Europeus não diabéticos GJ (P=3,3X10 ⁻⁶) Dinamarqueses alelo A DAC (P = 0,0004)	DUPUIS <i>et al.</i> , 2010 BORGLYKKE <i>et al.</i> , 2012
	170724210C>T, 25559G>A, 613-316G>A, 77219356C>T	rs10513684		Europeus CT (P=2,91X10 ⁻⁵) e LDL-C (P=1,98X10 ⁻⁴)	IGL <i>et al.</i> , 2010

2-sided = Bidirecional: indica SNPs testados com teste bidirecional porque previamente o alelo de risco foi difícil de determinar para SNPs ambíguos (tais como C/G) ou o SNP mostrou evidência de associação com ambos os alelos em diferentes estudos.

‡ SNPs não sinônimos

[†] SNPs em $r^2 > 0,8$ com outro SNP genotipado: rs5400 com rs6785803 e rs5406; rs11920090 com rs5400

Abreviações: IVS: sequência variante intrônica; DM2: diabetes tipo 2; CT: colesterol total; HDL-C: HDL-colesterol; GJ: glicemia em jejum; DAC: doença cardiovascular

Fonte: Adaptado de(WILLER *et al.*, 2007)

ANEXO IV

QUADRO 3. SNPs no gene ADRA2A reportados em associação com o DM2 e fenótipos relacionados

Localização no gene ADRA2A	Nome usual	dbSNP ID	Variante	Associação	Referências
	<i>Dral</i> RFLP		d/D	Alelo d em hipertensos caucasianos ↓ HbA1C (3,4 vs 3,9%, P=0,0237) e ↓ CT (212 vs 229, P=0,0333)	MICHEL et al., 1999
Região intergênica à 0,2 Mb de distância do gene ADRA2A	113042093T>G, 63846557T>G	rs10885122	G/T	Dinamarqueses não DM de meia idade alelo G (alelo maior proporção) ↓ secreção de I em resposta TTOG (P=0,0001) Europeus não DM alelo G (alelo maior proporção) ↑GJ (P=9,7X10 ⁻⁸) Europeus não DM com risco ↑ para DM2 conversão de P-I em IJ Suecos de meia-idade piora da glicemia em 10 anos	BOESGAARD et al., 2010 DUPUIS et al., 2010 WAGNER et al., 2009 RESTROM et al., 2011
Região 3'UTR	*427A>G, 112839579A>G, 63644043A>G, 7790A>G	rs553668	A/G	↓ modesta I e DM2 UK DM2 (P=0,007) e ↑GJ (P=0,011 no limite da significância) USA ↑ PA induzido por 30 ≠ etnias ↑PA induzido por estresse Chineses Han DM2 com IMC <25 kg/m ⁽²⁾ (P=0,03) Caucasianos com AA ↑GJ e piora da GJ e secreção de I depois de 6 anos M-A várias populações separadas por etnia DM2	ROSENGREN et al., 2010 TALMUD et al., 2011 FINLEY et al., 2004 SMALL et al., 2006 LI et al., 2012 BO et al., 2012 CHEN et al., 2013
	112831787A>G, 63636251A>G	rs17186196		UK ↑GJ e ↑HOMA-IR (P<0,03 para todos)	TALMUD et al., 2011
	112834632T>C, 2843T>C, 63639096T>C	rs491589		UK ↑Pressão sistólica e diastólica (P=0,002)	TALMUD et al., 2011
	-1183A>G, 112836572A>G, 4783A>G, 63641036A>G	rs36022820		UK IMC (P=0,009)	TALMUD et al., 2011

Abreviações: CT: colesterol total; DM; diabetes mellitus; I: insulina; TTOG: teste de tolerância oral à glicose; GJ: glicemia em jejum; DM2: diabetes tipo 2; P-I: pró-insulina; IJ: insulina em jejum; IMC: índice de massa corpórea; M-A: meta análise; HOMA-IR: *homeostatic model assessment – insuline resistance*.

Fonte: Autor, 2014

ANEXO V

UNIVERSIDADE FEDERAL DO
PARANÁ - SETOR DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE/ SCS -



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Variabilidade de genes associados ao Diabetes tipo 1 e 2 e biomarcadores de controle glicêmico

Pesquisador: Marciane Welter

Área Temática:

Versão: 4

CAAE: 05335612.4.0000.0102

Instituição Proponente: Universidade Federal do Paraná - Setor de Ciências da Saúde/ SCS

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 170.094

Data da Relatoria: 05/12/2012

Apresentação do Projeto:

Este projeto é descrito como um estudo caso-controle no qual será avaliada a frequência da variabilidade de genes associados ao Diabetes tipo 1 e 2 na população brasileira.

AMOSTRA

360 indivíduos (n=360), classificados em diabéticos tipo 1 (Grupo DM1, n=120), tipo 2 (Grupo DM2, n=120) e indivíduos saudáveis, com idade entre 18 e 80 anos, sem diabetes (Grupo Controle, n=120), serão estudados.

Objetivo da Pesquisa:

OBJETIVO GERAL

Estudar as variações genéticas associadas ao Diabetes tipo 1 e 2 e correlacionar com biomarcadores de controle glicêmico, perfil lipídico e função renal.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Identificar as frequências genotípicas e alélicas de variações genéticas associadas ao diabetes (tipo 1 e 2) em uma amostra da população brasileira.

Correlacionar as variações genéticas, identificadas nos grupos estudados, com biomarcadores de controle glicêmico, perfil lipídico e função renal.

Relacionar as variações genéticas em estudo com as características clínicas dos pacientes

Endereço: Rua Padre Camargo, 280

Bairro: 2ª andar

CEP: 80.060-240

UF: PR

Município: CURITIBA

Telefone: (41)3360-7259

E-mail: cometica.saude@ufpr.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DO
PARANÁ - SETOR DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE/ SCS -



estudados.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Não haverá risco para o sujeito de pesquisa, pois não será realizado nenhum procedimento específico neste projeto de pesquisa. O sujeito da pesquisa poderá experimentar apenas um desconforto comum originário da metodologia de coleta (ex.: picada de agulha). Será utilizado o material que foi, previamente, coletado para os demais exames de rotina realizados no Hospital de Clínicas da UFPR aos cuidados da Dra. Rosângela R. Réa.

Como benefícios, os autores informam que a identificação de um marcador poderá contribuir para um maior conhecimento do perfil genético da população estudada e, com isso, um melhor entendimento da patologia em destaque. Ainda, segundo os autores são poucos os estudos estudos com este enfoque descritos na população brasileira e o achado de SNPs apresentando alta frequência associados ao diabetes e à obesidade, nesta população, poderá mudar a realidade atual trazendo mais informações, benefícios e estimulando políticas de saúde públicas neste país.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

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 (Single Nucleotide Polymorphism, SNP), o qual pode ser responsável pelas diferenças inter-individuais em fenótipos complexos. A pesquisa de novos biomarcadores associados a risco/proteção para o diabetes e suas complicações pode oferecer aos afetados um diagnóstico precoce, melhor identificação do prognóstico e resposta terapêutica eficaz. Neste contexto, a proposta de estudar a variabilidade de genes e suas relações com o diabetes e outros marcadores já estabelecidos, objetiva ampliar o conhecimento dos processos fisiopatológicos associados ao Diabetes mellitus.

As amostras de sangue e os dados dos sujeitos de pesquisa poderão ser utilizados em pesquisa complementares futuras, conforme consentimento dos sujeitos de pesquisa (TCLE, Termo de Consentimento Livre e Esclarecido), pois estarão armazenadas com todo o cuidado no biorrepositório do laboratório aos cuidados do prof. Dr. Geraldo Picheth. Os sujeitos terão total liberdade de escolha, caso queiram deixar colaborar com a pesquisa.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os documentos exigidos foram anexados e as pendências apontadas foram atendidas no TCLE.

Endereço: Rua Padre Camargo, 280

Bairro: 2ª andar

UF: PR

Telefone: (41)3360-7259

Município: CURITIBA

CEP: 80.060-240

E-mail: cometica.saude@ufpr.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DO
PARANÁ - SETOR DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE/ SCS -



Recomendações:

Trata-se de biorrepositório.

Solicitamos que sejam apresentados a este CEP, relatórios semestrais sobre o andamento da pesquisa, bem como informações relativas às modificações do protocolo, cancelamento, encerramento e destino dos conhecimentos obtidos, através da Plataforma Brasil - no modo: NOTIFICAÇÃO.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Pendências atendidas.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

É obrigatório trazer ao CEP/SD uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido que foi aprovado, para que seja carimbado com a data de aprovação por este CEP.

O TCLE deverá conter duas vias, uma ficará com o pesquisador e uma cópia ficará com o participante da pesquisa (Carta Circular nº. 003/2011CONEP/CNS).

CURITIBA, 12 de Dezembro de 2012

Assinador por:
Cláudia Seely Rocco
(Coordenador)

Prof.ª Dr.ª Cláudia Seely Rocco
Coordenadora do Comitê de Ética
em Pesquisa - SD/UFPR

Endereço: Rua Padre Camargo, 280

Bairro: 2ª andar

UF: PR

Município: CURITIBA

Telefone: (41)3360-7259

CEP: 80.060-240

E-mail: cometica.saude@ufpr.br

ANEXO VI

Planilha de coleta de dados

Caracterização do paciente		Data
Registro do HC:		___/___/___
Nome:		
Dados Clínicos		
N	Dados	Obs.
1	Idade	() anos
2	Peso	() Kg
3	Altura	() cm
4	Etnia	(1) = Euro brasileiro (2) = Afro brasileiro (3) = Índio (4) = Oriental
5	Tipo de diabetes	(1) = tipo 1 (2) = tipo 2 Tempo de início: _____ anos
6	Pressão arterial (PA)	(_____,_____) mmHg Medicamentos para pressão: _____
7	Tabagismo	(1) = Nunca fumou (2) = Ex-fumante (3) = fumante
8	Histórico de obesidade	(1) = sim (2) = não pessoal
9	História familiar de diabetes	Pais: (1) = sim (2) = não Avós: (1) = sim (2) = não Demais familiares : (1) = sim (2) = não Quais:
10	História familiar de DAC	Pais: (1) = sim (2) = não Avós: (1) = sim (2) = não Demais familiares : (1) = sim (2) = não Quais:
11	História familiar de doença tireoideana	Pais: (1) = sim (2) = não Avós: (1) = sim (2) = não Demais familiares : (1) = sim (2) = não Quais:
12	Medicamentos	Descrever: Hipolipemiante: Tireóide: Hipoglicemiante: Insulina:
13	Exames	Glicemia de jejum: TOTG: Perfil: Pós-prandial: Hb glicada: Creatinina: Microalbuminúria: TSH: aTG: aTPO: Outros:
14	Outras patologias	Doenças autoimunes: (1) = Sim (2) = Não
15	Outras observações	