

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

BRUNA RODRIGUES MARTINS

**VARIABILIDADE NOS GENES DA INSULINA E PAX4
EM CRIANÇAS COM *DIABETES MELLITUS* TIPO 1**

CURITIBA

2016

BRUNA RODRIGUES MARTINS

**VARIABILIDADE NOS GENES DA INSULINA E PAX4
EM CRIANÇAS COM *DIABETES MELLITUS* TIPO 1.**

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas, no Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, setor de Ciências da Saúde, da Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Profa. Dra. Fabiane G. M. Rego.
Co-orientador: Prof. Dr. Geraldo Picheth.

CURITIBA
2016

Martins, Bruna Rodrigues

Variabilidade nos genes da insulina e pax4 em crianças com *diabetes mellitus* tipo 1 / Bruna Rodrigues Martins – Curitiba, 2016.

105 f.: il.; 30 cm.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Fabiane G.de M. Rego.

Coorientador: Prof. Dr. Geraldo Picheth

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

Inclui bibliografia

1.Diabetes mellitus tipo I. 2. Polimorfismo de único nucleotídeo.
3.Variação genética. I. Rego, Fabiane G.de M. II. Picheth, Geraldo. III.
Universidade Federal do Paraná. IV. Título.


CDD 615.1

TERMO DE APROVAÇÃO

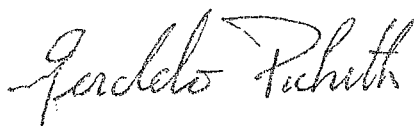
BRUNA RODRIGUES MARTINS

**Título: "VARIABILIDADE NOS GENES DA INSULINA E PAX4
EM CRIANÇAS COM DIABETES MELLITUS TIPO 1"**

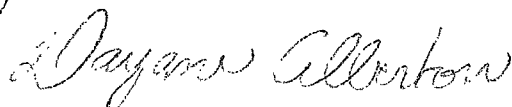
Dissertação aprovada como requisito parcial para a obtenção de grau de Mestre, no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal do Paraná, área de concentração: Análises Clínicas.



Profª. Drª. Fabiane Gomes de Moraes Rego
Orientadora



Prof. Dr. Geraldo Picheth
Co-orientador



Profª. Drª. Dayane Alberton
Universidade Federal do Paraná



Profª. Drª. Mauren Isfer Anghebem-Oliveira
Universidade Federal do Paraná

Curitiba, 15 de dezembro de 2016.

AGRADECIMENTOS

Chegar até aqui é para poucos, e hoje eu agradeço infinitamente a Deus que me proporcionou essa oportunidade, e aos meus pais Giancarlo R. Martins, e Maria Helena G. Martins que sempre acreditaram em mim e nunca mediram esforços para que eu conquistasse os meus sonhos.

Aos meus professores da Universidade Paranaense, o meu muito obrigada. Todos foram essenciais para minha formação. Em especial aos professores, Cibeli Lunardeli, Jean Colacite e Renata S. I. Hirata, que me indicaram ao mestrado e se colocaram a disposição para o que fosse necessário.

Agradeço imensamente a minha orientadora prof. Dra. Fabiane Gomes de Moraes Rego que mesmo sem me conhecer, confiou no meu trabalho e me deu a oportunidade de trabalhar com o grupo. Obrigada professora por todo ensinamento e confiança, e também por não medir esforços para ajudar seus alunos.

Ao meu co-orientador professor Dr. Geraldo Picheth que sempre esteve presente nos experimentos, ensinando e caminhando junto, e que também foi nosso mestre na estatística. Obrigada professor por nos presentear com tão grande conhecimento.

A professora Dra. Dayane Alberton, que além de transmitir grande conhecimento, sempre esteve pronta para o que fosse necessário. Obrigada professora, por ser assim, como você é, e por deixar nossos dias mais alegres.

Ao professor Dr. Roberto Pontarolo que foi o meu primeiro contato com a Universidade Federal, e que também confiou no meu trabalho e me ajudou a chegar até aqui.

Aos membros da Banca examinadora, Professoras Doutoras: Fabiane Gomes de Moraes Rego (Orientadora) Dayane Alberton e Mauren Isfer.

Aos meus colegas de laboratório Adriana, Ana Karla, Catiane, Danielly, Diogo, Henrique, Liliane, Luiza, Marciane, Susan, Valdemar, e Yusra, que trabalharam comigo e me ensinaram grande parte do que sei hoje. Todos tiveram papel importante no meu desenvolvimento, cada um da sua forma.

A Susan que trabalhou todo tempo comigo, e se tornou mais que uma amiga. Fizemos juntas os géis mais bonitos, e também aqueles que pareciam improváveis. Nos entendíamos apenas pelo olhar, e construímos uma amizade que foi além das bancadas do laboratório e que espero levar pela vida toda. Obrigada Su pela amiga

e companheira que você é! E também por muitas vezes se colocar em segundo plano para ajudar os outros.

A Catiane que desde o início foi meu porto seguro. Nas aulas de química, de biologia molecular e celular, e também nos conselhos da vida. Com ela eu aprendi, e amadureci muito, e também construí uma amizade que quero levar pela vida toda. Obrigada Cati por tudo! Você sabe o quanto foi importante na minha trajetória! Obrigada também pelos bolos maravilhosos que sempre levava ao laboratório.

Aos meus amigos Elias Marques, Robson Ricardo, Taylon Pereira, e Mariangela Borges que foram meus guias nessa caminhada. Não tenho palavras para dizer como são importantes para mim, e o quanto fizeram a diferença na minha vida. A vocês o meu muito obrigada!

Ao Dr. Rodrigo P. Picanço que foi o meu companheiro nessa jornada. Obrigada pelo apoio, preocupação, e atenção.

Ao meu primeiro professor na prática das Análises Clínicas, Ahmad Issa. Com ele eu aprendi a ler as primeiras lâminas, e fazer as primeiras dosagens bioquímicas. Agradeço muito pela oportunidade de ter trabalhado com você Armando, e pelo enorme conhecimento que me transmitiu sem medir esforços. Muito Obrigada!

Ao Dr. Moacir L. G. Felsky, Gelcir M. Felsky e Dra. Marília P. Picanço pelo grande apoio.

As minhas avós Dirce e Izolina, e a toda minha família, que mesmo de longe torceram por mim. Todos foram essenciais nessa fase da minha vida.

“O sofrimento da caminhada, vale a
alegria de uma chegada”.

Pe. Fabio de Melo.

RESUMO

Diabetes mellitus tipo 1 (DM1) é uma doença grave que afeta um grande número de pacientes jovens. É caracterizada pela incapacidade do organismo para produzir insulina devido a destruição auto-imune das células beta pancreáticas. Corresponde cerca de 10% do número de diabéticos e tem aumentado cerca de 3% a cada ano, ocorrendo principalmente em crianças. O objetivo do trabalho foi avaliar a associação de polimorfismos de nucleotídeo único dos genes da Insulina (rs3842752) e *PAX4* (*Paired Box4*) (rs 2233575 e rs712701) com o DM1 em um estudo de caso-controle e a correlação destas variações com os marcadores bioquímicos de perfil glicêmico (glicose, Hemoglobina glicada, 1,5-AG), perfil lipídico (colesterol total, colesterol-HDL, colesterol-LDL, triglicérides), função renal (ureia, creatinina) e, dados clínicos das crianças estudadas (idade, peso, IMC, Z-score, histórico familiar de DM, histórico de cetoacidose diabética). Foram estudadas 316 crianças Euro-brasileiras, não relacionadas, sendo 148 crianças com DM1 e 168 crianças saudáveis (grupo controle). As genotipagens dos polimorfismos selecionados para o estudo foram realizadas por PCR-RFLP (rs3842752 e rs2233575) e por TaqMan® (rs712701). O projeto teve aprovação do comitê de ética da UFPR (CAAE: 24676613.6.0000.0102). Crianças com DM1 apresentaram Z-score significativamente menor ($P < 0,05$) quando comparado ao grupo controle. As concentrações séricas de glicemia em jejum, HbA1c, colesterol total, HDL, LDL, ureia e creatinina foram significativamente maiores no grupo com DM1. Entretanto, o grupo controle apresentou concentrações séricas significativamente maiores quanto a 1,5-AG, triglicérides, ácido úrico e proteínas totais. Os polimorfismos em estudo estão no equilíbrio de Hardy-Weinberg. Para o grupo saudável os alelos de menor frequência apresentaram respectivamente 15,8% (95%IC 12-20) para o rs3842752, 26,5% (95%IC 22-31), para o rs712701. Já o rs2233575 não se detectou o alelo de menor frequência. O polimorfismo rs712701 do gene *PAX4* não foi associado ao DM1. O polimorfismo rs3842752 foi associado ao aumento de glicose e creatinina no grupo DM1. As frequências genotípicas e alélicas do polimorfismo rs3842752 do gene da insulina apresentaram diferenças significativas ($P < 0,05$) entre os grupos estudados, sendo associado ao DM1. Portadores do alelo T possuem risco reduzido para desenvolver DM1 em cerca de um terço com OR: 0,31 (95%IC 0,17-0,55) e os portadores do alelo C possuem risco aumentado em cerca de 3 vezes de desenvolver DM1 com OR: 3,28 (95%IC 1,83-5,87).

Palavras chave: *Diabetes mellitus* tipo 1; Polimorfismos de único nucleotídeo; Variabilidade genética.

ABSTRACT

Type 1 diabetes mellitus (T1DM) is a severe disease affecting a large number of young patients. It is characterized by the body's inability to produce insulin due to the autoimmune destruction of the beta cells in the pancreas. It corresponds to about 10% of the number of diabetics and has increased about 3% per year, occurring mostly in children. The aim of the study was to evaluate the association of single nucleotide polymorphisms of *Insulin* gene (rs3842752) and *PAX4* (Paired Box4) (rs2233575, and rs712701) with T1D in a case-control study, and the correlation of these changes with biochemical markers of glycemic profile (glucose, HbA1c, 1,5-AG), lipid profile (total cholesterol, HDL-cholesterol, LDL-cholesterol, triglycerides), renal function (urea, creatinine), total protein, albumin, uric acid, and clinical data of the children (age, weight, BMI, Z-score, DM family history, diabetic ketoacidosis history). Have been studied 316 Euro-Brazilian children, and the subjects were classified as T1D patients (T1DM, n= 148), and healthy children (control, n= 168). The genotyping of the polymorphisms was performed by RFLP-PCR (rs3842752, and rs2233575), and by the method TaqMan® (rs712701). The project was approved by the Ethics Committee UFPR (CAAE: 24676613.6.0000.0102). Children with T1DM presented Z-score lower compared to the control group. Serum concentrations of fasting glucose, HbA1c, total cholesterol, HDL, LDL, urea and creatine were significantly higher in the group with T1D. However, the control group had significantly higher serum concentrations as 1,5-AG, triglycerides, uric acid and total protein. The studied variants were in the Hardy-Weinberg equilibrium. For the control group, the frequency of minor alleles was 15.8% (95% CI 12-20) for rs3842752, 26.5% (95% CI 22-31) for rs712701 respectively, while for the rs2233575 was not observed allele lower frequency. The rs712701 polymorphism, in the *PAX4* gene was not associated with T1D. The rs3842752 polymorphism was associated with increased glucose and creatinine in T1DM group. The genotype and allelic frequencies of the rs3842752 polymorphism of the insulin gene, differed significantly between the study groups ($P < 0.05$), being associated with T1D. Carriers of the T allele of rs3842752 have a reduced risk to develop T1D in about one third OR: 0.31 (95% CI 0.17 to .55). However, carriers of the C allele have an increased risk by about 3 times to develop T1DM, OR: 3.28 (95% CI 1.83 to 5.87).

Key-words: Type 1 diabetes mellitus; Single nucleotide polymorphisms; Genetic variability.

LISTA DE FIGURAS

Figuras		Página
FIGURA 1	DEZ PAÍSES COM MAIOR NÚMERO DE CRIANÇAS (0-14 ANOS) COM DIABETES TIPO 1	22
FIGURA 2	PRINCIPAIS EVENTOS AUTOIMUNES NO DM1	25
FIGURA 3	REPRESENTAÇÃO FARMACOCINÉTICA DAS INSULINAS E SEUS ANÁLOGOS.	31
FIGURA 4	LOCI DO MHC HUMANO – IDDM1	35
FIGURA 5	ESTRUTURA DO GENE DA INSULINA HUMANA	38
FIGURA 6	REPRESENTAÇÃO DO CROMOSSOMO 11p15.5, COM OS SÍTIOS DE VARIABILIDADE GÊNICA NA REGIÃO IDDM2	39
FIGURA 7	REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO GENE DA INSULINA COM AS ENZIMAS DE DIGESTÃO	40
FIGURA 8	INTER-RELAÇÃO ENTRE AS CLASSES DA REGIÃO VNTR-INS COM O POLIMORFISMO rs3842752 QUANTO A SUSCEPTIBILIDADE AO DIABETES TIPO 1	41
FIGURA 9	MODELO DE AÇÃO DO GENE PAX4 DE ACORDO COM SUA EXPRESSÃO	43
FIGURA 10	BIOMARCADORES DE CONTROLE GLICÊMICO.	47
FIGURA 11	REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA REABSORÇÃO TUBULAR DO 1,5AG E DA GLICOSE EM CONDIÇÕES DE NORMO E HIPERGLICEMIA	48
FIGURA 12	FLUXOGRAMA DO PROJETO.	51
FIGURA 13	FRAGMENTOS DE RESTRIÇÃO E GENÓTIPOS OBTIDOS PELA DIGESTÃO COM A ENZIMA Pst I PARA CARACTERIZAÇÃO DO POLIMORFISMO rs3842752	68

FIGURA 14	PERFIL ELETROFORÉTICO DOS PRODUTOS DE RESTRIÇÃO PARA O POLIMORFISMO rs3842752 DO GENE DA INSULINA	69
FIGURA 15	ASSOCIAÇÃO DO POLIMORFISMO rs3842752 DO GENE DA INSULINA COM AS CONCENTRAÇÕES DE GLICEMIA E CREATININA PARA OS GRUPOS EM ESTUDO	72
FIGURA 16	FRAGMENTOS DE RESTRIÇÃO E GENÓTIPOS OBTIDOS PELA DIGESTÃO COM A Hae III PARA O POLIMORFISMO rs2233575	73
FIGURA 17	PERFIL ELETROFORÉTICO DOS PRODUTOS DE RESTRIÇÃO PARA O POLIMORFISMO rs2233575 DO GENE PAX4	74

LISTA DE TABELAS

Tabelas		Página
TABELA 1	CARACTERIZAÇÃO ANTROPOMÉTRICAS E CLÍNICAS DOS GRUPOS DM1 E CONTROLE SAUDÁVEIS EM ESTUDO	60
TABELA 2	PARÂMETROS BIOQUÍMICOS DOS GRUPOS DM1 E CONTROLE NA AMOSTRA ESTUDADA	64
TABELA 3	FREQUENCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS DO POLIMORFISMO rs3842752 C>T DO GENE DA INSULINA	70
TABELA 4	COMPARAÇÕES ENTRE AS FREQUENCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS DO POLIMORFISMO rs3842752 DO GENE DA INSULINA COM DADOS DA LITERATURA	71
TABELA 5	FREQUENCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS DO POLIMORFISMO rs2233575 DO GENE PAIRED BOX4 (PAX4)	75
TABELA 6	FREQUENCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS DO POLIMORFISMO rs712701 DO GENE PAIRED BOX4 (PAX4)	76
TABELA 7	COMPARAÇÕES ENTRE AS FREQUENCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS DO POLIMORFISMO rs712701 DO GENE PAIRED BOX4 (PAX4) COM DADOS DA LITERATURA	77

LISTA DE QUADROS

Quadros		Página
QUADRO 1	FREQUENCIA DOS AUTOANTICORPOS EM DIFERENTES FAIXAS ETÁRIAS DE PACIENTES COM DM1	45
QUADRO 2	RECOMENDAÇÕES DA ISPAD E ADA PARA O CONTROLE GLICÊMICO DE CRIANÇAS E ADOLESCENTES DE TODAS AS FAIXAS ETÁRIAS	46
QUADRO 3	CARACTERIZAÇÃO DOS POLIMORFISMOS EM ESTUDO	53
QUADRO 4	CONDIÇÕES PARA A REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE DA REGIÃO POLIMÓRFICA DO GENE DA INSULINA	54
QUADRO 5	CONDIÇÕES PARA A REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE DA REGIÃO POLIMÓRFICA DO GENE PAX4	55
QUADRO 6	PROTOCOLO PARA A REAÇÃO DE RESTRIÇÃO E DETECÇÃO DOS POLIMORFISMOS DOS GENES INS E PAX4	56
QUADRO 7	CONDIÇÕES OTIMIZADAS PARA A REAÇÃO DE PCR EM TEMPO REAL	57
QUADRO 8	PARÂMETROS BIOQUÍMICOS, METODOLOGIAS, E INTERVALO DE REFERÊNCIA AJUSTADO PARA CRIANÇAS E ADOLESCENTES	58

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

1,5 AG	1,5 anidroglicitol
A1C	Fração A1C da hemoglobina
AG	Albumina Glicada
Anti-IA2	Antiproteína de Membrana com Homologia às Tirosinofosfatases ou Antiantígeno 2 do Insulinoma.
DCCT	<i>Diabetes Control and Complications Trial</i> – Estudo sobre o controle de diabetes e complicações
DM	<i>Diabetes mellitus</i>
DM1	<i>Diabetes mellitus</i> tipo 1
DM2	<i>Diabetes mellitus</i> tipo 2
DMG	<i>Diabetes mellitus</i> Gestacional
FDA	<i>Food and Drug Administration</i> – Órgão Americano Governamental responsável pelo controle de alimentos e medicamentos
GAD	Dexcarboxilase do ácido glutâmico.
HbA1c	Hemoglobina Glicada fração A1C
HDL-C	HDL- colesterol - <i>High Density Lipoprotein</i> – <i>Cholesterol</i> – Lipoproteína de densidade alta
HIV	Human Immunodeficiency Virus – Vírus da imunodeficiência humana
HLA	Antígeno Leucocitário Humano
IAA	Autoanticorpo anti-insulina
ICA	Autoanticorpo Anti-ilhotas de Langerhans Citoplasmático
IDF	<i>International Diabetes Federation</i>
INS	gene da Insulina.
LDL-C	LDL-Colesterol – <i>Low Density Lipoprotein</i> – <i>Cholesterol</i> – Lipoproteína de densidade baixa
ISPAD	<i>International Society for Pediatric and Adolescent Diabetes</i>

IMC	Índice de Massa Corporal
MODY	<i>Maturity onset diabetes of the Young</i> – Diabetes da maturidade de início precoce
NGSP	<i>National Glycohemoglobin Standardization Program</i> – Programa Nacional para Padronização da Hemoglobina Glicada
OMIM	<i>Mendelian Inheritance in Man</i> – Herança Mendeliana no Homem Online
PAX4	<i>Paired Box4</i> .
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> - Reação em cadeia da polimerase
RFLP	Polimorfismo no Comprimento de Fragmentos de Restrição
Rs	<i>Reference Sequence</i> – Identificação dos Polimorfismos de único nucleotídeo
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i> – Polimorfismo de Nucleotídeo Único
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TOTG	Teste Oral de Tolerancia a Glicose
UFPR	Universidade Federal do Paraná
VNTR	<i>Variable Number of Tandem Repeats</i> – Número variável de repetições consecutivas

LISTA DE ANEXOS

Anexos		Página
ANEXO 1	PARECER DO COMITE DE ETICA	96
ANEXO 2	TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE) DE DIABETICOS A CIMA DE 12 ANOS	99
ANEXO 3	TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE) PARA ASSINATURA DOS PAIS	102
ANEXO 4	QUESTIONÁRIO UTILIZADO PARA COLETA DE DADOS DOS PACIENTES	104
ANEXO 5	EXEMPLO DE DETECÇÃO DE POLIMORFISMOS POR PCR EM TEMPO REAL (rs712701 do gene Paired Box4)	105

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
2. OBJETIVOS	19
2.1. OBJETIVO GERAL	19
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19
3. REVISÃO DE LITERATURA	20
3.1 DIABETES MELLITUS	20
3.2 EPIDEMIOLOGIA	21
3.3 <i>DIABETES MELLITUS</i> TIPO 1 (DM1) IMUNOMEDIADA (DM1A)	23
3.3.1 SUSCETIBILIDADE GENÉTICA	27
3.3.2 FATORES AMBIENTAIS	28
3.3.3 CRITÉRIOS DE DIAGNÓSTICO NO DM1	29
3.3.4 TRATAMENTO	30
3.3.5 COMPLICAÇÕES AGUDAS	32
3.3.6 COMPLICAÇÕES CRÔNICAS	33
3.3.7 DOENÇAS AUTOIMUNES ASSOCIADAS AO DM1A	33
3.4. BIOMARCADORES:	34
3.4.1. MARCADORES GENÉTICOS NA PREDIÇÃO DO DM1	34
3.4.1.1 GENE DA INSULINA HUMANA - INS	37
3.4.1.2 GENE PAIRED BOX4 (PAX4)	41
3.4.2. BIOMARCADORES SOROLÓGICOS	44
3.4.3 BIOMARCADORES DE CONTROLE GLICÊMICO	46
3.4.3.1 DOSAGEM DE GLICOSE	47
3.4.3.2 1,5 ANIDROGLUCITOL	48
3.4.3.3 FRUTOSAMINA	49
3.4.3.4 ALBUMINA GLICADA	49
3.4.3.5 HEMOGLOBINA GLICADA	50
4. METODOLOGIA	51
4.1 AMOSTRAS	52
4.2 EXTRAÇÃO DE DNA	53

4.3 GENOTIPAGEM DOS POLIMORFISMOS SELECIONADOS PARA ESTE ESTUDO	53
4.4 REAÇÃO DE PCR EM TEMPO REAL COM SONDAS FLUORESCENTES (TAQMAN).....	56
4.5 QUANTIFICAÇÃO DE PARÂMETROS BIOQUÍMICOS E DADOS ANTROPOMÉTRICOS.....	57
4.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	58
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	60
5.1 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA	60
5.1.1 Idade.....	60
5.1.2 Peso, Altura, IMC, Z-score	61
5.1.3 Cetoacidose Diabética (CAD).....	62
5.1.4 Histórico familiar de DM.....	63
5.2 ANÁLISES BIOQUÍMICAS	63
5.2.1 Biomarcadores de Controle Glicêmico (glicemia jejum, HbA1c e 1,5AG).....	64
5.2.2 Perfil Lipídico	66
5.2.3 Albumina e Proteínas Totais.....	67
5.2.4 Ureia e Creatinina.....	67
5.2.5 Ácido Úrico	67
5.3 ANÁLISES MOLECULARES	68
5.3.1 Polimorfismo rs3842752 do gene da Insulina.....	68
5.3.2 Polimorfismo rs2233575 do gene <i>PAX4</i> (<i>Paired Box4</i>)	73
5.3.3 Polimorfismo rs712701 do gene <i>PAX4</i>	75
6 CONCLUSÕES	80
REFERÊNCIAS.....	81
ANEXOS	96

1.INTRODUÇÃO

O *Diabetes mellitus* (DM) é considerado uma das doenças crônicas mais comuns em quase todos os países (SURANI *et al.*, 2015), e tem aumentado significativamente devido ao estilo de vida, como falta de atividade física e obesidade (SHAW; SICREE; ZIMMET, 2010; WHITING *et al.*, 2011). Como consequência, a condição diabética acelera a aterogênese, infarto do miocárdio e acidente vascular cerebral, bem como leva ao desenvolvimento de complicações microvasculares, sendo as três principais: retinopatia, nefropatia e neuropatia (BROWNLEE, 2001; STERN *et al.*, 2002; SAKURAI *et al.*, 2003; NAKA *et al.*, 2004; WAUTIER; SCHMIDT, 2004; YONEKURA *et al.*, 2005).

Diabetes mellitus tipo 1 (DM1) é uma doença auto-imune severa caracterizada por um desequilíbrio entre a destruição auto-imune e a insuficiente regeneração das células beta nas ilhotas de Langerhans, resultando em uma progressiva inabilidade na produção de insulina. É mediada pela combinação de fatores ambientais e genéticos (TRIPLITT *et al.*, 2000; ATKINSON; EISENBARTH, 2001; BIASON-LAUBER *et al.*, 2005; PIHOKER *et al.*, 2005).

A insulina é um hormônio importante no DM1 e variações alélicas no gene da insulina (*INS*) conferem susceptibilidade ao DM1. (PUGLIESE, 2010). Variação próxima ao *INS* é categorizada por polimorfismos em um elemento VNTR (*Variable Number of Tandem Repeats*; repetições em número variável sequenciais), que dependendo do genótipo, classe I ou III, está associado à susceptibilidade ou proteção respectivamente (BENNETT *et al.*, 1995).

Fatores transcrpcionais fornecem informações genéticas para diferenciação e desenvolvimento das células beta pancreáticas (SERVITJA; FERRER, 2004). Algumas mutações em genes que codificam fatores transcrpcionais têm sido reportadas em outras formas de diabetes (FAJANS; BELL; POLONSKY, 2001). O gene *PAX4* (*Paired Box4*) é essencial para diferenciação e funcionamento das células beta. Inativação de *PAX4* em camundongos mostrou ausência de produção de insulina madura e severa síndrome diabética após nascimento (NAPOLITANO *et al.*, 2015).

O aumento crescente da prevalência do DM, os enormes custos associados à doença e suas complicações, e evidências convincentes de que prevenção é possível, contribuem para intensos esforços na pesquisa atualmente focados nesta

doença. A medida que o conhecimento sobre a patogênese do DM aumenta, incluindo o papel de vários componentes genéticos, este conhecimento será incorporado no cuidado clínico e traduzido em informações significativas para os pacientes (NEWELL, 2004).

Diante disso, o presente estudo busca avaliar a variabilidade de genes diabetogênicos, bem como sua relação com outros biomarcadores, com a finalidade de ampliar o conhecimento dos processos fisiopatológicos associados ao *Diabetes mellitus* tipo 1.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Estudar variações genéticas nos genes da Insulina e PAX4 associadas ao *Diabetes mellitus* tipo 1 e correlacionar com biomarcadores de controle glicêmico, perfil lipídico e função renal.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Selecionar pacientes com *Diabetes mellitus* tipo 1 e controles saudáveis;
- Genotipar polimorfismos nos genes da insulina (rs3842752) e PAX4 (rs 712701 e rs 2233575) em pacientes com DM1 e indivíduos saudáveis (controles);
- Identificar as frequências genotípicas e alélicas dos polimorfismos associados ao diabetes tipo 1 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.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 DIABETES MELLITUS

O *Diabetes mellitus* (DM) é caracterizado como um grupo de doenças metabólicas que tem por principal característica a hiperglicemia resultante de defeitos na secreção de insulina, na sua ação ou em ambos (ERGUN-LONGMIRE; MACLAREN, 2000; SBD, 2016).

De acordo com a Associação Americana de Diabetes (ADA), a classificação do *Diabetes mellitus* (DM) é baseada na etiologia da doença e dividida em quatro categorias (ADA, 2016):

- *Diabetes mellitus* tipo 1 (DM1): resultante da destruição das células beta pancreáticas que leva a uma deficiência absoluta de insulina;
- *Diabetes mellitus* tipo 2 (DM2): resultante de um defeito na secreção de insulina e da resistência à insulina;
- *Diabetes mellitus* Gestacional (DMG): diagnosticado no segundo ou terceiro trimestre de gestação não sendo diabetes evidente; e
- Tipos específicos de diabetes devido a outras causas: defeitos genéticos na função das células beta, MODY, (*maturity onset diabetes of the Young*), doenças do pâncreas, tais como fibrose cística, indução química ou por drogas, tais como tratamento para HIV ou após transplante de órgãos.

Existem também duas categorias referidas como pré-diabetes, são elas:

- glicemia de jejum alterada e,
- tolerância à glicose diminuída.

O pré-diabetes caracteriza um conjunto de fatores de risco para o desenvolvimento de DM e doenças cardiovasculares (SBD, 2016).

A insulina é um hormônio pancreático secretado pelas células beta das ilhotas de Langerhans. A síntese deste hormônio inicia com o polipeptídeo pré-pró-insulina que é processado à pró-insulina, e na sequência em insulina madura a partir da clivagem do peptídeo C (PUGLIESE; MICELI, 2002).

A falta, ou ineficácia desse hormônio, resulta em hiperglicemia, que ao longo do tempo promove danos que levam a complicações e riscos associados ao diabetes (IDF, 2015). As complicações frequentes associadas à hiperglicemia crônica são a perda de função e falência de alguns órgãos, especialmente de olhos, rins, nervos, coração e vasos sanguíneos (RAGHAV; AHMAD, 2014; ADA, 2016).

A frequência crescente do diabetes está relacionada ao aumento da mortalidade por cetoacidose diabética, gangrena e nefropatia, ou, indiretamente, através de sua associação com outras condições como as doenças cardiovasculares (ADAIR; RAO, 2010).

As complicações associadas ao DM representam um impacto significativo nos custos relacionados à saúde. Em 2014 as estimativas dos custos mundiais relacionados ao DM mundialmente foram de 612 bilhões de dólares, correspondendo a mais que 10% dos custos totais relacionados à saúde (IDF, 2015). A maioria dos países gastam entre 5%-20% de suas despesas totais relacionadas à saúde com o diabetes. Em muitos países ainda não existe a consciência do impacto econômico e social que o DM causa, e isso constitui uma importante barreira para efetivas estratégias de prevenção e melhoria no diagnóstico e tratamento da doença (IDF, 2015).

3.2 EPIDEMIOLOGIA

O *Diabetes mellitus* (DM) é considerado a epidemia do século (KHARROUBI; DARWISH, 2015), sendo uma das principais causas de morbidade e mortalidade no mundo (GUARIGUATA, 2012; YISAHAK *et al.*, 2014). É uma patologia que vem crescendo rapidamente (WILD *et al.*, 2004), e é provável que continue a crescer nas próximas décadas (GUARIGUATA *et al.*, 2014).

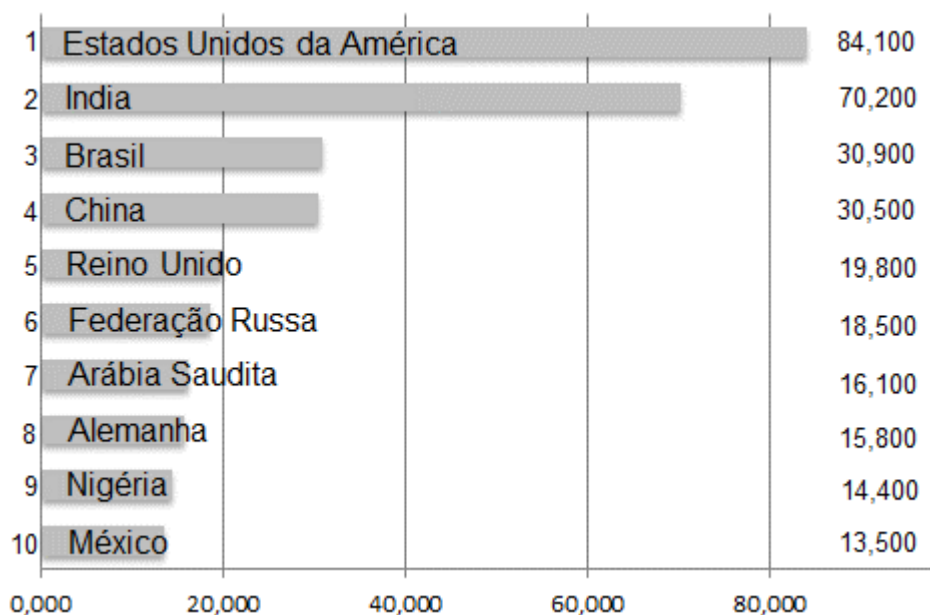
As estimativas globais de prevalência de diabetes vêm demonstrando aumento ao longo dos últimos 15 anos; no entanto, as últimas estimativas superaram projeções feitas anteriormente (GUARIGUATA *et al.*, 2014). King e colaboradores (1998) projetaram que o número de adultos com diabetes chegaria a 300 milhões em 2025, no entanto, o número de diabéticos em 2013 foi de 382 milhões (GUARIGUATA *et al.*, 2014) e em 2015 foi de 415 milhões, com uma estimativa de projeção de 642 milhões em 2040 (IDF, 2015). No Brasil, os dados

nacionais não são precisos, e diabetes deve afetar entre 6-12% da população, representando quase 25 milhões de pessoas (DAHER, 2015).

Em 2015 mais de meio milhão de crianças foram diagnosticadas com diabetes tipo 1 (DM1) no mundo. Apesar de ser menos comum que o diabetes tipo 2 (DM2), o DM1 tem aumentado cerca de 3% a cada ano, ocorrendo principalmente em crianças (IDF, 2015).

A Europa possui o maior número de crianças com DM1, sendo de aproximadamente 140.000 casos, com um aumento em torno de 21.600 novos casos por ano. Já o número de crianças com DM1 no mundo é de 542.000 (IDF, 2015). Deve ser ressaltado que nesta classificação o Brasil ocupa o terceiro lugar com cerca de 31.000 casos de DM1 (Figura 1).

FIGURA 1 - DEZ PAÍSES COM MAIOR NÚMERO DE CRIANÇAS (0-14 ANOS) COM DIABETES TIPO 1



A prevalência de crianças (0-14 anos) com DM1 nos diferentes países, apresenta-se alta, com destaque para o Brasil, que se encontra em terceiro lugar no *ranking* dos dez países com maior número de crianças com DM1.

FONTE: Adaptado de (IDF, 2015).

As estimativas, atual e futura, do número de diabéticos são importantes para programar recursos e conduzir programas de promoção de saúde, bem como incentivo ao conhecimento e prevenção da patologia (GUARIGUATA *et al.*, 2014; YISAHAK *et al.*, 2014).

3.3 DIABETES MELLITUS TIPO 1 (DM1) IMUNOMEDIADA (DM1A)

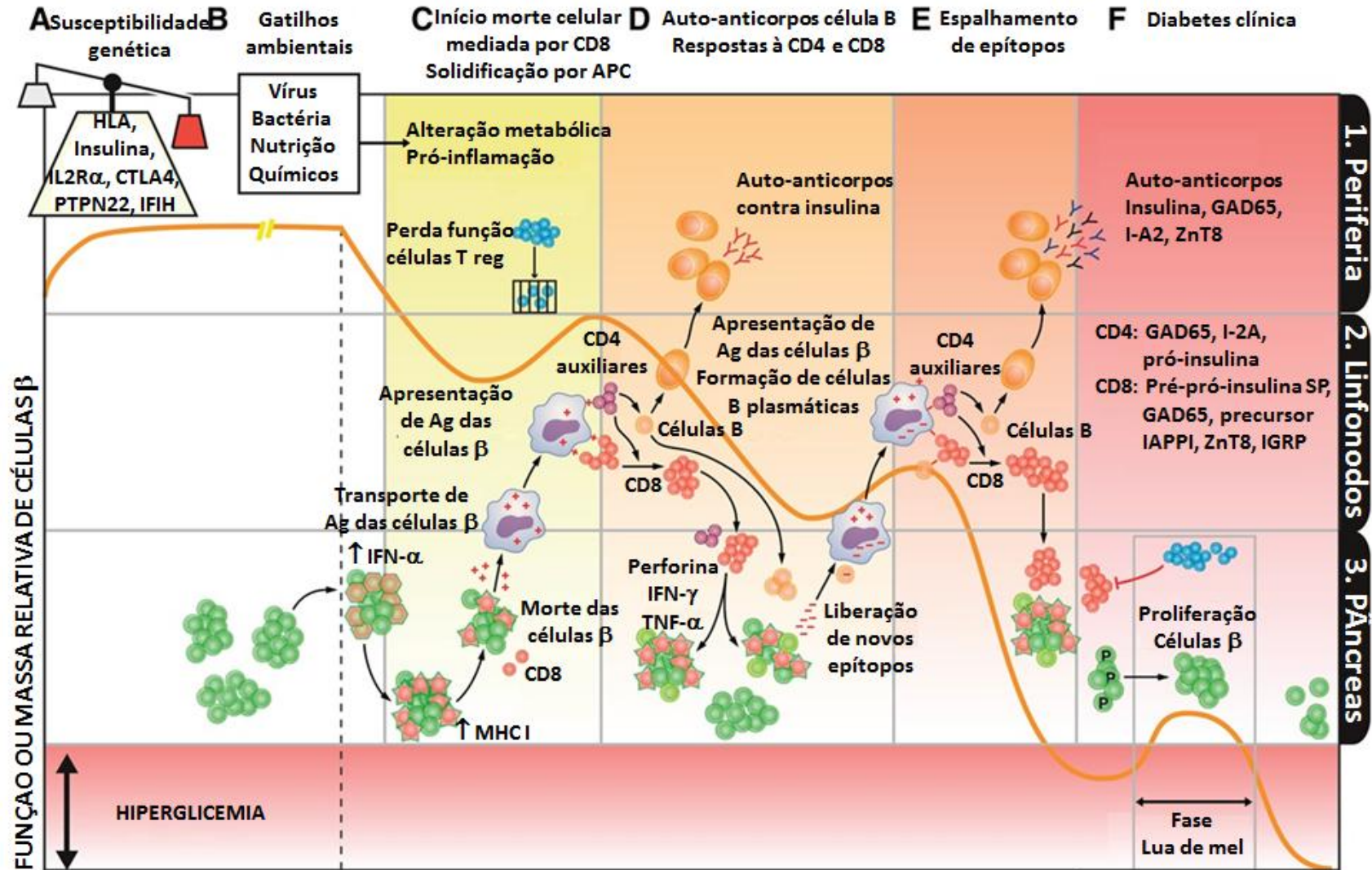
O *Diabetes mellitus* tipo 1 (DM1) é uma doença metabólica crônica onde ocorre destruição parcial ou total das células beta pancreáticas presente nas ilhotas de Langerhans, o que acarreta na incapacidade de produção do hormônio insulina (KERNER; BRUCKEL, 2014; SBD, 2016). O DM1 ocorre primariamente na infância, no entanto pode ser diagnosticado em qualquer faixa etária (FOWLER, 2007). Designado anteriormente como diabetes juvenil ou diabetes insulino-dependente, essa forma corresponde de 5-10% do número de casos de diabetes no mundo (ADA, 2016). O tratamento é baseado na administração de insulina exógena diariamente, a fim de controlar a glicemia (IDF, 2015).

DM1 é subdividido em tipo 1A e 1B. O diabetes imunomediado (DM1A) consiste na forma de DM1 predominante, e resulta da destruição imunomediada das células beta pancreáticas. Este tipo de diabetes apresenta, como característica, a presença de marcadores auto-ímunes de destruição das células beta. Estes marcadores (auto-anticorpos), são úteis para o diagnóstico e confirmação deste tipo de diabetes (WINTER; SCHATZ, 2011). Apesar do DM1 ser usualmente caracterizado como uma patologia autoimune algumas formas não possuem etiologias conhecidas. São as chamadas formas idiopáticas, diabetes idiopático (DM1B), onde os pacientes apresentam insulinopenia permanente com propensão a cetoacidose, e que, no entanto, não tem nenhuma evidência de ser auto-imune (não apresentam auto-anticorpos circulantes contra estruturas das células beta). Normalmente se enquadram nessa categoria os ascendentes de Africanos ou Asiáticos que herdaram a patologia (ADA, 2016).

O diabetes imunomediado (DM1A) primariamente ocorre em hospedeiros com susceptibilidade genética expostos a um número de potenciais gatilhos ambientais (Figura 2). O resultado é a ativação de células do sistema imune que promovem a destruição das células beta pancreáticas (BROOKS-WORRELL; PALMER, 2011; ADA, 2016). O quadro histopatológico do DM1 entre 60-90% dos casos é caracterizado por insulite, ou seja, um infiltrado inflamatório de linfócitos, macrófagos e células dendríticas, com predominância de linfócitos T, que se deve a um desequilíbrio nos mecanismos de tolerância aos antígenos próprios. Uma vez ocorrido a insulite, as células beta são reduzidas e funcionalmente suprimidas, com depleção do conteúdo de insulina (SILVA; MORY; DAVINI, 2008). O processo de

destruição das células beta começa quando os macrófagos e células dendríticas apresentam antígenos das células beta às células T CD4+ através do complexo de histocompatibilidade principal (MHC). Através de uma série de interleucinas sinalizadoras, células T CD4+ são ativadas, que por sua vez ativam as células T CD8+ diretamente responsáveis por causar a morte das células beta (YOON; JUN, 2005). A morte das células beta resulta na liberação de antígenos intracelulares adicionais e permite que células apresentadoras de antígenos posteriormente acessassem auto-antígenos tipicamente sequestrados. A amostragem contínua destes auto-antígenos conduz à ativação das células T autoreativas adicionais através da amplificação da resposta auto-imune inicial (propagação de epítomos) (VAN BELLE; COPPIETERS; VON HERRATH, 2011; GAN; ALBANESE-O'NEILL; HALLER, 2012). A positividade de auto-anticorpos é o primeiro sinal detectável de uma resposta autoimune em curso (VAN BELLE; COPPIETERS; VON HERRATH, 2011), embora não se acredite que os auto-anticorpos sejam o fator causador da doença (GAN; ALBANESE-O'NEILL; HALLER, 2012). Resumidamente, para o desenvolvimento da resposta imune do DM1 existem três pré-requisitos: 1º) Ativação de células T; 2º) Infiltrado inflamatório; e 3º) falha na regulação da resposta imune (WALLBERG; COOKE, 2013).

FIGURA 2 - PRINCIPAIS EVENTOS AUTOIMUNES NO DM1



Essa figura representa a massa de células beta (linha laranja), bem como as diferentes fases imunológicas (colunas), que ocorrem em locais anatómicos relevantes (escrito a direita). Conforme a linha laranja decai, há perda da função da célula beta-pancreática e o indivíduo é clinicamente diagnosticado com DM1. Inicialmente o indivíduo apresenta suscetibilidade genética e um gatilho ambiental. No pâncreas é liberado interferon alfa (IFN) e subsequentemente MHC de classe I, que expõe as células beta ao ataque de células T auto reativas CD8+ com especificidade para antígenos do pâncreas. Consequentemente, os antígenos de células beta liberados são captados por células apresentadora de antígenos (APCs) e transferido para drenagem linfática nos linfonodos. O gatilho ambiental causou um ambiente pró-inflamatório que favoreceu a resposta de células T efectoras levando a perda de função de células T regulatórias (Treg). Os antígenos de células beta apresentados nesse contexto pró-inflamatório, e com o auxílio de CD4+ inicia a conversão de células B em células plasmáticas e o aparecimento de autoanticorpos da insulina. Além disso, as células T CD8+ autoreativas são estimuladas a proliferar e migrar no pâncreas. O estresse induzido por essa segunda onda de morte de células beta envolvendo perforinas, INF, e fator de necrose tumoral (TNF), faz com que algumas células beta interrompam a produção de insulina. A morte também provoca a liberação de novos antígenos de células beta, que são apanhados pelas APCs, e transportados para os linfonodos pancreáticos juntamente com células B. Isso leva ao surgimento de novas especialidades de células T e B. Uma nova onda de morte de células beta, é, portanto, mais severa, que geralmente resulta em depleção de massa e função de células beta. A remissão temporária do diabetes após ser diagnosticado clinicamente é conhecida como fase de “lua de mel” onde com o início da administração de insulina exógena, surpreendentemente o processo inflamatório estimula as células Treg a fazer a regulação da resposta imune, ocorre então, uma proliferação de células beta, que leva a uma pausa do desenvolvimento do DM1. Essa pausa é temporária e relativa a cada indivíduo. Normalmente o DM1 é diagnosticado quando restam apenas de 10 a 30% de células beta funcionais.

Fonte: Adaptado de: (VAN BELLE; COPPIETERS; VON HERRATH, 2011).

A destruição das células beta pancreáticas é um processo que pode levar meses ou anos, e a sintomatologia e diagnóstico estão associadas à destruição de pelo menos 80% da massa das ilhotas de Langerhans, produtoras de insulina (SBD, 2016). Quando ocorre a manifestação da doença, com presença de hiperglicemia e cetose, as células secretoras de insulina já se apresentam em número bem diminuído ou praticamente ausentes (VAN BELLE; COPPIETERS; VON HERRATH, 2011).

A evolução do DM1 ocorre em quatro fases: 1) Fase pré-clínica: autoimunidade contra células beta pancreática, com consequente diminuição aguda e progressiva da resposta insulínica à glicose; 2) Início do DM clínico; 3) Remissão Transitória (“lua-de-mel”); 4) DM associado a complicações agudas, crônicas, e óbito (VAN BELLE; COPPIETERS; VON HERRATH, 2011). Apesar dessa sequência de eventos fornecer uma explicação unificadora no processo do DM1, alguns autores argumentam que a progressão da doença não é linear, mas apresenta variabilidade individual (CHATENOUD; BLUESTONE, 2007).

Como a patogênese do DM1A é multifatorial, existem alguns aspectos que ainda permanecem desconhecidos. Estudos adicionais são necessários para maior esclarecimento dos mecanismos patogênicos, e desenvolvimento de novas estratégias diagnósticas e de tratamento (HEROLD *et al.*, 2013).

3.3.1 Suscetibilidade genética

A susceptibilidade ao DM1 é um traço herdado. Contudo, em mais de 85% dos casos ocorrem na ausência de um parente de primeiro grau afetado. Diabetes com início antes dos 5 anos de idade é um marcador de alto risco familiar e sugere um papel maior para os fatores genéticos. O irmão gêmeo de uma criança que apresentou DM1 antes dos 5 anos de idade possui um risco cumulativo de 3-5 vezes maior de DM na idade de 20 anos quando comparado ao irmão gêmeo de uma criança que apresentou DM1 entre os 5-15 anos de idade (GILLESPIE; GALE; BINGLEY, 2002). Indivíduos com um parente de primeiro grau afetado possuem um risco de 1 em 20 (5%) de desenvolverem DM1 ao longo da vida, comparados à população em geral que apresentam um risco de 1 em 300 (0,3%) (REDONDO; FAIN; EISENBARTH, 2001). Crianças de um pai afetado possuem o risco de 1 em 14 (7%), enquanto que de mãe afetada apenas de 1 em 50 (2%), o que

presumivelmente constitui uma evidência de fatores ambientais e potencialmente epigenéticos estejam envolvidos (HAMALAINEN; KNIP, 2002). Gêmeos monozigóticos e heterozigóticos possuem uma taxa de concordância entre 30-50% e 6-10%, respectivamente (HALLER; ATKINSON; SCHATZ, 2005).

A hereditariedade da susceptibilidade e proteção ao DM1 são multifatoriais e poligênicas (SINGAL; BLAJCHMAN, 1973; BONIFACIO; ZIEGLER, 2010).

3.3.2 Fatores Ambientais

Acredita-se que fatores ambientais desempenham um papel significativo no desencadeamento do DM1. A discordância entre taxas de desenvolvimento de DM1 entre gêmeos idênticos constitui uma das melhores observações que suporta a existência de gatilhos ambientais no DM1 (AKERBLOM; KNIP, 1998).

Vários agentes etiológicos têm sido apontados como fatores desencadeantes para resposta autoimune (MACLAREN; ATKINSON, 1992). Entre eles estão dieta (introdução tardia e abrupta de cereais), exposição a proteínas do leite de vaca (albumina de soro bovino e betalactoglobulina), deficiência na suplementação de vitamina D, infecções virais (por exemplo: Coxsackie A ou B, enterovírus, rubéola, citomegalovírus, ECHO, Epstein-Barr, caxumba, retrovírus), drogas, toxinas (pesticidas, compostos N-nitrosos, agentes de tipo aloxano ou agentes semelhantes a estreptozotocina que induzem danos oxidantes às células beta), hábitos de higiene e estresse (AKERBLOM *et al.*, 2002; KNIP; VIRTANEN; AKERBLOM, 2010; GAN; ALBANESE-O'NEILL; HALLER, 2012). No entanto, não foi encontrado nenhum gatilho ambiental específico que cause claramente ou definitivamente DM1 (KANTAROVA; BUC, 2007; ATKINSON; EISENBARTH; MICHELS, 2014).

Não surpreendentemente, as interações gene-ambiente são altamente variáveis de pessoa para pessoa. Fatores genéticos podem predominantemente constituir risco para pessoas jovens, enquanto que exposição ambiental pode ser mais importante com o aumento da idade. Um estudo prospectivo multicêntrico internacional envolvendo a Finlândia, Alemanha, Suécia e Estados Unidos, TEDDY (*The Environmental Determinants of Diabetes in the Young*) foi iniciado em 2003 com o objetivo de identificar gatilhos ambientais do DM1 em indivíduos geneticamente susceptíveis (GAN; ALBANESE-O'NEILL; HALLER, 2012).

3.3.3 Critérios de diagnóstico no DM1

Os sintomas clássicos de poliúria, polidipsia, e polifagia associados à hiperglicemia aparecem como marcas de diagnóstico de DM1 em crianças e adolescentes, e em menor proporção em adultos. A cetoacidose é normalmente a manifestação inicial que antecede o diagnóstico do DM1 (ATKINSON; EISENBARTH; MICHELS, 2014).

Para o diagnóstico de DM1, a manifestação clínica associada a sintomas, com uma glicemia ao acaso > 200 mg/dL pode diagnosticar o paciente.

Atualmente são aceitos os seguintes critérios para o diagnóstico do *Diabetes mellitus* (CRAIG *et al.*, 2014; KERNER; BRUCKEL, 2014; ADA, 2016; SBD, 2016):

- Sintomas clássicos de hiperglicemia acrescidos de glicemia casual ≥ 200 mg/dL. Entende-se por glicemia casual aquela realizada a qualquer hora do dia, independentemente do horário das refeições;
- Glicemia de Jejum ≥ 126 mg/dL. Em caso de pequenas elevações da glicemia, o diagnóstico deve ser confirmado pela repetição do teste no outro dia;
- Glicemia de 2 horas pós-sobrecarga de 75 g de glicose ≥ 200 mg/dL. O teste de tolerância a glicose deve ser realizado com os cuidados preconizados pela Organização Mundial de Saúde, com coleta para diferenciação de glicemia em jejum e 120 minutos após a ingestão de glicose;
- Hemoglobina Glicada $\geq 6,5\%$. O teste deve ser realizado em laboratório utilizando método certificado pela NGSP normalizado ou rastreável para o DCCT. A utilidade da HbA1c isolada no diagnóstico do DM1 em crianças é controversa.

Na ausência de hiperglicemia evidente, os resultados devem ser confirmados pela repetição do teste em outro dia. Quando a glicose plasmática casual (ou randômica) se encontrar elevada (≥ 200 mg/dL) em indivíduos assintomáticos o ensaio deve ser confirmado com um teste alternativo. No caso de hiperglicemia sintomática, o diagnóstico pode ser feito e um teste confirmatório não é requerido antes de iniciar o tratamento. Indivíduos em que o DM1 seja possível (jovem ou magro ou com hiperglicemia assintomática, especialmente com cetonúria ou cetonemia) os testes confirmatórios não devem atrasar o início do tratamento

evitando a rápida deterioração. Se resultados de dois testes estão disponíveis e ambos estão acima do valor de corte, o diagnóstico do diabetes é confirmado (CRAIG *et al.*, 2014).

Auto-anticorpos específicos para as ilhotas estão frequentemente presente meses a anos antes do início clínico do DM1 e persiste com duração variável após o início, tornando-se ferramentas úteis por fornecerem evidencia sorológica de ataque auto-imune em progresso e sua progressão está associada com a magnitude da resposta imune e com a idade de aparecimento dos auto-anticorpos no indivíduo. Os auto-anticorpos específicos para as ilhotas podem aparecer bem cedo durante a vida, como no caso de crianças (ACHENBACH *et al.*, 2005), e são preditores de desenvolvimento posterior de DM1, com 90-95% de positividade para pelo menos um anticorpo em pacientes recém diagnosticados (ZIEGLER *et al.*, 1999; BARKER *et al.*, 2004; HUMMEL *et al.*, 2004; JAHROMI; EISENBARTH, 2007). Auto-anticorpos associados ao DM1 incluem: auto-anticorpos citoplasmáticos anti-ilhotas (*islet cell autoantibodies* – ICA), auto-anticorpos antidescarboxilase do ácido glutâmico (*glutamic acid decarboxylase autoantibodies* - GADA), auto-anticorpos antiproteína de membrana com homologia às tirosinofosfatases ou anti-antígeno 2 do insulinoma (*insulinoma associated 2 autoantibodies* - IA-2A), auto-anticorpos anti-insulina (*insulin autoantibodies* - IAA), e auto-anticorpos antitransportador de zinco 8 (*zinc transporter autoantibodies* - ZnT8). O número de anticorpos presentes no soro do paciente fornece uma útil informação sobre o risco para DM1, e a presença de múltiplos anticorpos é muito mais preditiva do que a presença de um único anticorpo ou combinação específica de anticorpos (ORBAN *et al.*, 2009).

3.3.4 Tratamento

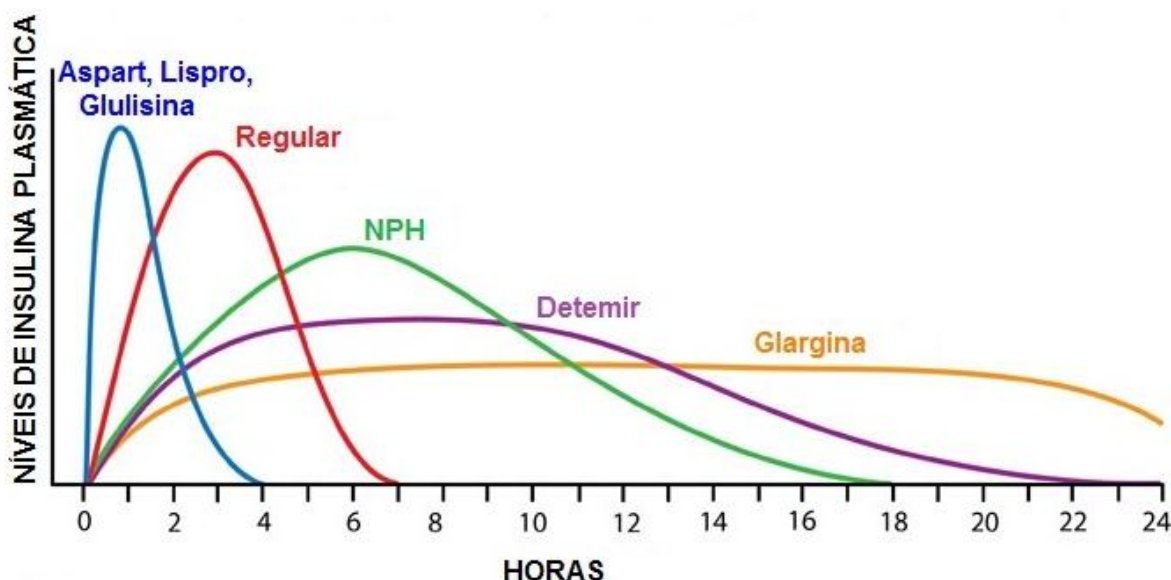
O tratamento do DM1A é realizado com utilização de insulina exógena, devido a destruição de células beta, e é imprescindível que seja instituído assim que a doença for diagnosticada (SBD, 2016).

A descoberta da insulina é considerada um marco histórico no tratamento do DM (PIRES; CHACRA, 2008), e tem como principal objetivo manter as concentrações próximas de normoglicemia, para evitar complicações agudas e crônicas (MALIK; TAPLIN, 2014).

As primeiras insulinas disponibilizadas foram a Regular e a NPH (*Neutral Protamine Hagedorn*) (PIRES; CHACRA, 2008). Com o advento da biologia molecular, surgiram os análogos de insulina com ação ultrarrápida (lispro, asparte, e glulisina), e posteriormente os análogos de ação lenta, que contribuíram para o melhoramento do controle glicêmico, por possuírem perfis próximo ao fisiológico (SBD, 2016).

A figura 3 apresenta os diferentes tipos de insulina, e seus análogos, bem como o tempo de ação, e a concentração plasmática de cada uma.

FIGURA 3 - REPRESENTAÇÃO FARMACOCINÉTICA DAS INSULINAS E SEUS ANÁLOGOS.



A figura apresenta os tipos de insulina e seus análogos, bem como o início e tempo aproximado de ação. Na linha azul é possível observar que a Aspart, Lispro, e Glulisina tem início de ação em minutos após a administração, possui pico de 1-2 horas, e seu tempo de ação é em torno de 4 horas. A Regular (linha vermelha) apresenta início de ação também em minutos, no entanto um pouco mais lenta do que as anteriores, possui pico de 2-4 horas, e a duração de sua ação ocorre em torno de 7 horas. A NPH (linha verde) tem início de ação em mais ou menos 1 hora, possui pico em torno de 6 horas, e a duração da ação é de mais ou menos 18 horas. A Detemir (linha roxa), e Glargina (linha alaranjada) tem início de ação em torno de 1-2 horas, possuem pico pouco pronunciado, e ação em torno de 24 horas.

FONTE: Adaptado de Pires e Chacra (2008).

Independentemente do tipo de insulina utilizada, as doses são adaptadas em função da necessidade diária do indivíduo (MALIK; TAPLIN, 2014). Em crianças tem sido utilizado o regime de múltiplas injeções diárias, com o objetivo de melhorar o controle metabólico. É difícil atingir um controle glicêmico ótimo em crianças, devido ao maior risco de hipoglicemia derivado dos hábitos alimentares e tipos de atividades físicas (SCHMID, 2007).

As terapias atuais de insulina ainda não correspondem ao perfil de insulina endógena de células beta pancreáticas, podendo levar a um estado de hipoglicemia e cetoacidose em crianças e adolescentes com DM1A (MALIK; TAPLIN, 2014). A segurança e o sucesso do tratamento dependem de um bom monitoramento glicêmico (SBD, 2016).

3.3.5 Complicações Agudas

A cetoacidose diabética e a hipoglicemia grave são as principais complicações agudas, e apesar de poderem ser evitadas com um bom controle glicêmico, constituem o principal risco de vida em crianças com DM1A (REWERS, A. *et al.*, 2002; FORBES; COOPER, 2013).

A cetoacidose é a consequência de uma deficiência de insulina circulante, combinada com aumento das concentrações de hormônios contra-regulatórios (glucagon, cortisol, catecolaminas, e hormônio do crescimento). Essa combinação leva ao aumento da produção de glicose pelo fígado, bem como a utilização de gorduras para a produção de energia, causando assim um estado de hiperglicemia, cetonemia, cetonúria, diurese osmótica, desidratação, e perda de eletrólitos. Os sinais e sintomas apresentam-se como náuseas, vômitos, dor abdominal e letargia. Caso não tratado a tempo com insulina exógena, e terapia de fluidos e eletrólitos, esta complicação pode ser fatal (MACIAS GOMEZ; MARTINEZ Y MARTNEZ, 1977; COOKE; PLOTNICK, 2008; RAGHUPATHY, 2015; AHMED; KAZI; KHAN, 2016).

A cetoacidose é considerada uma das principais causas de mortalidade entre crianças com DM1A, e também está associada a elevada morbidade neurológica a longo prazo (COOKE; PLOTNICK, 2008). Complicações intracerebrais em diabéticos com cetoacidose incluem o edema cerebral, o acidente vascular isquêmico ou hemorrágico, e outros eventos intracranianos (ROSENBLOOM, 1990; BARROT; HUISMAN; PORETTI, 2016), sendo o edema cerebral uma das complicações mais graves e frequentes (MACIAS GOMEZ; MARTINEZ Y MARTNEZ, 1977; EDGE *et al.*, 2001; ROBERTS; SLOVER; CHASE, 2001).

Foi descrito que em apenas 50% dos casos o tratamento da cetoacidose é bem sucedido, sendo mais eficaz nos diabéticos com diagnóstico precoce e início de intervenção rápida. A prevenção da cetoacidose diabética é o requisito mais importante para evitar complicações intracerebrais no DM1 (ROSENBLOOM, 1990).

A hipoglicemia, por sua vez, é comum em portadores de DM1A durante o tratamento com insulina. A sintomatologia mimetiza alterações no sistema nervoso central, com confusão mental, convulsões, e perda de consciência. A recuperação neurológica completa é frequente após a correção da hipoglicemia no DM1, entretanto, quando esses episódios são repetitivos, principalmente em crianças, podem acarretar distúrbios cognitivos permanentes (AGARDH; ROSEN; RYDING, 1983; NERY, 2008).

3.3.6 Complicações Crônicas

A hiperglicemia crônica é responsável pelo desenvolvimento de complicações microvasculares (retinopatia, nefropatia e neuropatia) e macrovasculares (doença isquêmica do coração, doença cerebrovascular, e doença vascular periférica) (FLORYS *et al.*, 2004; RUBIO CABEZAS; ARGENTE OLIVER, 2007).

Essas complicações acometem indivíduos com DM1A que apresentam a doença na faixa etária em torno de 15 a 20 anos de idade, sendo incomum antes dos 5 anos de idade. O controle glicêmico e o monitoramento adequado são essenciais para a prevenção das complicações crônicas ou para retardar suas manifestações (SBD, 2016).

Para a triagem da nefropatia se recomenda a quantificação da microalbuminúria e *clearance* (depuração) da creatinina após 5 anos do diagnóstico do DM1, ou conforme controle glicêmico e a idade do indivíduo. Para o diagnóstico da retinopatia, apesar de ser raro antes da puberdade, é recomendado exame oftalmológico completo aos 10 anos de idade, ou após 3 a 5 anos do diagnóstico. A neuropatia também deve ser avaliada após os 10 anos de idade ou 5 anos de evolução da patologia, com a realização de exame detalhado dos pés, incluindo palpação de pulsos, teste de reflexos, detecção de áreas de pressão e calosidade, e exame de sensibilidade com microfilamento (SBD, 2016).

3.3.7 Doenças autoimunes associadas ao DM1A

O DM1A é frequentemente associado a outras doenças autoimunes, sendo as mais frequentes a doença autoimune tireoidiana e a doença celíaca. Apesar de menos frequente, a deficiência de vitamina B12 por gastrite autoimune, doença de

Addison, hepatite autoimune, dermatomiosite e miastenia gravis também estão associadas ao DM1 (BARKER, 2006; SBD, 2016).

As doenças autoimunes tireoidianas apresentam uma frequência de associação ao DM1A de 17-30%. A positividade de anticorpos tireoidianos sugere a disfunção da tireoide, sendo o hipotireoidismo o achado mais frequente. É recomendado para triagem a dosagem de anticorpos antiperoxidase e antitireoglobulina, seguida da dosagem de hormônio tireoestimulante (TSH) a cada 1 a 2 anos após o diagnóstico (MANTOVANI; MANTOVANI; DIAS, 2007; SBD, 2016).

A doença celíaca pode afetar 1-6% dos indivíduos que apresentam DM1A. A dificuldade no crescimento, flatulência, hipoglicemia, constipação intestinal e dor abdominal são sintomas associados à doença celíaca. A introdução de uma dieta isenta de glúten melhora o controle glicêmico e garante a normalização dos sintomas na maioria dos casos (BARKER, 2006; SBD, 2016).

3.4. BIOMARCADORES:

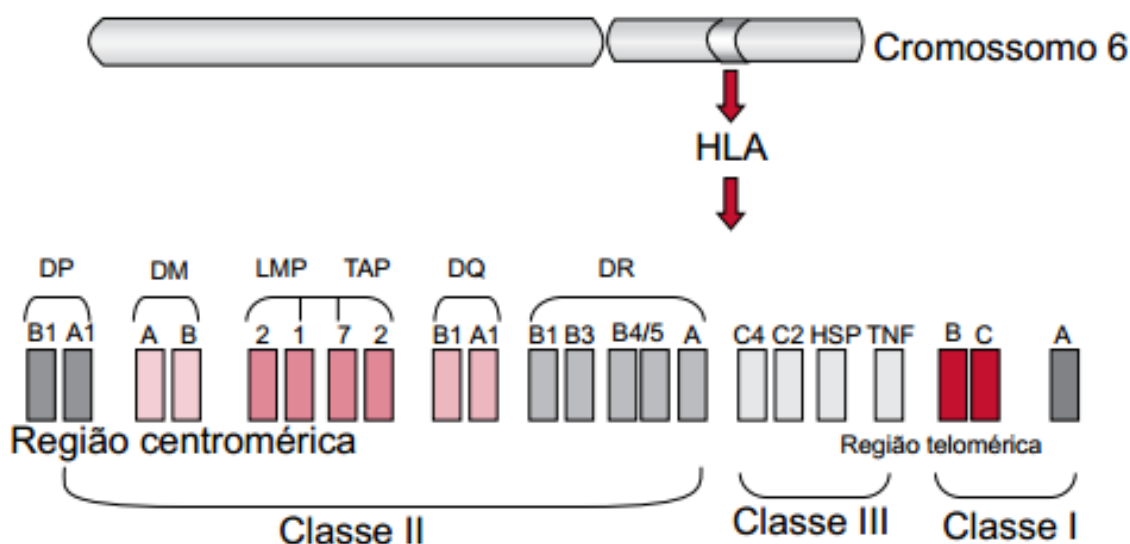
3.4.1. Marcadores genéticos na predição do DM1

Os genes do antígeno leucocitário humano (*Human leukocyte antigen- HLA*) e os genes não HLA desempenham papéis na gênese do DM1. Genes de diversos *loci* vêm sendo estudados com relação à sua participação na predisposição ou proteção à doença, e já foram identificados cerca de 40 *loci* que parecem afetar a suscetibilidade ao DM1A (ALIZADEH; KOELEMAN, 2008; CONCANNON; RICH; NEPOM, 2009). A maioria destes genes associados ao DM1 está relacionada com o sistema imune e pode predispor o indivíduo à uma resposta imune ou inflamatória exacerbada à um dado estímulo, aumentando potencialmente o risco de autoimunidade. Outros, podem afetar a função da célula β -pancreática e apresentação de antígeno (PIROT; CARDOZO; EIZIRIK, 2008; ATKINSON; EISENBARTH; MICHELS, 2014).

O HLA corresponde aos principais genes do complexo principal de histocompatibilidade (*major histocompatibility complex – MHC*) em seres humanos e está localizado no braço curto do cromossomo 6 (locus IDDM1 – *locus insulin-dependent diabetes mellitus 1*) (Figura 4). Os genes HLA são responsáveis pelas respostas imunes celulares e desempenham um papel chave na autoimunidade

(HORTON *et al.*, 2004). O HLA apresenta aproximadamente metade da susceptibilidade genética que leva ao risco de DM1 (NOBLE *et al.*, 2010).

FIGURA 4 - LOC/DO MHC HUMANO – IDDM1



Estrutura gênica do MHC humano identificando os genes HLA de classe I (HLA-A, B e C), de classe II (HLA-DR, DQ, e DP), e os de classe III. Os genes TAP, LMP, e HLA-DM codificam proteínas não expressas nas superfícies celulares.

Fonte: Silva, Mory e Davin (2008).

As moléculas HLA de classe I são compostas por duas cadeias polipeptídicas (cadeias alfa e β 2-microglobulina), ligadas não covalentemente, e codificadas pelos genes A, B, e C. Encontram-se expressas na superfície de células nucleadas, e estão relacionadas com o processamento e apresentação de antígenos intracelulares aos receptores de células T (THORSBY; UNDLIEN, 1996; KELLY *et al.*, 2003). As moléculas de classe II são compostas por duas cadeias polipeptídicas alfa e beta, que se mantêm associadas por ligações não covalentes. Essas moléculas são normalmente expressas por células apresentadoras de antígenos, células B e T ativadas. O HLA-DR, HLA-DQ, e HLA-DP estão envolvidos na ativação de células T auxiliares que levam ao desenvolvimento da resposta imune (THORSBY; UNDLIEN, 1996; KELLY *et al.*, 2003). A região de classe III codifica diversas moléculas com variadas funções, entre elas estão os componentes do sistema complemento, fator de necrose tumoral e a proteína de choque térmico (KELLY *et al.*, 2003).

As moléculas de HLA de classe I e II desempenham função relevante na ativação de respostas de células T, assim os genes que codificam essas moléculas

associados maior à suscetibilidade ao DM1A (RONNINGEN *et al.*, 1991; ERLICH, H. A. *et al.*, 1993; KELLY *et al.*, 2003). Estudos mostraram que entre os diferentes tipos de HLA, existem forte associação do DM1A com o HLA de classe II (DR, DQ e DP) em caucasianos (MIJOVIC *et al.*, 1991; ERLICH, H. A. *et al.*, 1993; JAHROMI; EISENBARTH, 2007).

Pesquisas realizadas em diferentes populações investigaram o risco dos haplótipos HLA-DRB1-DQB1 e observaram que vários haplótipos estão associados com diferentes espectros de risco para a doença, variando de forte suscetibilidade até quase completa proteção (MIJOVIC *et al.*, 1991; NOBLE *et al.*, 1996; SHE, 1996; PARK *et al.*, 1998; CUCCA *et al.*, 2001; SCHIPPER *et al.*, 2001; KOELEMAN *et al.*, 2004). Os haplótipos que conferem grande suscetibilidade são os DRB1*0301-DQA1*0501-DQB1*0201, e DRB1*0405-DQA1*0301-DQB1*0302 Já os haplótipos associados à proteção são DRB1*1501-DQA1*0102-DQB1*0602, e DRB1*1401-DQA1*0101-DQB1*0503 (THORSBY; UNDLIEN, 1996; ERLICH, H. *et al.*, 2008).

Genes não-HLA também podem estar associados à suscetibilidade ou proteção ao DM1A (JAHROMI; EISENBARTH, 2007). Como a maioria dos genes associados com DM1A estão aparentemente envolvidos na resposta imune, as influências genéticas envolvem mecanismos que coletivamente contribuem para uma resposta imune alterada. Esses mecanismos poderiam ser úteis na explicação das diferentes taxas de progressão para o desenvolvimento do DM1A entre adultos e crianças (HOWSON *et al.*, 2011; POLYCHRONAKOS; LI, 2011).

Polimorfismos associados ao DM1 têm sido encontrados nos genes da insulina (INS), proteína tirosina fosfatase não receptora tipo 22 (*protein tyrosine phosphatase nonreceptor type 22* - PTPN22), subunidade alfa do receptor de interleucina 2 (*interleukin 2 receptor alpha* - IL2RA), proteína 3 do adaptador SH2B (*SH2B adaptor protein 3* - SH2B3), proteína tirosina fosfatase não receptora tipo 2 (*protein tyrosine phosphatase nonreceptor type 2* - PTPN2), domínio lectina tipo C membro A da família 16 (*C-type lectin domain family 16 member A* - CLEC16 A), ubiquitina associada e domínio SH3 contendo A (*Ubiquitin associated and the SH3 domain containing A* - UBASH3A) e antígeno 4 associado com Linfócito T Citotóxico (*cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4* - CTLA4) (CONCANNON; RICH; NEPOM, 2009; POLYCHRONAKOS; LI, 2011). Polimorfismos nestes genes têm sido utilizados para estratificar risco futuro em pessoas com genótipos de risco HLA (STECK *et al.*, 2012).

Outra classe de polimorfismo bastante estudada são os minissatélites, também conhecidos como VNTR (*Variable Number of Tandem Repeats*; repetições em número variável sequenciais). São regiões dispersas no genoma que contém um número variável de sequências repetidas e enfileiradas, (*tandem*) de DNA, a partir de uma sequência consenso que contém em torno de 10 a 15 pares de bases (JEFFREYS; WILSON; THEIN, 1985). O número dessas unidades de repetições muda de indivíduo para indivíduo, sendo único para cada pessoa, servindo assim como uma impressão digital molecular (HARVEY; FERRIER, 2012).

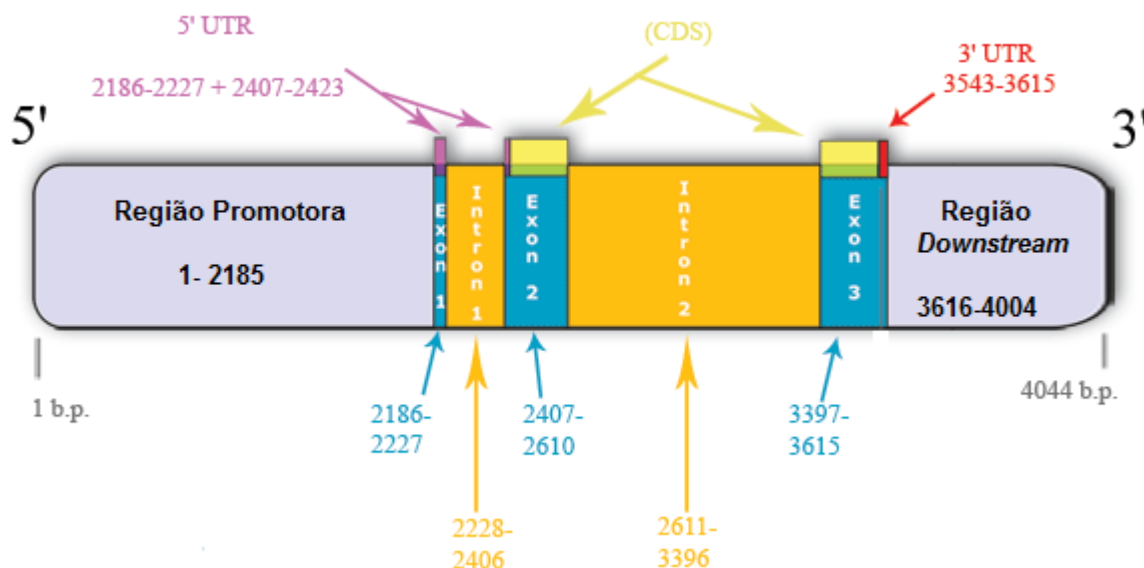
A identificação de polimorfismos representa um passo importante na compreensão da contribuição das variabilidades genéticas na predisposição ou proteção à doenças (RISCH; MERIKANGAS, 1996). Em populações heterogêneas, como a população brasileira (miscigenação de brancos-negros-índios), estudos de associação entre polimorfismos e a predisposição ou proteção à doença são relevantes, uma vez que cada população estudada pode apresentar um perfil genético distinto, não necessariamente replicando experimentos realizados em diferente base populacional.

No presente estudo foram selecionados os polimorfismos rs3842752 que se encontra em desequilíbrio de ligação com o VNTR do gene da Insulina, e os rs712701 e rs2233575 do gene *Paired Box4* (PAX4).

3.4.1.1 Gene da Insulina Humana - INS

O gene da insulina (*INS*) (Figura 5) foi o primeiro candidato óbvio para DM1, em parte devido a existência de auto-anticorpos específicos para insulina. Além disso, regiões próximas ao gene da insulina humana (OMIN:176730) têm sido consistentemente ligadas ao DM1 por mais de duas décadas (*locus insulin-dependent diabetes mellitus 2 - locus IDDM2*) (BELL; HORITA; KARAM, 1984; JULIER *et al.*, 1991; PUGLIESE; MICELI, 2002).

FIGURA 5 – ESTRUTURA DO GENE DA INSULINA HUMANA.

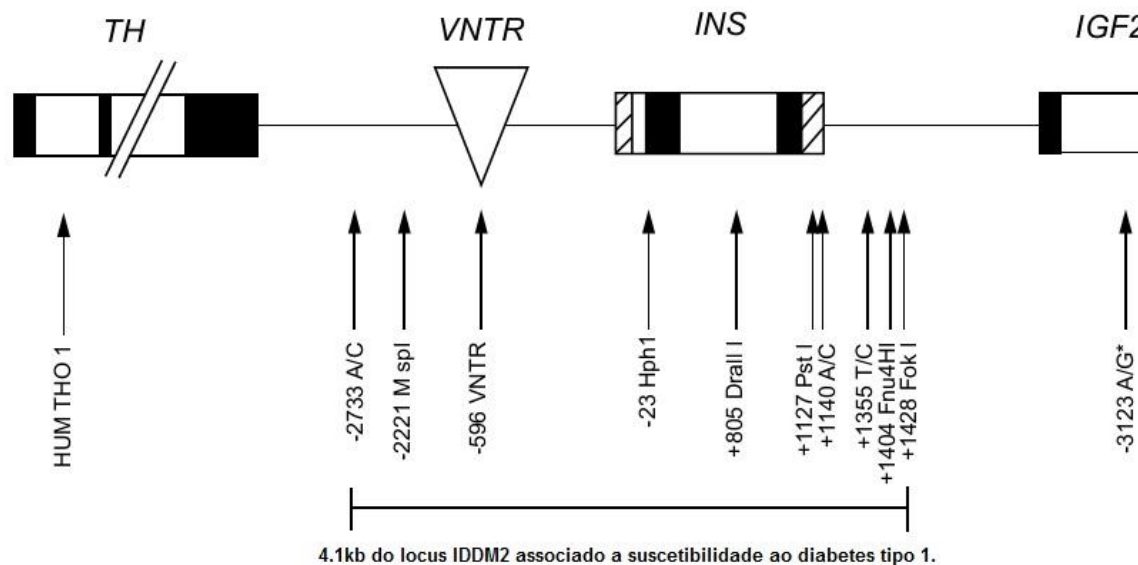


CDS (*coding sequence*): sequência de codificação do DNA; UTR (*untranslated region*): região não traduzida. Todas as unidades são em pares de base (pb).

Fonte: Adaptado de Jersey (2005).

O *locus* IDDM2 compreende uma região no cromossomo 11p15 onde se encontram o minissatélite VNTR (*Variable Number of Tandem Repeats*), o gene de insulina, e os genes tirosina hidroxilase (*Tyrosine Hydroxylase* - TH) e fator de crescimento II similar à insulina (*Insulin-like Growth Factor II* - IGF2) (Figura 6), onde a principal associação encontrada com DM1 localiza-se em torno do polimorfismo de VNTR, numa região de 4,1kb (BENNETT *et al.*, 1995; BENNETT; TODD, 1996; BARRATT *et al.*, 2004; MAIER; WICKER, 2005; PUGLIESE, 2005).

FIGURA 6 - REPRESENTAÇÃO DO CROMOSSOMO 11p15.5, COM OS SÍTIOS DE VARIABILIDADE GÊNICA NA REGIÃO IDDM2.



TH: gene Tirosina Hidroxilase; VNTR: *Variable Number of Tandem Repeats*; INS: gene da Insulina; IGF2: fator de crescimento insulina-símile. Os retângulos abertos caracterizam os íntrons, os fechados caracterizam os éxons, e os que apresentam hachuras são as regiões não transcritas. O triângulo invertido identifica o sítio VNTR-INS.

Fonte: Adaptado de Bennett e Todd (1996).

A região VNTR-INS apresenta uma sequência consenso composta por 14 a 15 pares de bases de oligonucleotídeos (ACAGGGGTGTGGGG) que se repetem em série. Os polimorfismos do VNTR-INS são caracterizados por apresentarem 3 alelos, classificados pelo tamanho e determinado pelo número de unidades repetitivas. Portanto, o VNTR de classe I, que apresenta repetições curtas, com um número variável de 23 a 63 repetições; o VNTR de classe II, com 64 a 140 repetições que ocorrem muito raramente (VAFIADIS *et al.*, 2001); e o VNTR de classe III, com repetições mais longas variando de 141 a 210 repetições (BELL *et al.*, 1980; KELLY *et al.*, 2003; CHUNG *et al.*, 2010; DURINOVIC-BELLO *et al.*, 2010).

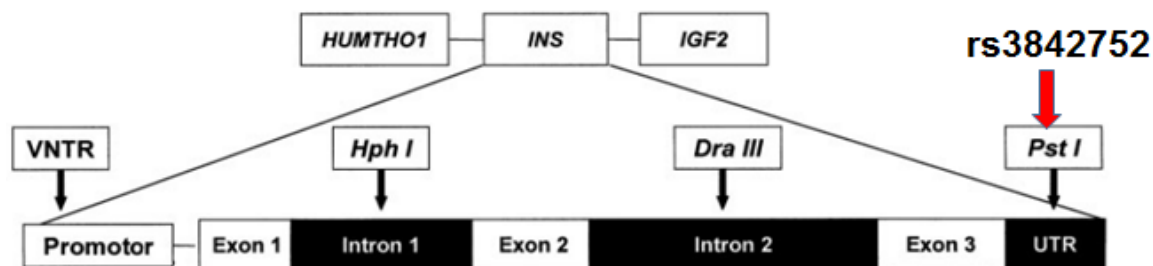
Os alelos de classe III estão associados à proteção para o diabetes. A hipótese mais consistente sugere que os portadores deste alelo apresentam níveis elevados (2 a 3 vezes) de RNAm da insulina no timo. A modulação da transcrição tímica de insulina pelo alelo de classe III induz a seleção negativa das células T tímicas autoreativas, conferindo maior tolerância imune aos indivíduos portadores desse alelo (VAFIADIS *et al.*, 2001; SILVA; MORY; DAVINI, 2008).

Os alelos VNTR-INS de classe I estão relacionados a predisposição ao DM1A. A hipótese predominante é que esses alelos condicionam níveis mais elevados de RNAm da *INS* no pâncreas e possuem baixa transcrição de insulina em células do timo, o que acarreta uma redução da tolerância à insulina (PUGLIESE *et al.*, 2001; TODD; WICKER, 2001).

Estudos mostraram que a classe alélica de VNTR I em homozigose foi encontrada em 75-85% nos indivíduos com DM1A, em comparação com uma frequência de 50 a 60% na população geral, confirmando que a presença desse alelo está relacionado com a predisposição a doença (BENNETT *et al.*, 1995; PUGLIESE, 2005).

O polimorfismo rs3842752 C>T localizado na região 1127 *Pst* I (3'UTR) do gene da Insulina (Figura 7), se encontra em desequilíbrio de ligação com a região VNTR. O alelo C se encontra em *cis* com VNTRs de classe I, enquanto que o alelo T se encontra em *cis* com VNTRs de classe III (RANI; SOOD; GOSWAMI, 2004).

FIGURA 7 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO GENE DA INSULINA COM AS ENZIMAS DE DIGESTÃO

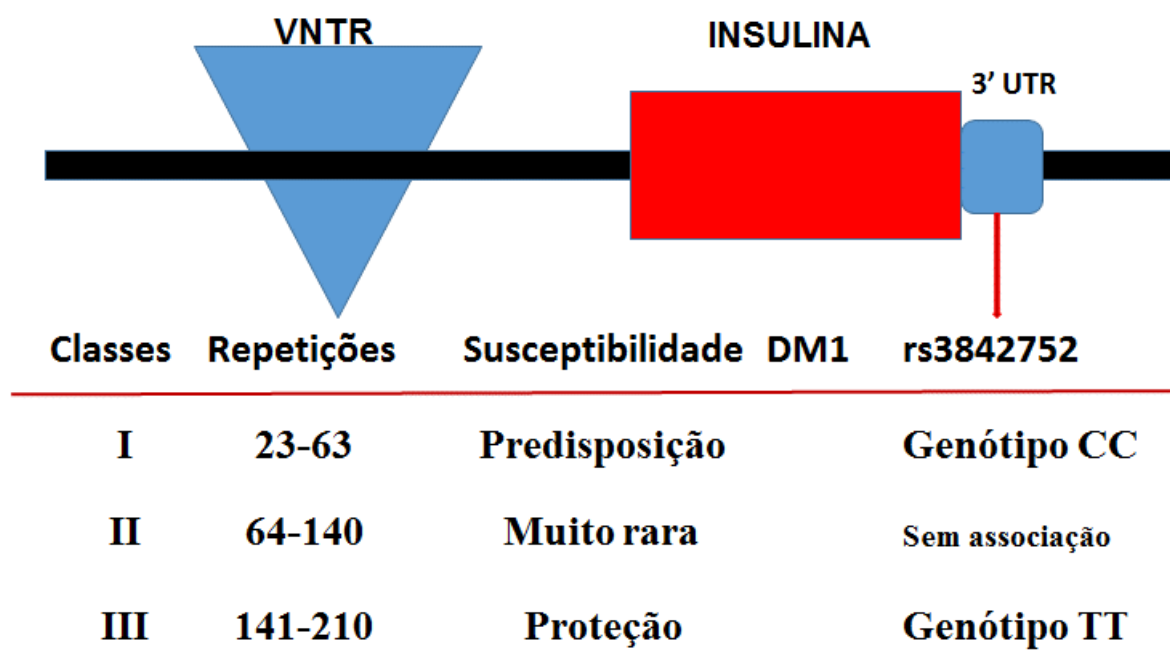


Estrutura do gene da insulina com a indicação dos locais onde se encontram os polimorfismos mais relevantes e as enzimas de digestão utilizadas para distinguir as variantes polimórficas. Flecha destaca o polimorfismo estudado.

Fonte: Adaptado de Pugliese e Miceli (2002).

Diante disso, e conforme observado em outros estudos, a genotipagem dos alelos de classe I e III do VNTR do gene da Insulina pode ser inferida pela genotipagem do polimorfismo rs3842752 (1127 *Pst* I) (Figura 8) (PUGLIESE *et al.*, 1997; RANI; SOOD; GOSWAMI, 2004).

FIGURA 8 – INTER-RELAÇÃO ENTRE AS CLASSES DA REGIÃO VNTR-INS COM O POLIMORFISMO rs3842752 QUANTO A SUSCEPTIBILIDADE AO DIABETES TIPO 1.



Classe I do VNTR apresenta desequilíbrio completo de ligação com o genótipo CC do rs3842752 do gene da Insulina e está relacionado com a predisposição do DM1A. A classe II do VNTR é muito rara e não apresenta associação com esse polimorfismo. Já a classe III do VNTR se encontra em desequilíbrio de ligação com o genótipo TT do rs3842752 do gene da Insulina e tem relação com a proteção ao desenvolvimento de diabetes tipo 1A. Triângulo azul representa a região VNTR, retângulo vermelho representa o gene da insulina, quadrado azul representa a região 3' UTR onde se localiza o polimorfismo rs3842752.

Fonte: O autor (2016).

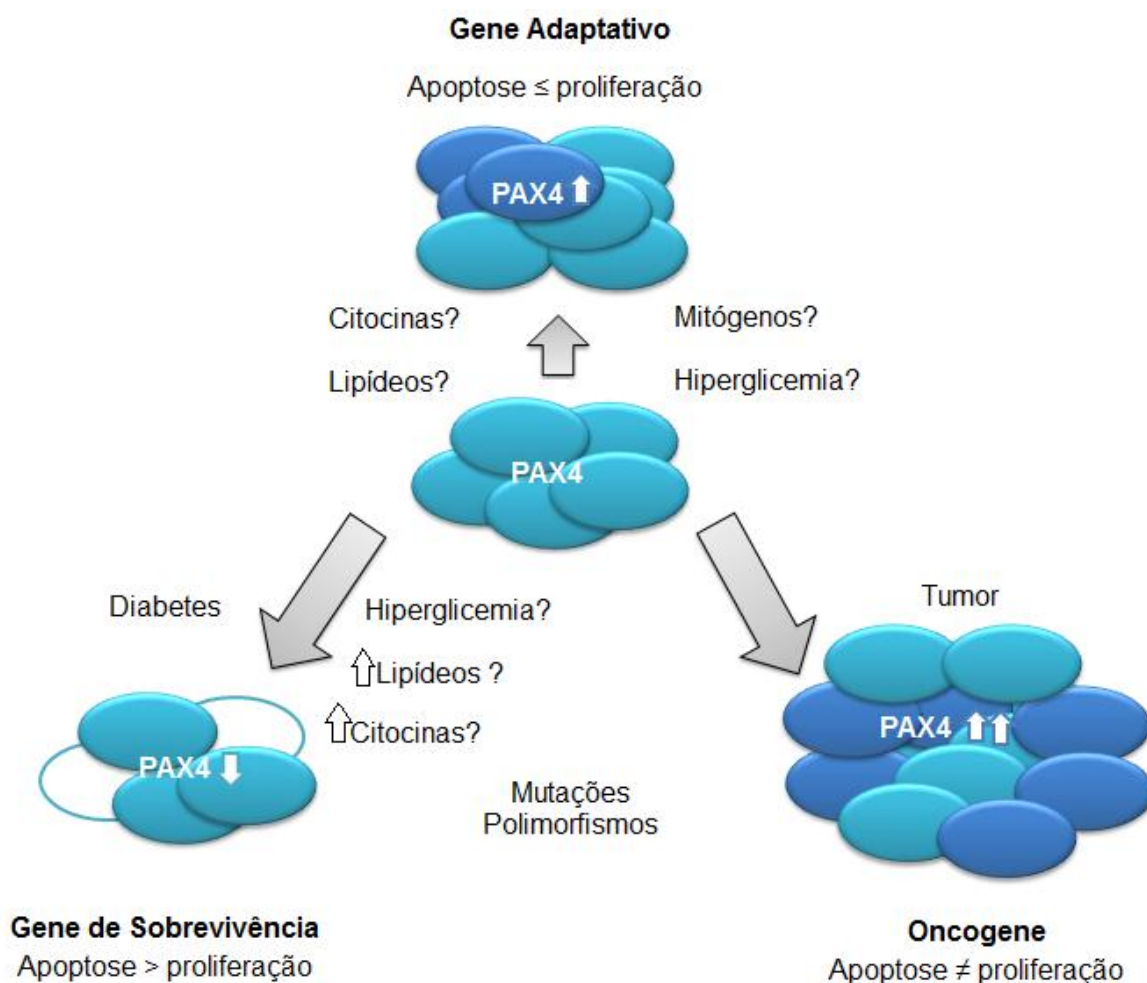
3.4.1.2 Gene *Paired Box4* (PAX4)

Os genes *Pax* codificam para uma família de proteínas que atuam como fatores de transcrição, os quais possuem funções essenciais na organogênese durante o desenvolvimento embrionário, na regulação da proliferação celular, resistência à apoptose, na migração de células precursoras embrionárias, e na coordenação dos programas de diferenciação celular específica (LANG *et al.*, 2007; BRUN; GAUTHIER, 2008).

No DM1, a perda de células beta-pancreáticas é crucial para o desenvolvimento da doença, e acontece devido à um desequilíbrio entre a destruição autoimune e a regeneração insuficiente das mesmas nas ilhotas de Langerhans (BIASON-LAUBER *et al.*, 2005). O gene *PAX4*, codifica um fator de transcrição essencial para a diferenciação das células beta-pancreáticas nas ilhotas de Langerhans (GAGE; BAKER; KIEFFER, 2014) e sua expressão estimula a

proliferação e protege as células contra apoptose induzida por estresse (BRUN; GAUTHIER, 2008).

Brun e Gauthier (2008) propõem um modelo que integra as várias funções que o gene *PAX4* possa possuir na fisiologia e na patofisiologia das células beta (Figura 9). Em condições fisiológicas, nas quais as células beta precisam compensar a demanda de insulina, tais como na gravidez ou obesidade, *PAX4* atua como um gene adaptativo que permite a replicação das células beta. Em contraste, mutações ou polimorfismos que enfraqueçam a atividade transcrricional de *PAX4* iriam contribuir para redução da sobrevivência e/ou proliferação das células beta durante o desenvolvimento pancreático. Subsequentemente, a apoptose iria resultar na perda gradativa das células produtoras de insulina. Isto causaria deficiência gradativa de insulina, hiperglicemia e em última análise diabetes. Assim, *PAX4* seria qualificado como um gene de sobrevivência. Em contraste, mutações que resultariam em ganho de função que confeririam resistência contra apoptose poderiam oferecer uma vantagem seletiva para desenvolvimento tumoral. Nestas circunstâncias, *PAX4* seria considerado um oncogene.

FIGURA 9 - MODELO DE AÇÃO DO GENE *PAX4* DE ACORDO COM SUA EXPRESSÃO

Estimulações transitórias promovidas por mitógenos, tais como Ativina A e betacelulina, bem como a presença de citocinas e lipídeos resultam na proliferação celular, aumentando a sobrevivência celular (figura superior, círculos azul-escuros). A exposição crônica a citocinas, hiperglicemia e hiperlipidemia resulta na inibição da expressão do PAX4 com uma concomitante diminuição da replicação celular, e a apoptose. Disfunções na atividade de PAX4 devido a mutações ou polimorfismos possuem as mesmas consequências. A massa celular, como as células beta-pancreáticas, possui um declínio gradual (figura inferior à esquerda, círculos abertos) que ao longo do tempo leva ao diabetes. Em contraste, alterações que aumentam a expressão de PAX4 conferem resistência a apoptose estimulando insulinomas, ou promove mitogênese em linfomas, resultando no aumento global de massa celular (figura inferior à direita, círculos azul escuros).
Fonte: Adaptado de Brun e Gauthier (2008).

Holm e colaboradores (2004) reportaram correlação entre DM1 e a região 7q320 no cromossomo 7 onde se localiza o gene *PAX4* (OMIM:167413). Recentemente, BIASON-LAUBER e colaboradores (BIASON-LAUBER *et al.*, 2005) demonstraram o alelo C do polimorfismo rs712701 no gene *PAX4* está associado à susceptibilidade ao DM1 nas populações Alemã e Suíça. E Plengvidhya e colaboradores (2005) reportaram que o polimorfismo rs2233575 no gene *PAX4* foi três vezes mais frequente nos pacientes com diabetes MODY do que no grupo controle.

O polimorfismo rs712701 localizado no exon 9 do gene *PAX4* resulta na substituição do aminoácido histidina por prolina na posição 321 da proteína PAX4. O polimorfismo rs2233575 localizado na região promotora consiste de uma substituição de Guanina para Timina (ZHANG *et al.*, 2008).

3.4.2. BIOMARCADORES SOROLÓGICOS

Auto-anticorpos têm sido cruciais para o estabelecimento do DM1 como uma desordem auto-imune. Detecção de títulos variáveis de auto-anticorpos em pacientes com diabetes foi o primeiro indicador de um componente humoral para o DM1 (WINTER; SCHATZ, 2011).

Anticorpos com alvos associados às células de ilhotas foram estabelecidos, e painéis de anticorpos são utilizados mais frequentemente para identificar indivíduos com risco para o desenvolvimento do DM1 e confirmar diagnóstico clínico do DM1 no início da doença. Os anticorpos associados ao DM1 comercialmente disponíveis incluem aqueles que detectam anticorpos contra insulina (*insulin autoantibodies* - IAA), ácido glutâmico descarboxilase (*glutamic acid decarboxylase autoantibodies* - GADA), proteína de membrana com homologia às tirosinofosfatases ou antígeno 2 do insulinoma (*tyrosine phosphatase like insulinoma antigen 2* - IA-2) e células de ilhotas (*islet cell antibody 512* - ICA512), sendo este último com autoreatividade predominante para epítomos C-terminal de IA2 (WATKINS *et al.*, 2014).

Taxas de positividade para auto-anticorpos contra antígenos específicos das ilhotas no início do DM1 para indivíduos da população em geral foram reportados (WINTER; SCHATZ, 2011) e são os seguintes: ICA, 70-80% dos indivíduos; IAA, 60% das crianças; IA2 60% dos indivíduos; e GAD, 70-80% dos indivíduos (WENZLAU *et al.*, 2007; ORBAN *et al.*, 2009; WINTER; SCHATZ, 2011). O quadro 1 mostra a frequência desses auto-anticorpos em diferentes faixas etárias (SILVA; MORY; DAVINI, 2008).

QUADRO 1 - FREQUÊNCIA DOS AUTOANTICORPOS EM DIFERENTES FAIXAS ETÁRIAS DE PACIENTES COM DM1.

Auto-anticorpos	Idade (anos)		
	0-9	10-19	20-39
IAA	78%	43%	29%
ICA	86%	84%	60%
Anti-GAD 65	64%	80%	78%
IAA ou ICA	91%	92%	65%
IAA ou ICA ou Anti-GAD 65	91%	98%	85%
	< 15	20-40	> 40
Anti-IA2	86%	45%	< 30%

IAA: auto-anticorpos anti-insulina (*insulin autoantibodies*); ICA: auto-anticorpos citoplasmáticos anti-ilhotas (*islet cell antibody*); GAD: descarboxilase do ácido glutâmico isoforma com 65 KDa (*glutamic acid decarboxylase*); IA2: antígeno 2 de insulinoma (*insulinoma antigen 2*).

FONTE: (SILVA; MORY; DAVINI, 2008).

O auto-anticorpo IAA é mais frequente em crianças, apresentando baixa sensibilidade diagnóstica em adultos (10%). É também encontrado no soro de paciente que faz uso de insulina (7 a 10 dias após o início do tratamento), e nestes casos deixa de ser útil como marcador para a patologia (ZIEGLER *et al.*, 1999).

O auto-anticorpo ICA é caracterizado como um anticorpo da classe IgG policlonal. O ICA é dirigido a uma ou várias estruturas celulares ao mesmo tempo (GAD65, IA2 e outros antígenos), e não especificamente contra antígenos de células beta (SILVA; MORY; DAVINI, 2008).

O anti-GAD65 apresenta sensibilidade de 60-80% para o diagnóstico de DM1A, independentemente da idade, no entanto sua presença não implica necessariamente progressão rápida da doença. Está associado a outras doenças autoimunes além do DM1A (PIHOKER *et al.*, 2005).

A detecção do anticorpo anti-IA2 indica rápida progressão do DM1A, e é mais frequente entre os indivíduos jovens (até 15 anos) (PIHOKER *et al.*, 2005).

Auto-anticorpos contra o transportador de zinco 8 (*zinc transporter 8 - ZnT8*) documentado em 2007, constitui uma adição relativamente nova aos marcadores sorológicos. É encontrado em 60-80% de indivíduos recém diagnosticados com DM1A, em comparação com a presença de 30% desse mesmo auto-anticorpos em indivíduos com outras doenças autoimunes (WENZLAU *et al.*, 2007).

3.4.3 BIOMARCADORES DE CONTROLE GLICÊMICO

Está bem estabelecido que o controle glicêmico ajuda a reduzir ou prevenir as complicações de diabéticas (REICHARD; NILSSON; ROSENQVIST, 1993; OHKUBO *et al.*, 1995; THE-DIABETES-CONTROL-AND-COMPLICATIONS-TRIAL-RESEARCH-GROUP, 1995; UNITED-KINGDOM-PROSPECTIVE-DIABETES-STUDY, 1998; STRATTON *et al.*, 2000). O monitoramento glicêmico é de suma importância para o tratamento do diabetes, permite avaliar a eficácia da terapia empregada, e embasar a orientação nutricional, atividades físicas e medicamentos para obter o melhor controle glicêmico possível (GOLDSTEIN *et al.*, 2003). A concentração plasmática de glicose em indivíduos sem diabetes deve ser mantida no intervalo entre 100 mg/dL e 126 mg/dL em jejum (SBD, 2016). As metas de controle glicêmico em crianças e adolescentes com DM1 são apresentadas no quadro 2.

QUADRO 2 - RECOMENDAÇÕES DA ISPAD E ADA PARA O CONTROLE GLICÊMICO DE CRIANÇAS E ADOLESCENTES DE TODAS AS FAIXAS ETÁRIAS.

	Glicemia (mg/dL)			(%)
	Jejum ou Pré-prandial	Pós-prandial	Ao dormir	HbA1c
Ideal ISPAD	65 a 100	80 a 126	80 a 100	< 6,5
Ótimo ISPAD	90 a 145	90 a 180	120 a 180	< 7,5
ADA	90 a 130	-	90 a 150	< 7,5

ISPAD: Sociedade Internacional para Diabetes em Crianças e Adolescentes (*International Society for Pediatric and Adolescent Diabetes*); ADA: Associação Americana de Diabetes (*American Diabetes Association*).

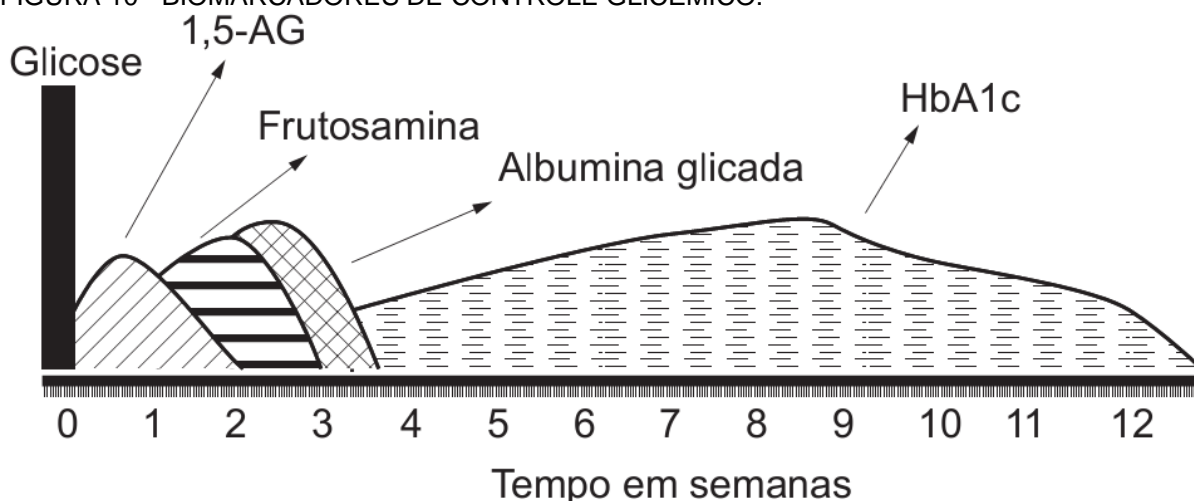
FONTE: SBD (2016).

Para o monitoramento dos níveis glicêmicos, estão aprovados pelo FDA (*U.S. Food and Drug Administration*) o auto-monitoramento da glicose sanguínea e a dosagem de vários marcadores bioquímicos de controle glicêmico. Cada um deles fornece um índice levemente diferente do controle glicêmico instantâneo (STAHL *et al.*, 2002; GOLDSTEIN *et al.*, 2003; SACKS *et al.*, 2011).

Estudos propõem que múltiplos marcadores deveriam ser utilizados para capturar todo o espectro da variação glicêmica (RUBINOW; HIRSCH, 2011), uma vez que diferentes métodos com variadas utilidades e limitações apresentam-se disponíveis para o monitoramento do estado glicêmico, tanto por pacientes quanto por profissionais da saúde (RENARD, 2005).

O controle glicêmico em pacientes diabéticos tem sido habitualmente avaliado através da dosagem de glicemia em jejum, pós-prandial e pela determinação da hemoglobina glicada fração HbA1c (SBD, 2016). No entanto, os avanços de métodos de controle da glicemia tem proporcionado o uso em conjunto de novos biomarcadores com os tradicionais, bem como a compreensão da utilização desses (GOLDSTEIN *et al.*, 2004; SELVIN *et al.*, 2011). A crescente atenção aos biomarcadores glicêmicos alternativos, tais como albumina glicada (AG) e 1,5 anidroglicitol (1,5AG), é atribuído às limitações do ensaio da HbA1c (Figura 10) (LEE, 2015).

FIGURA 10 - BIOMARCADORES DE CONTROLE GLICÊMICO.



Os períodos de tempo em semanas indicam a sensibilidade dos biomarcadores para detectar variações no controle glicêmico. A glicemia captura a média glicêmica poucos minutos após a coleta. O tempo de resposta do 1,5 anidroglicitol (1,5AG) é de 2 a 3 dias, perdurando por até 2 semanas, da frutosamina é de 2 semanas, da albumina glicada é de 2 a 3 semanas, e da HbA1c é de 4 a 12 semanas.

FONTE: SBD (2016).

3.4.3.1 Dosagem de Glicose

A amostra para dosagem de glicemia em jejum deve ser coletada pela manhã, com ausência total de qualquer ingestão de alimentos por pelo menos 8 horas prévios à coleta. É realizada em soro ou plasma sendo comum o uso das metodologias enzimáticas com glicose oxidase/peroxidase ou hexoquinase-UV (SBD, 2016).

A glicemia em jejum, isoladamente, não é suficiente para avaliar o controle glicêmico no diabetes (SBD, 2016). O ensaio é pouco sensível e apresenta elevada

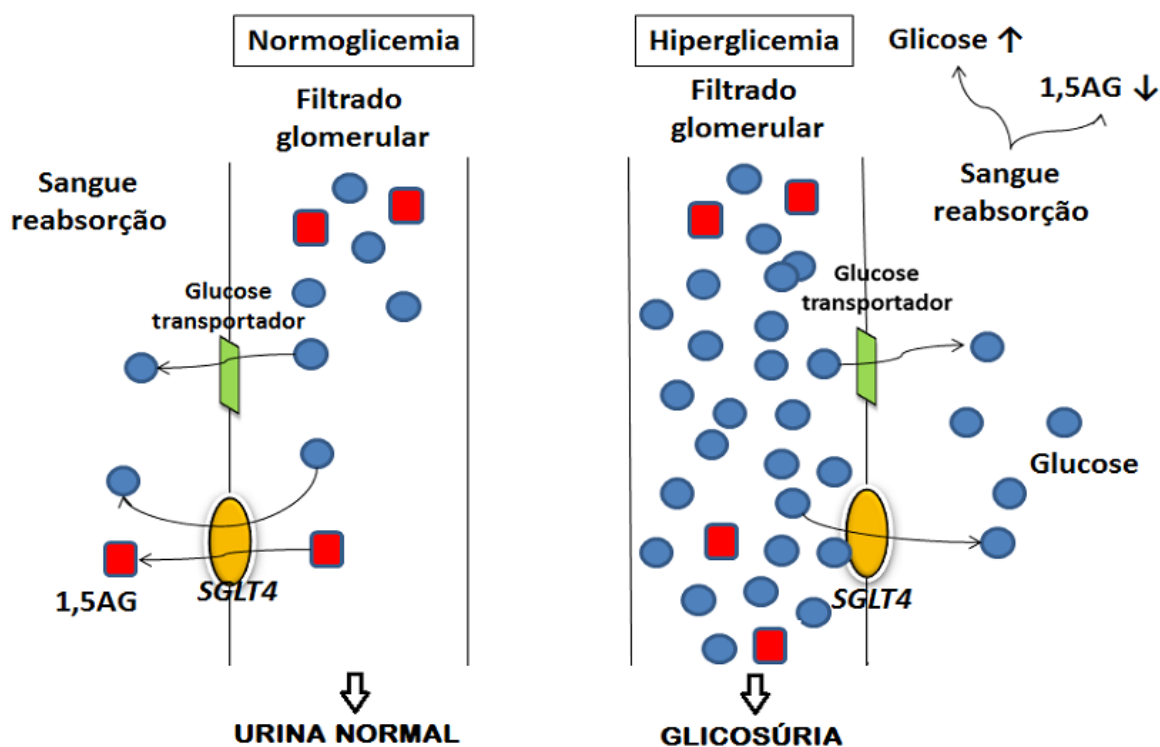
variabilidade biológica (coeficiente de variação interindividual ~6%) (TUOMILEHTO, 2002). A glicemia revela o status glicêmico no momento da coleta de sangue (SBD, 2016).

A dosagem de glicemia pós-prandial pode ser realizada 1 a 2 horas após a ingestão de alimentos podendo avaliar picos hiperglicêmicos pós-prandiais que levam ao risco de doença cardiovascular e ao aumento do estresse oxidativo (SBD, 2016).

3.4.3.2 1,5 Anidroglicitol

O 1,5 anidroglicitol (1,5AG) é um poliol plasmático que ocorre naturalmente na dieta e a concentração sérica é mantida constante durante a normoglicemia mediante o equilíbrio entre a reabsorção e excreção renal do carboidrato. Quando a glicemia aumenta, ultrapassando o limiar renal (>180 mg/dL), ocorre uma redução da concentração plasmática de 1,5AG em resposta à inibição competitiva com a glicose pela reabsorção tubular proximal (Figura 11) (DUNGAN, 2008; SBD, 2016).

FIGURA 11 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA REABSORÇÃO TUBULAR DO 1,5AG E DA GLICOSE EM CONDIÇÕES DE NORMO E HIPERGLICEMIA.



Em condições de normoglicemia a glicose (círculos azuis) e o 1,5AG (quadrados vermelhos) são reabsorvidos do filtrado glomerular pelos transportadores de glicose e manose SGLT4

(transportador 4 de glucose dependente de sódio, também conhecido como SLC5A9), os quais apresentam afinidade pelo 1,5AG. Dessa forma os transportadores recuperam quase totalmente a glucose e o 1,5AG sendo perdido na urina quantidades insignificantes. Na hiperglicemia o excesso de glucose presente nos túbulos compete com o 1,5AG pelos transportadores tubulares, e devido a sua alta concentração, é reabsorvida em maior proporção, provocando a eliminação do 1,5AG na urina, resultando na redução do 1,5AG no sangue na presença de hiperglicemia.

FONTE: Adaptado de Dugan (2008).

O 1,5 anidroglicitol tem sido proposto como indicador de hiperglicemia pós-prandial ou excursões glicêmicas (picos de hiperglicemia). É um ensaio que não é rotineiro, e tem sua utilidade descrita como crescente nos últimos anos (DUNGAN, 2008; SBD, 2016).

3.4.3.3 Frutosamina

É um método que mede a glicação das proteínas séricas, onde a principal proteína alvo é a albumina. A frutosamina reflete o controle glicêmico médio ao longo de duas semanas. É considerada uma alternativa à HbA1c quando essa é comprometida por fatores que interferem seus parâmetros, como por exemplo anemias e hemoglobinopatias. No entanto, ainda não existe associação bem estabelecida entre as complicações crônicas do DM com a concentração de frutosamina, como existe com a HbA1c (GOLDSTEIN *et al.*, 2004; SBD, 2016).

3.4.3.4 Albumina glicada

A albumina glicada é uma cetoamina formada a partir da reação não enzimática de glicação com a albumina do soro, e reflete a glicemia média sobre duas a três semanas anteriores ao ensaio (TAHARA; SHIMA, 1993; FURUSYO; HAYASHI, 2013). A albumina glicada aumenta na presença de hiperglicemia, e pode ser utilizada em pacientes com distúrbios hematológicos onde a dosagem de HbA1c pode ser imprecisa (LEE, 2015).

A dosagem de albumina glicada pode ser um melhor indicador de controle glicêmico recente ou de curto prazo, e complementar índices de HbA1c e de outros biomarcadores de controle glicêmico (GUTHROW *et al.*, 1979; LU *et al.*, 2007). Além disso, também pode ser útil por identificar de forma precoce alterações na glicemia para controle terapêutico uma vez que a mudança na porcentagem de albumina

glicada é detectada antes de qualquer alteração na hemoglobina glicada (GUTHROW *et al.*, 1979).

Estudos mostram cada vez mais que a albumina glicada é um útil marcador que pode ser utilizado para a triagem do diabetes ou como um guia para iniciar ou alterar a terapêutica, bem como para confirmar a eficácia do tratamento no diabetes (FURUSYO; HAYASHI, 2013).

3.4.3.5 Hemoglobina Glicada

Hemoglobina glicada é o termo utilizado quando a hemoglobina se liga a um açúcar na porção amino. A fração de maior importância na hemoglobina é a A1c que aumenta duas a três vezes nas células vermelhas de pacientes diabéticos. É formada lentamente ao longo de 120 dias nos glóbulos vermelhos, e confere uma medida da concentração glicêmica integrada dos últimos dois ou três meses (BUNN, 1981).

É um método utilizado rotineiramente em pacientes com DM, pois permite a avaliação à longo prazo da glicemia média (SBD, 2016), sendo o marcador com melhor validação em estudos prospectivos intervencionais e epidemiológicos para prever o risco de complicações no diabetes (OHKUBO *et al.*, 1995).

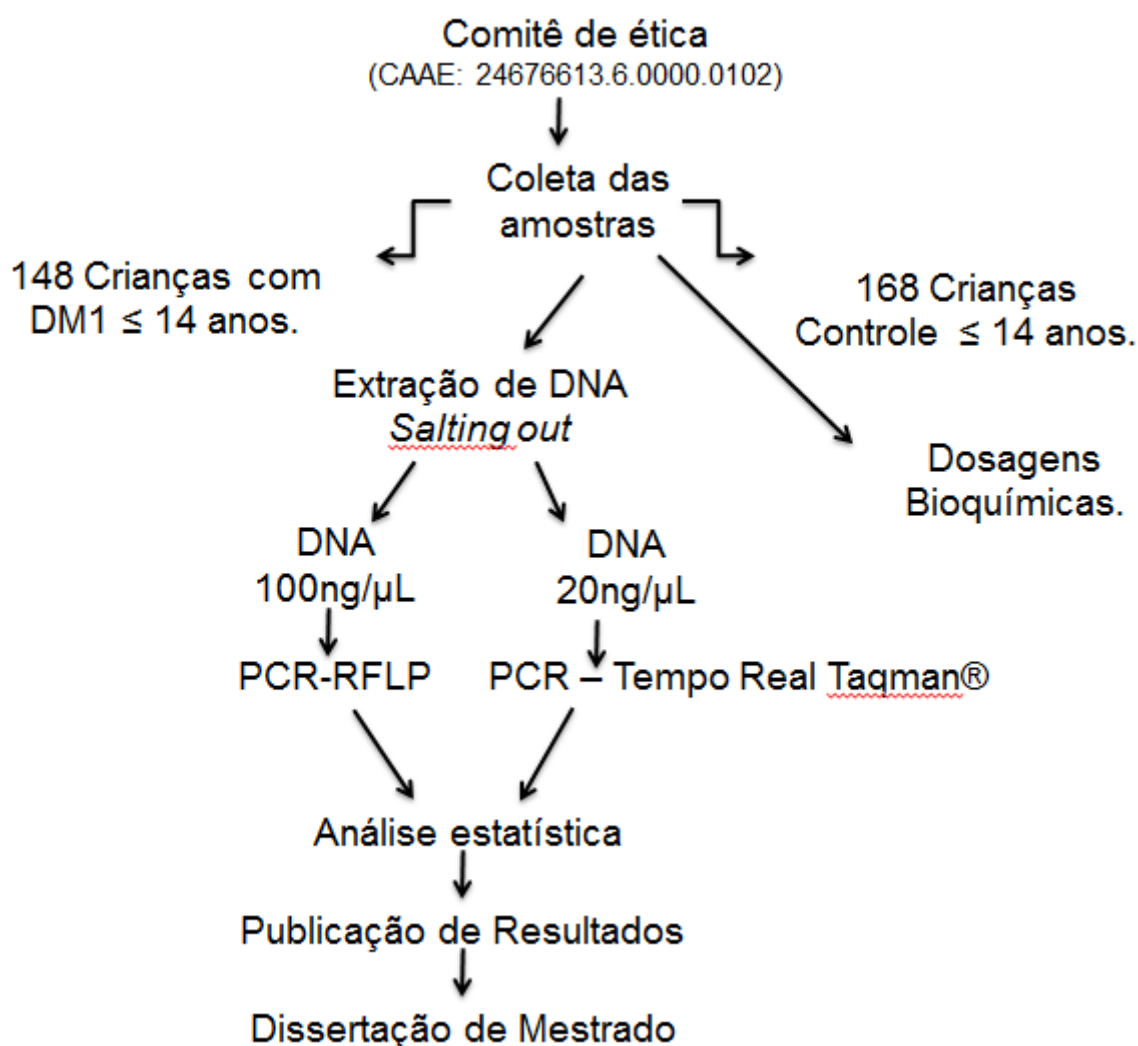
Apesar da HbA1c refletir o valor de uma estimativa global de glicemia média e ser considerada padrão ouro no controle do diabetes durante 2 a 3 meses anteriores à coleta sanguínea, ela indica apenas o histórico da medida integrada da concentração de glicose, não refletindo variações específicas e duração de picos das concentrações de glicose durante aquele período (OWENS *et al.*, 2004).

O teste HbA1c tem sido utilizado em pacientes com DM, no entanto existem várias condições clínicas que alteram a HbA1c e reduzem a confiabilidade nos resultados (RENARD, 2005). Em crianças com DM1, em que ocorre rápida evolução, a HbA1c pode não apresentar elevação significativa no momento do diagnóstico, apesar de presença de sintomas clássicos de DM (CRAIG *et al.*, 2014). Outros fatores que alteram a HbA1c são anemias (alteração no tempo de vida do eritrócito), hemoglobinopatias, uremias, alguns medicamentos e dislipidemias (GOLDSTEIN *et al.*, 2004; SBD, 2016). Além disso, o ensaio não proporciona a medição em tempo real do estado glicêmico e não detecta picos de hipoglicemia (RENARD, 2005).

4. METODOLOGIA

O presente projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética de Pesquisa em Seres Humanos do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná sob o CAAE: 24676613.6.0000.0102 (Anexo1). O fluxograma abaixo (Figura 12) mostra as principais etapas do projeto.

FIGURA 12 – FLUXOGRAMA DO PROJETO.



DM1: *Diabetes mellitus* tipo 1; PCR-RFLP: reação em cadeia da polimerase – Polimorfismo no Comprimento de Fragmentos de Restrição (*restriction fragment length polymorphism*).
Fonte: O autor (2016).

4.1 AMOSTRAS

Foram coletadas amostras de soro e sangue total de crianças com idade até 14 anos, não relacionadas e pareadas por gênero, classificadas em portadoras de diabetes tipo 1 (DM1, n=148) e crianças saudáveis como controles (CTRL, n=168).

A seleção dos pacientes diabéticos esteve a cargo da professora Dra Suzana Nesi França da Unidade de Endocrinologia Pediátrica do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná. As amostras das crianças com DM1 foram obtidas no Laboratório de Análises Clínicas do Hospital de Clínicas da UFPR, durante o exame de rotina dos pacientes, e após estes aceitarem participar da pesquisa. A autorização de coleta das amostras foi atrelada ao Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo 2). A coleta dos menores de 12 anos foi realizada com autorização dos pais (Anexo 3).

As amostras do grupo controle, sem diabetes, foram obtidas de alunos voluntários de escolas municipais da região metropolitana de Curitiba, seguindo os procedimentos descritos para o Comitê de Ética. Dados antropométricos, laboratoriais e clínicos foram obtidos por questionários. O *z-score* foi calculado com o calculador do *The Children's Hospital of Philadelphia* (<http://zscore.research.chop.edu/>).

Foi coletado aproximadamente 4 mL de sangue em tubos secos com gel separador para obtenção do soro e 4 mL em tubos contendo 7,2 mg do anticoagulante K₂EDTA (BD Vacutiner) para obtenção do plasma e extração de DNA leucocitário. As amostras coletadas com gel separador foram centrifugadas por 10 minutos a 6.000 rpm (centrífuga Compacta Hermle Z 206A). As amostras coletadas em tubo contendo anticoagulante foram centrifugadas a 3.500 rpm por 20 minutos (centrífuga Hermle Z 306 K). Todas as amostras foram centrifugadas imediatamente após a coleta. Alíquotas de soro (~1,5 mL) foram congelados em freezer a -20°C e -80°C até a realização das dosagens. Amostras hemolisadas foram excluídas dos ensaios. O plasma também foi separado em alíquotas (~1,5 mL) e mantido em freezer a -20°C. O *buffy coat* foi separado, e mantido em freezer a -20°C para extração de DNA.

4.2 EXTRAÇÃO DE DNA

O DNA genômico foi extraído a partir do *buffy coat* (Vacuette EDTA₃ Greiner) pelo método de *salting out* modificado (LAHIRI; NURNBERGER, 1991).

A quantificação do DNA genômico foi realizada por espectrofotometria em 260 e 280 nm (NanoDrop; Thermo Scientific), sendo critério de exclusão amostras com concentração inferior a 20 ng/μL e grau de pureza menor que 1,5 ou superior a 2,1, em relação a razão $A_{260/280}$, o que caracteriza contaminação e baixa qualidade da amostra.

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

4.3 GENOTIPAGEM DOS POLIMORFISMOS SELECIONADOS PARA ESTE ESTUDO

O quadro 3 apresenta os polimorfismos estudados neste trabalho e seus respectivos genes.

QUADRO 3 - CARACTERIZAÇÃO DOS POLIMORFISMOS EM ESTUDO.

Genes	Designação OMIN	Cromossomo Posição	Localização Região	Polimorfismos
<i>INS</i>	176730	11p15.5	3' UTR	rs3842752 C>T
<i>PAX4</i>	167413	7q32.1	Promotor	rs2233575 G>A
<i>PAX4</i>	167413	7q32.1	Éxon 9	rs712701 G>T

rs: dbSNP reference SNP database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez>); OMIN: Online Mendelian Inheritance in Man[®] (<http://omin.org/>); *INS*: Insulina; *PAX4*: Paired Box4.

A identificação das variações genéticas nos genes *INS* (rs3842752) e *PAX4* (rs2233575) foi realizada através de PCR-RFLP.

Para a identificação das regiões polimórficas do gene da insulina rs3842752 (+1127 *Pst* I) foram utilizados os seguintes oligonucleotídeos iniciadores: F-5'-AGCCCTTGGCCCTGGAGGGG-3' e R-5'-GTTACCGGGCTTTATTCCATCTCTC-3'

(Invitrogen) descritos por Rani e colaboradores (2004) que geraram um amplicon de 164 pb (Quadro 4). Esse polimorfismo se encontra em desequilíbrio de ligação com o polimorfismo VNTR-INS, fato que favorece a análise do minissatélite da região promotora do gene da insulina, uma vez que ao obtermos o genótipo desse SNP podemos inferir o genótipo do polimorfismo VNTR-INS (RANI; SOOD; GOSWAMI, 2004)

QUADRO 4 - CONDIÇÕES PARA A REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE DA REGIÃO POLIMÓRFICA DO GENE DA INSULINA.

Reagentes	rs3842752 do gene da Insulina	
Oligonucleotídeos iniciadores	F-5'-AGCCCTTGGCCCTGGAGGGG-3' R-5'-GTTACCGGGCTTTATTCCATCTCTC-3'	
	Concentração final	Volumes (reação 20 µL)
Água Regente estéril	—	13,5 µL
Tampão Taq 10x *	1x	2,0 µL
Primer Forward (10 pmol/µL)	10 pmol	1,0 µL
Primer Reverse (10 pmol/µL)	10 pmol	1,0 µL
MgCl ₂ 50 mM	1,5 mM	0,6 µL
dNTP 5 mM	0,2 mM	0,8 µL
Taq DNA polimerase (5U/µL)	0,5 U	0,1 µL
DNA molde (100 ng/µL)	100 ng/µL	1,0 µL
Ciclos Térmicos:	1 ciclo	94°C por 2 minutos
	33 ciclos	94°C por 30 segundos
		56°C por 30 segundos
		72°C por 30 segundos
	1 ciclo	72°C por 10 minutos

*Tampão TAQ 10X, (NH₄)₂SO₄ 750 mM, Tris-HCl (pH 8,8; 25°C); 0,1% (v/v) Tween 20. Taq DNA polymerase (Invitrogen). *Primers*: oligonucleotídeos iniciadores sintetizados pela Invitrogen, produzindo amplicon de 164 pb.

Fonte: O autor (2016).

Para a identificação das regiões polimórficas do gene *PAX4* rs2233575, foram utilizados os seguintes oligonucleotídeos iniciadores F-5'-CCCAGGACCATTTC AAGCA-3' e R-5'-GCCCATACCCGCCAAC-3' (Invitrogen) descritos por Zhang e colaboradores (2008) que geraram um amplicon de 349 pb (Quadro 5).

QUADRO 5 - CONDIÇÕES PARA A REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE DA REGIÃO POLIMÓRFICA DO GENE *PAX4*.

Reagentes	rs2233575 do gene <i>PAX4</i>	
Oligonucleotídeos iniciadores	F: (5'-CCCAGGACCATTTCAAGCA-3') R: (5'-GCCCATACCCGCCAAC-3')	
	Concentração final	Volumes (reação 20 µL)
Água Regente estéril	—	12,2 µL
Tampão Taq 10x *	1x	2,0 µL
<i>Primer Forward</i> (10 pmol/µL)	10 pmol	1,0 µL
<i>Primer Reverse</i> (10 pmol/µL)	10 pmol	1,0 µL
MgCl ₂ 25 mM	1,5 mM	1,2 µL
dNTP 5 mM	0,2 mM	0,8 µL
Taq DNA polimerase (5 U/µL)	4 U	0,8 µL
DNA molde (100 ng/µL)	100 ng/µL	1,0 µL
Ciclos Térmicos	Ciclos	Temperatura - tempo
Ciclos Térmicos:	1 ciclo	94°C por 2 minutos
	35 ciclos	94°C por 40 segundos
		59°C por 40 segundos
		72°C por 40 segundos
1 ciclo	72°C por 5 minutos	

*Tampão TAQ 10X, (NH₄)₂SO₄ 750mM, Tris-HCl (pH 8,8; 25°C); 0,1% (v/v) Tween 20. Taq DNA polymerase (Invitrogen). *Primers*: oligonucleotídeos iniciadores sintetizados pela Invitrogen, produzindo amplicon de 349 pb.

Fonte: O autor (2016).

Os fragmentos de 164 pb do gene *INS* (rs3842752) e de 349 pb do gene *PAX4* (rs2233575) amplificados através da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5% com voltagem constante de 80 Volts (~22 mA), em temperatura ambiente durante cerca de 2:10 horas, em tampão TBE 1x (Tris-hidroximetilaminometano 89 mmol/L; ácido bórico 89 mmol/L e EDTA 1 mmol/L, pH 8,2). Uma alíquota de 2 µL do produto de PCR, misturada a 3 µL de tampão de aplicação (glicerol 30%; azul de bromofenol 0,05% e xilenocianol 0,05%) foi aplicada no gel. Os produtos de PCR foram corados com solução de brometo de etídeo (0,5 µg/mL) e visualizados em transiluminador sob luz UV (302 nm). As imagens dos géis foram capturadas no sistema L-Pix (Loccus Biotecnologia).

As genotipagens dos polimorfismos dos genes *INS* e *PAX4* foram realizadas através da reação de PCR-RFLP (polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição) utilizando as enzimas de restrição *Pst* I para o rs3842752 do gene *INS* e *Hae* III para o rs2233575 do *PAX4* (Quadro 6).

QUADRO 6 - PROTOCOLO PARA A REAÇÃO DE RESTRIÇÃO E DETECÇÃO DOS POLIMORFISMOS DOS GENES *INS* E *PAX4*.

Reagentes	<i>INS</i> rs3842752	<i>PAX4</i> rs2233575
Produto de PCR (~20 ng/μL)	2,0 μL	1,0 μL
Tampão 10x (Sigma) *	0,5 μL	-
Tampão 10x (Promega) **	-	0,5 μL
Água ultrapura estéril	1,7 μL	3,25 μL
Enzima de Restrição (10 U/μL)	0,8 μL (Pst I)	0,2 μL (Hae III)
BSA acetilada	-	0,05 μL
Volume final da reação	5,0 μL	5,0 μL
Temperatura de Incubação	37°C	37°C
Tempo de incubação	16 horas	16 horas

*Tampão TAQ 10X, Sigma, 500 mM, Tris-HCl (pH 7,5; 37°C); 1M NaCl; 100 mM MgCl₂; 10 mM Dithioerythritol. **Tampão TAQ 10X Promega, Buffer C, 100 mM, Tris-HCl (pH 7,9; 37°C); 500 Mm NaCl; 100 mM MgCl₂; 10 mM Dithioerythritol. BSA: albumina sérica bovina acetilada 0,1mg/mL. Enzima Pst I (Sigma); Enzima HaeIII (Promega).
Fonte: O autor (2016).

Os fragmentos de DNA do gene *INS* oriundos das reações de PCR-RFLP foram separados em eletroforese em gel de poliacrilamida 29:1 a 15%, e do gene *PAX4* em gel de poliacrilamida 29:1 a 12%, ambos em cuba mini Protean 3 BioRad (100x75x0,75 mm). Toda a reação de restrição acrescida de 4 μL de solução de aplicação (glicerol 30% v/v, 0,05% de azul de bromofenol e 0,05% de xileno cianol) foi aplicada no gel e visualizada em transiluminador sob luz UV (302 nm) e fotodocumentado com sistema L-PIX (Loccus Biotecnologia).

4.4 REAÇÃO DE PCR EM TEMPO REAL COM SONDAS FLUORESCENTES (TAQMAN).

A genotipagem do polimorfismo rs712701 do gene *PAX4* foi realizada utilizando a técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real. A PCR em tempo real empregada nessa análise foi o sistema TaqMan® (Applied Biosystems, Foster City, CA, Estados Unidos), que utiliza a reação de amplificação em cadeia da polimerase e a discriminação alélica com sondas marcadas com diferentes fluoróforos. A reação foi realizada conforme preconizado pelo fabricante do reagente (Applied Biosystems, Foster City, CA, Estados Unidos) em equipamento de PCR em tempo real 7500Fast (Applied Biosystems).

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 a mistura de reação e água (sem DNA). Os grupos DM1 e CTRL foram ensaiados de forma aleatória, na mesma placa.

A sonda fluorescente TaqMan[®] validada (Applied Biosystems) para o rs712701 em estudo foi C_7563629_10, que disponibiliza os fluoróforos VIC e FAN (Anexo 5). No quadro 7 estão descritas as condições de ensaio utilizadas para a PCR tempo real.

QUADRO 7 - CONDIÇÕES OTIMIZADAS PARA A REAÇÃO DE PCR EM TEMPO REAL.

Reagentes	rs712701 do gene <i>PAX4</i> Volume para reação de 8 µL
Sonda TaqMan [®]	0,1 µL
Master Mix	3,0 µL
Água ultrapura estéril	1,9 µL
DNA (20 ng/µL)	3,0 µL
Ciclos Térmicos:	1 ciclo Pré-PCR 60°C por 60 s 1 ciclo 95°C por 10 minuto 50 ciclos: 95°C por 15 s 60°C por 90 s 1 ciclo pós-PCR 60°C por 60 s

Sonda TaqMan[®] SNP Genotyping Assays – Life Technologies, contendo um par de oligonucleotídeos iniciadores (primers), marcados com fluoróforos distintos (VIC e FAN). Master Mix: reagente comercial contendo DNA polimerase AmpliTaq Gold[®] ultrapura, desoxirribonucleotídeos trifosfato (dNTPs), referência passiva ROX e tampão.

Fonte: O autor (2016).

4.5 QUANTIFICAÇÃO DE PARÂMETROS BIOQUÍMICOS E DADOS ANTROPOMÉTRICOS.

As determinações dos parâmetros bioquímicos (glicemia, uréia, creatinina, perfil lipídico, proteínas totais, albumina e 1,5 anidroglicitol) foram realizadas em sistema automatizado Labmax 400 (Labtest AS) utilizando reagentes, calibradores e controles adequados ao sistema automatizado. A hemoglobina glicada (HbA1c) foi quantificada através de imunoensaio em sistema automatizado (Architect Ci8200, Abbott) no laboratório do Hospital de Clínicas da UFPR, parceiro do projeto. O quadro 8 apresenta os exames realizados, bem como suas metodologias e valores de referência.

QUADRO 8 - PARÂMETROS BIOQUÍMICOS, METODOLOGIAS, E INTERVALO DE REFERÊNCIA AJUSTADO PARA CRIANÇAS E ADOLESCENTES.

DOSAGEM	PRINCÍPIO METODOLÓGICO	CVa (%)	INTERVALO DE REFERÊNCIA
Ácido úrico	Enzimático Colorimétrico (Reação de Trinder)	3,6	0,5-6,0 mg/dL
Albumina	Colorimétrico (Verde de Bromocresol)	1,6	2,9-4,7g/dL
Colesterol total	Enzimático Colorimétrico (Reação de Trinder)	2,7	Desejável: <170mg/dL Limítrofe: 170-199mg/dL Elevado: >200mg/dL
Creatinina	Colorimétrico (Picrato alcalino)	2,7	0,26-0,81mg/dL
Glicose	Glucose oxidase - Trinder	2,2	<100mg/dL
HDL-colesterol	Enzimático Colorimétrico (Acelerador - Detergente Seletivo)	3,6	Desejável: 35-40 mg/dL
LDL-colesterol	Surfactante Seletivo	4,2	Desejável: <110mg/dL Limítrofe: 110-129mg/dL Elevado: 130mg/dL
Hemoglobina glicada	Imunoensaio (padronizado DCCT)	1,7	4,0-6,0%
Proteínas Totais	Colorimétrica (Biureto)	1,4	6-8g/dL
Triglicérides	Enzimático Colorimétrico (Reação de Trinder)	3,4	Desejável: <100mg/dL Elevado: >130mg/dL
Ureia	Colorimétrico (Urease UV)	6,2	8-36mg/dL
1,5 anidroglicitol	Enzimático Glycomark	3,4	>10 µg/mL

Valores de referência preconizados para crianças e adolescentes. CVa, coeficiente de variação analítico inter-ensaio.

Fonte: O autor (2016).

Os dados antropométricos como idade, peso, altura, tempo de diabetes, cetoacidose (CAD) no diagnóstico, e histórico CAD no último ano foram coletados através de entrevista direta e análise de prontuário médico (Anexo 4).

4.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

A normalidade para as variáveis contínuas foi verificada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. Variáveis contínuas com distribuição normal foram comparadas pelo teste t de Student (não pareado e bidirecional). Estas variáveis foram representadas pela média ± 1 -desvio padrão.

Variáveis contínuas sem distribuição normal foram comparadas pelo teste U de Mann-Whitney. Estas variáveis foram representadas pela mediana e intervalo interquartil (Q1-Q3; percentil 25%–75%).

Para as comparações com variáveis categóricas, foram utilizados os testes de Chi-quadrado ou o teste Exato de Fischer bidirecional, conforme apropriado.

Para os ensaios de correlação e associação utilizando ANOVA (*one-way*), os polimorfismos em estudo foram codificados como 1 (homozigoto mais comum), 2 (heterozigoto) e 3 (homozigoto menos comum).

A verificação do equilíbrio de Hardy-Weinberg (H-W), cálculos das frequências genóticas e alélicas, bem como o intervalo de confiança de 95% (IC 95%) para os alelos de menor frequência foram realizados com o programa DeFinetti (<http://ihg.gsf.de/cgi-bin/hw/hwa1.pl>).

Para as comparações das frequências alélicas com outras populações, foi considerado similar quando a frequência do alelo menos comum se encontrava dentro do limite do IC 95%. Frequências acima ou abaixo de 95%IC foram consideradas diferentes.

O programa Statistica 10.0 (StatSoft Inc, Tulsa OK, USA) foi utilizado nas análises de dados.

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

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados do presente estudo estão apresentados em três tópicos: 1) Caracterização da amostra; 2) Análises bioquímicas; 3) Análises moleculares.

5.1 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA

A amostra em estudo foi composta por 90% de crianças Euro-brasileiras e 10% por Afro-brasileiras ou outras etnias, com idade entre 6 a 14 anos, sendo divididos em dois grupos (Controle saudável e DM1) pareados por gênero. A estatística descritiva dos parâmetros antropométricos para os grupos controles e DM1 em estudo é apresentada na tabela 1.

TABELA 1 - CARACTERIZAÇÃO ANTROPOMÉTRICA E CLÍNICA DOS GRUPOS DM1 E CONTROLES SAUDÁVEIS EM ESTUDO.

PARÂMETROS	CONTROLE (n=168)	DM1 (n=148)	P
Idade (anos)	10,0(10,0-11,0)	11,0(9,5-13,0)	<0,001
Meninos/Meninas	90/78	70/78	0,244**
Peso (kg)	38,3(33,3-45,2)	38,4(30,1-50,4)	0,969
Altura (m)	1,4(1,3-1,5)	1,4(1,3-1,5)	0,516
IMC (kg/m ²)	19,5±4,4	18,7±2,9	0,454*
Z-score	0,5±1,0	0,2±0,9	0,020*
Idade diagnóstico DM1	ND	6,9 (3,8-9,0)	-
Tempo de DM1 (anos)	ND	4,0(2,0-7,6)	-
CAD no diagnóstico (%)	ND	68	-
CAD no último ano (%)	ND	25	-
Histórico familiar para diabetes (%)	ND	67	-

DM1: diabetes *mellitus* tipo 1; Controle: crianças saudáveis; IMC: Índice de Massa Corporal; ND: dado não disponível; CAD: Cetoacidose diabética; Idade ao diagnóstico e tempo de DM1 em anos. Os valores média±1 – Desvio Padrão para variáveis com distribuição normal, mediana (intervalo interquartil, 25%-75%) para variáveis sem distribuição normal. P: probabilidade, Teste U de Mann-Whitney; * teste t-Student bidirecional, ou **Chi-quadrado. P<0,05 é significativo e destacado em negrito; Z-score, número de Desvio Padrão (DP) distante da média, quando a distribuição é normal.

Fonte: O autor (2016).

5.1.1 Idade

O grupo com DM1 é mais velho quando comparado com o grupo controle saudável (Tabela 1). A diferença é relativamente pequena, 1 ano na mediana, o que

permite comparar os parâmetros bioquímicos entre os grupos sem considerar diferenças expressivas na idade.

A mediana da idade ao diagnóstico do grupo DM1 foi 6,9 anos. Este achado é similar a outros estudos, que mostram o aumento da incidência de DM1 em especial entre crianças e adolescentes (WEETS *et al.*, 2002; HARJUTSALO; SJOBERG; TUOMILEHTO, 2008; SBD, 2016). Em São Paulo, foi realizada uma pesquisa entre 1998 e 2008, que mostrou que média de idade ao diagnóstico em 1998 de $7,7 \pm 4$ anos, reduziu em 2008 para $6,8 \pm 4$ anos, em concordância com nossos dados (MARUICHI *et al.*, 2012). É relevante notar, que uma atenção à saúde de melhor qualidade, que estimula o diagnóstico do DM1, também vem sendo implementada e deve ter contribuído para a precocidade e registros mais adequados dos pacientes.

5.1.2 Peso, Altura, IMC, Z-score

Os parâmetros peso, altura, e IMC não apresentaram diferenças entre os pacientes e seus controles (Tabela 1).

O IMC é o parâmetro utilizado para o diagnóstico de estados nutricionais dos indivíduos, e é vantajoso por não requerer conhecimento da idade, no entanto a relação peso e altura muda drasticamente com a idade e com o estado de maturação de cada pessoa (WANG *et al.*, 2006). O *z-score*, é um parâmetro antropométrico utilizado para avaliar o crescimento e estado nutricional de crianças e adolescentes. Para obter o *z-score*, altura, peso, idade e gênero são combinados. O cálculo é realizado a partir da diferença entre o valor individual (x), e a média da população dividido pelo desvio padrão (σ). O resultado varia de +2(sobrepeso) a -2(abaixo do peso), indicando quão longe e em qual direção (negativo ou positivo) o valor se desvia da média populacional (WATERLOW *et al.*, 1977; WANG *et al.*, 2006). O grupo DM1 apresenta significativa redução no *z-score* quando comparado ao grupo controle ($P=0,020$). Este resultado é esperado, onde pacientes com DM1 estão relacionados com uma redução de peso, decorrente das alterações metabólicas da deficiência severa de insulina, e também da maior perda de água (desidratação) decorrente da poliúria, que ocorrem mesmo em pacientes com terapêutica adequada (USHER-SMITH *et al.*, 2015; ADA, 2016).

5.1.3 Cetoacidose Diabética (CAD)

A detecção da cetoacidose diabética (CAD) associada ao diagnóstico do DM1 foi de 68%. Este dado está em concordância com a frequência deste evento em outros estudos, que apresentaram ampla variação de 15% a 70% (WOLFSDORF; GLASER; SPERLING, 2006). O DM1 na infância e adolescência muitas vezes só é diagnosticado quando o quadro de cetoacidose diabética se estabelece (DUNGER *et al.*, 2004; WOLFSDORF; GLASER; SPERLING, 2006).

Em estudo realizado em São Paulo foi encontrado uma frequência de diagnóstico de DM1 em crianças através do desencadeamento de cetoacidose em 79,3% dos pacientes no ano de 1998 e uma frequência de 66% em 2008 (MARUICHI *et al.*, 2012). Já em um estudo prospectivo Irlandês realizado entre os anos de 1997-1998, a frequência foi de 25% de crianças diagnosticadas devido a cetoacidose diabética (ROCHE *et al.*, 2005).

O número elevado de indivíduos diagnosticados com DM1 devido à crise de CAD pode estar relacionado com a dificuldade de caracterizar os sinais clássicos e característicos de hiperglicemia (poliúria, polidipsia e emagrecimento) em crianças, uma vez que esses sintomas podem estar atribuídos a outras doenças mais prevalentes, retardando assim, o diagnóstico de DM1 (PIVA *et al.*, 2007).

Um trabalho realizado na cidade de Parma mostrou que através de campanhas populacionais sobre os sintomas mais frequentes do DM1 foi possível diminuir a incidência de CAD no diagnóstico. Este estudo realizado entre 1991-1997, permitiu ações que reduziram o CAD ao diagnóstico em mais de 65% dos casos (VANELLI *et al.*, 1999).

A frequência de casos de CAD ocorridos durante o ano de 2015 em pacientes que já estavam em tratamento do DM1 foi de 25% (Tabela 1). O desenvolvimento de CAD em pacientes com diagnóstico confirmado e sob tratamento, está relacionado ao mal controle glicêmico, sobretudo, devido ao uso inadequado de insulina (PIVA *et al.*, 2007).

Crianças com diagnóstico de DM1 bem estabelecido possuem risco de 1% a 10% por ano de desenvolver cetoacidose. O maior risco está associado às crianças que apresentaram episódios de cetoacidose prévios com um controle metabólico inadequado, àquelas que possuem transtornos psiquiátricos, incluindo transtornos

alimentares, e aquelas que tem problemas familiares e menor nível sócio-econômico (DUNGER *et al.*, 2004; WOLFSDORF; GLASER; SPERLING, 2006).

5.1.4 Histórico familiar de DM

Do total de entrevistados do grupo DM1, 67% relataram possuir histórico familiar de DM, tanto do tipo 1 como do tipo 2, em relação aos pais, irmãos e avós. O grupo controle saudável não tem esta informação disponível.

Vários estudos mostram uma associação entre o histórico familiar de diabetes e o risco de para o desenvolvimento do DM1, assim como para outras formas de diabetes (CHERN; ANDERSON; BARBOSA, 1982; WHO, 1991; USHER-SMITH *et al.*, 2015). O risco é expressivamente aumentado quando os parentes de primeiro grau são os afetados (SESTERHEIM; SAITOVITCH; STAUB, 2007).

Entre parentes de primeiro grau de indivíduos com DM1 a chance de desenvolver a doença fica em menos que 5% naqueles indivíduos que possuem positividade para apenas um ou nenhum anticorpo específico, e fica maior que 90% nos portadores de HLA de risco (DQB1*0302) e que são positivos para vários auto-anticorpos circulantes contra estruturas da célula beta pancreática (KULMALA, 2003; ADA, 2016).

5.2 ANÁLISES BIOQUÍMICAS

Na tabela 2 estão os resultados obtidos para os parâmetros bioquímicos avaliados neste estudo.

TABELA 2 - PARÂMETROS BIOQUÍMICOS DOS GRUPOS DM1 E CONTROLE NA AMOSTRA ESTUDADA.

PARÂMETROS	CONTROLE (n=168)	DM1 (n=148)	P
Glicemia em jejum (mg/dL)	92,0(85,0-98,0)	252,0(170,0-344,0)	<0,001
HbA1c (%)	5,2(5,1-5,4)	9,7(8,7-11,1)	<0,001
1,5 anidroglicitol (µg/mL)	30,0(25,7-38,3)	2,9(1,9-4,8)	<0,001
Colesterol total (mg/dL)	148,5(128,5-169,0)	172,0(147,0-196,0)	<0,001
HDL-colesterol (mg/dL)	50,0(42,0-58,0)	55,0(46,0-64,0)	<0,001
LDL-colesterol (mg/dL)	83,0(71,0-90,0)	98,0(83,0-118,0)	<0,001
Triglicérides (mg/dL)	93,0(67,0-128,0)	67,0(54,0-89,5)	<0,001
Albumina (g/dL)	4,1(4,0-4,5)	4,2(4,0-4,4)	0,654
Proteína total (g/dL)	7,2(6,8-7,7)	7,1(6,8-7,4)	0,023
Creatinina (mg/dL)	0,5(0,3-0,6)	0,7(0,6-0,8)	<0,001
Ureia (mg/dL)	22,0(18,0-26,0)	27,0(22,0-31,0)	<0,001
Ácido úrico (mg/dL)	3,4(2,9-4,0)	2,8(2,4-3,6)	<0,001

Os resultados são apresentados como mediana (intervalo interquartil); P, probabilidade, teste U de Mann-Whitney; P < 0,05 é considerado significativo.

Fonte: O autor (2016).

5.2.1 Biomarcadores de Controle Glicêmico (glicemia jejum, HbA1c e 1,5AG)

A concentração dos biomarcadores de controle glicêmico foi significativamente maior no grupo DM1 (Tabela 2). Essa diferença era esperada e confirma os critérios de seleção dos grupos, em especial o grupo controle em que é esperado glicemia de jejum dentro dos parâmetros normais.

Para crianças e adolescentes, as concentrações da glicemia > 180 mg/dL, HbA1C > 7,5%, e 1,5AG < 10 µg/mL indicam glicêmico inadequado, o que caracteriza o grupo DM1 em estudo (PITKANEN, 1982; REWERS, M. J. *et al.*, 2014; ADA, 2016; SBD, 2016).

A baixa concentração de 1,5 anidroglicitol (1,5AG) no grupo DM1 em relação ao controle (2,9 µg/mL vs 30 µg/mL; P<0,001) sugere picos (ou excursões) glicêmicos frequentes e contínuos nos diabéticos superiores ao limiar renal (~180 mg/dL). Dessa forma, a medida em que ocorre o aumento da glicemia plasmática,

ocorre também a redução plasmática do 1,5AG. Isso explica a diferença significativa do 1,5 AG entre os grupos estudados (DUNGAN, 2008). Concentrações reduzidas de 1,5AG se encontram relacionadas com hiperglicemia pós-prandial, mesmo em indivíduos com bom controle glicêmico ($HbA1C < 8\%$) (WON *et al.*, 2009; MEHTA *et al.*, 2012). Desta forma, o uso do 1,5AG pode ser útil em pacientes com DM1 os quais frequentemente apresentam picos hiperglicêmicos por fazerem uso de insulina exógena, a qual não reproduz a homeostasia do sistema fisiológico normal (GREVEN *et al.*, 2010).

Uma pesquisa em 58 clínicas de diabetes nos Estados Unidos, onde foi avaliado o controle glicêmico de 3.272 crianças entre 6-17 anos (CAMPBELL *et al.*, 2014). O critério para excelente controle glicêmico foi $HbA1c < 7,5\%$, e de mau controle glicêmico $HbA1C > 9,0\%$. O resultado foi que 2.684 crianças apresentaram mal controle glicêmico, sendo 4,6 vezes maior do que o número de crianças com bom controle ($n=588$). Os autores observaram que a diferença educacional e sócio econômica dos pais estavam diretamente relacionados ao bom ou mau controle glicêmico. Também observaram que crianças com excelente controle glicêmico, utilizavam bomba de insulina, faziam controle glicêmico cinco ou mais vezes ao dia, monitoravam a glicemia antes das aplicações de insulina, aplicavam insulina basal antes das refeições e utilizavam uma dosagem média total de insulina menor do que as crianças que apresentaram controle glicêmico inadequado. E a frequência de cetoacidose foi mais comum no grupo com mau controle glicêmico, como esperado (CAMPBELL *et al.*, 2014).

O adequado controle glicêmico em crianças é particularmente difícil devido a capacidade limitada para fazer o autocuidado dependendo da idade (WHITE *et al.*, 2001). Quando se adiciona ao problema o tempo e o conhecimento limitados da maioria dos pais no acompanhamento diário das crianças com DM1, fica consignado as grandes dificuldades destes pacientes em atingir um controle glicêmico adequado (GALE, 2005). O controle glicêmico com metas adequadas e realistas é essencial para evitar, postergar ou minimizar as complicações associadas ao DM1 (WHITE *et al.*, 2001; GALE, 2005; CAMPBELL *et al.*, 2014; SBD, 2016).

5.2.2 Perfil Lipídico

O perfil lipídico corresponde a quantificação sérica do colesterol total, HDL-colesterol, LDL-colesterol e triglicérides. Crianças com DM1 que apresentam controle glicêmico pobre possuem propensão a desenvolver alterações lipídicas (JAMES; POMETTA, 1990; GUY *et al.*, 2009; XAVIER *et al.*, 2013).

Os resultados mostraram diferença significativa entre os grupos em todos os parâmetros de perfil lipídico ($P < 0,001$). As crianças com DM1 apresentaram concentrações maiores de colesterol total, HDL-colesterol e LDL-colesterol, bem como menor concentração de triglicérides quando comparado com o grupo controle (Tabela 2). Nossos resultados estão em concordância com outros trabalhos (GUY *et al.*, 2009; KRISHNAN *et al.*, 2011).

Diferentes estudos mostram que a terapia intensiva com insulina aumenta a concentração de colesterol total e HDL-colesterol o que justifica o observado no presente estudo (ROSENSTOCK; VEGA; RASKIN, 1988; BAGDADE; DUNN, 1992; FEITOSA *et al.*, 2009).

Quando existe uma ausência absoluta de insulina, a lipólise se apresenta aumentada. A elevação concomitante dos ácidos graxos livres e glicose promovem a formação das lipoproteínas de densidade muito baixa (VLDL). As VLDL se acumulam devido a redução da atividade de lipase lipoproteica, que depende da insulina, e acarreta em aumento de triglicérides e redução de HDL-colesterol (FEITOSA *et al.*, 2009). A alteração do metabolismo lipídico a partir da administração de insulina exógena é variável conforme o grau e forma de insulinização (ROSENSTOCK; VEGA; RASKIN, 1988; BAGDADE; DUNN, 1992). A administração por via subcutânea leva ao hiperinsulinismo que suprime a lipólise e ativa a lipase lipoproteica (LLP), reduzindo a glicemia e o substrato para a formação de VLDL, o que acarreta em aumento da concentração de HDL-colesterol (DURRINGTON *et al.*, 1982).

A dislipidemia típica é caracterizada por concentrações elevadas de colesterol total (≥ 170 mg/dL), LDL-colesterol (≥ 130 mg/dL) e triglicérides (≥ 130 mg/dL), bem como baixas concentrações de HDL colesterol (< 45 mg/dL). Os critérios de corte são aqueles apresentados para crianças preconizados pela V Diretriz Brasileira de Dislipidemias e prevenção da Aterosclerose (XAVIER *et al.*, 2013). Indivíduos com DM1 apresentam menor frequência de dislipidemia devido ao tratamento intensivo

com insulina; no entanto, isso não exclui a possibilidade de alterações lipídicas aterogênicas, especialmente em indivíduos com mau controle glicêmico (ARCANJO *et al.*, 2005; NATHAN *et al.*, 2005; FEITOSA *et al.*, 2009; GUY *et al.*, 2009).

Analisando em conjunto, os pacientes com DM1 em estudo não apresentam um perfil lipídico que favorece o maior risco aterogênico. Nossa hipótese é que, apesar do controle glicêmico inadequado do grupo DM1, a terapia em uso é suficiente para manter o perfil lipídico em concentrações associadas a um risco padrão, quanto à doença aterosclerótica.

5.2.3 Albumina e Proteínas Totais

Embora o valor de proteínas totais tenha sido significativamente maior no grupo com DM1 em relação ao grupo saudável ($P= 0,023$), tanto as concentrações de proteínas totais quanto de albumina se encontraram dentro do intervalo de referência (Tabela 2). A análise conjunta desses parâmetros sugere que não há sinais de perda proteica ou deficiência nutricional nos grupos analisados (SHIMADA, 2013).

5.2.4 Ureia e Creatinina

Ureia e creatinina são biomarcadores de função renal. Alterações nas concentrações de ureia associadas a alterações da creatinina caracterizam alteração na função de filtração renal, especialmente no DM1, onde a nefropatia é progressiva e associada ao mau controle glicêmico (SODRE; COSTA; LIMA, 2007).

As concentrações de ureia e creatinina foram significativamente diferentes entre os grupos ($P < 0,001$), apresentando-se mais elevadas no grupo DM1; porém dentro do intervalo de referência, sugerindo que os indivíduos estudados não apresentam lesão renal manifesta (Tabela 2).

5.2.5 Ácido Úrico

As concentrações de ácido úrico foram significativamente maiores ($P < 0,001$) no grupo controle em comparação com o grupo DM1 (Tabela 2). Em concordância com esse resultado foi observado relatos em outros trabalhos que o ácido úrico no

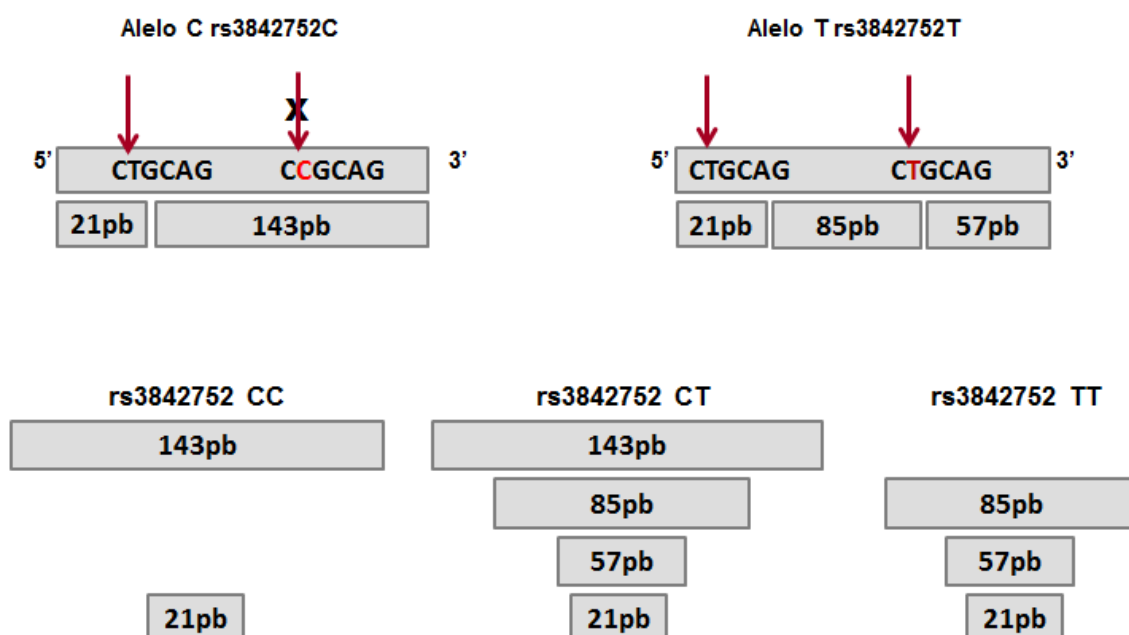
soro de indivíduos com DM1 é menor devido ao aumento da depuração de urato associado a glicosúria por mecanismo que ainda não elucidado (SHICHIRI; IWAMOTO; SHIIGAI, 1987; ESPARZA MARTIN; GARCIA NIETO, 2011).

5.3 ANÁLISES MOLECULARES

5.3.1 Polimorfismo rs3842752 do gene da Insulina

A genotipagem do polimorfismo rs3842752 no gene da Insulina foi feita por PCR-RFLP, onde o fragmento de 164 pb foi tratado com a enzima de restrição *Pst* I. A enzima reconhece a sequência CTGCA, assim só há restrição quando o alelo C está presente (Figura 13).

FIGURA 13 - FRAGMENTOS DE RESTRIÇÃO E GENÓTIPOS OBTIDOS PELA DIGESTÃO COM A ENZIMA *Pst* I PARA CARACTERIZAÇÃO DO POLIMORFISMO rs3842752.



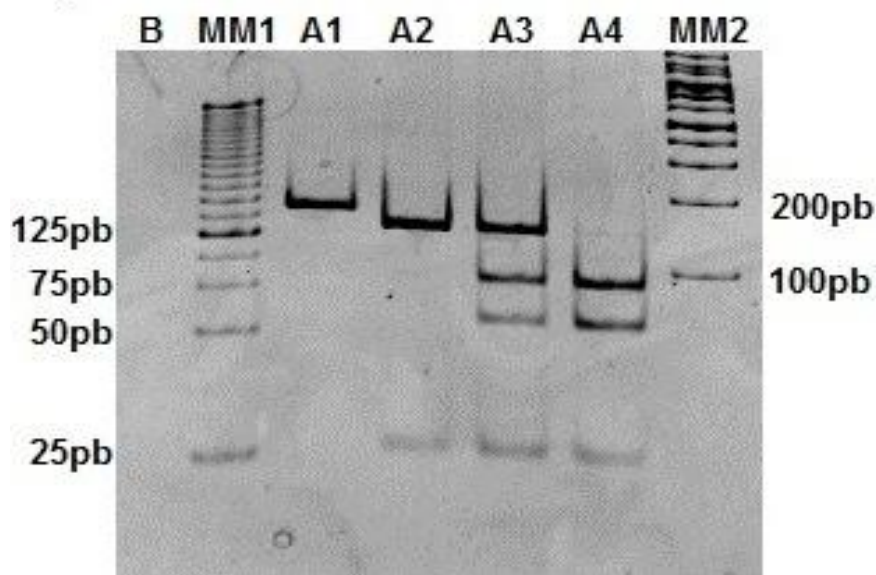
Quando o alelo C está presente no fragmento de 164 pb, a enzima de restrição *Pst* I faz a digestão apenas uma vez e são gerados os fragmentos de 143 pb e 21 pb. Quando o alelo T está presente a enzima também faz a digestão duas vezes gerando os fragmentos de 85 pb e 57 pb e 21 pb. Dessa forma o indivíduo homocigoto CC apresenta 2 fragmentos (143 pb e 21 pb), o heterocigoto CT apresenta 4 fragmentos (143 pb, 85 pb, 57 pb, e 21 pb), e o homocigoto TT 3 fragmentos (85 pb, 57 pb, e 21 pb).

Fonte: O autor (2016).

A figura 14 mostra o perfil eletroforético obtido da PCR-RFLP para o polimorfismo rs3842752 do gene da Insulina. A amostra A1 não foi incubada com a

enzima de restrição e possui o fragmento de 164 pb, constituindo o fragmento sem corte (controle da digestão). As amostras A2, A3 e A4, foram clivadas pela enzima de restrição *Pst*I gerando fragmentos compatíveis com os três genótipos esperados.

FIGURA 14 - PERFIL ELETROFORÉTICO DOS PRODUTOS DE RESTRIÇÃO PARA O POLIMORFISMO rs3842752 DO GENE DA INSULINA.



B: branco da reação, sem adição de amostra; MM1: marcador molecular de 25 pb; A1: amostra sem corte (164 pb); A2: homocigoto CC com 143 pb; A3: heterocigoto CT com três bandas, sendo elas de 143 pb, 85 pb e 57 pb; A4: homocigoto TT com uma banda de 85 pb e outra de 57 pb MM2: marcador molecular de 100 pb. Fonte: O autor (2016).

As frequências genóticas e alélicas do rs3842752 estão representadas na Tabela 3 e estão de acordo com o esperado pelo equilíbrio de Hardy-Weinberg em ambos os grupos. Este princípio estabelece que a variação genética de uma população permaneça constante de uma geração para a seguinte na ausência de fatores desestabilizantes. Desvios nesse equilíbrio poderiam indicar casamentos consanguíneos, estratificação populacional ou até problemas na genotipagem das amostras (RODRIGUEZ; GAUNT; DAY, 2009).

TABELA 3 - FREQUENCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS DO POLIMORFISMO rs3842752 C>T DO GENE DA INSULINA

Polimorfismos Modelos	Genótipos Alelos	Controle (n=168)	DM1 (n=148)	P
INS rs3842752				<0,001
Co-dominante*	C/C	121 (72,0)	133 (90,0)	
	C/T	41 (24,4)	14 (9,4)	
	T/T	6 (3,6)	1 (0,6)	
H-W (P)		0,729	0,798	
C-alelo (95%IC)		84,2 [80-88]	94,6 [92-97]	<0,001
T-alelo (95%IC)		15,8 [12-20]	5,4 [3-8]	<0,001
Dominante	*CC vs CT+TT	121 vs 47	133 vs 15	0,001
Recessivo	**TT vs CC + CT	6 vs 162	1 vs 147	0,081

Genótipos descritos em n %; 95% IC: Intervalo de confiança de 95%; P, probabilidade, teste do Chi-quadrado. Todos os grupos estão em equilíbrio de *Hardy-Weinberg* ($P>0,05$); * modelo dominante; ** modelo recessivo.

Fonte: O autor (2016).

No presente estudo o polimorfismo rs3842752 do gene da insulina apresentou associação com o DM1 com diferenças significativas entre as frequências genotípicas e alélicas entre os grupos (Tabela 3).

O alelo T, de menor frequência, relacionado a classe III do VNTR-INS, é um alelo de proteção para o DM1, com razão de chance (*odds ratio*) calculado para a frequência alélica de 0,31 (95% IC 0,17 – 0,55). Portanto, a presença do alelo T reduz o risco em cerca de um terço para o desenvolvimento do DM1 em crianças. Esse resultado está de acordo com o descrito na literatura, onde o alelo T foi associado a proteção para o DM1 (MARCHAND; POLYCHRONAKOS, 2007).

Já o alelo C rs3842752, que está relacionado a classe I do VNTR-INS, está associado a maior risco para o DM1, com razão de chance (*odds ratio*) calculado para a frequência alélica de 3,28 (95% IC 1,83 – 5,87).

O polimorfismo rs3842752 está em completo desequilíbrio de ligação com as classe I e III do VNTR-INS, reforçando a associação desta região altamente polimórfica com a predisposição e proteção ao DM1 já descrita em outras populações (PUGLIESE *et al.*, 1997; VAFIADIS *et al.*, 2001; RANI; SOOD; GOSWAMI, 2004; MARCHAND; POLYCHRONAKOS, 2007).

A tabela 4 apresenta a comparação das frequências genotípicas e alélicas para o polimorfismo rs3842752 com outras populações.

TABELA 4 - COMPARAÇÕES ENTRE AS FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS DO POLIMORFISMO rs3842752 DO GENE DA INSULINA COM DADOS DA LITERATURA.

Grupo étnico	Características	N	CC	Genótipo		Alelo
				(%)	(%)	(%)
				CT	TT	T
Euro-brasileiros (Presente estudo)	DM1	148	133	14	1	5,4
	Controle	168	121	41	6	15,8
Indiano (RANI; SOOD; GOSWAMI, 2004)	DM1	110	46	62	2	3,0
	Controle	95	8	77	10	5,1
Caucasiano (WANG <i>et al.</i> , 2007)	Câncer de mama	447	285	148	14	19,7
	Controle	447	259	173	15	22,7
HapMap-CEU	Europeus	226	130	82	14	24,3
HapMap-JPT	Japoneses	172	164	8	0	2,3
HapMap-YRI	Africanos	226	174	48	4	12,0
HapMap-MEX	Mexicanos	100	66	32	2	18,0

Destacadas em negrito as frequências para o alelo menos frequente (A) que são diferentes do Intervalo de Confiança (95%). CEU: residentes de Utah com ascendência do norte e oeste europeu. JPT: japoneses em Tóquio. YRI: africanos Yoruba em Ibadan, Nigéria. MEX: residentes em Los Angeles, com ascendência mexicana.

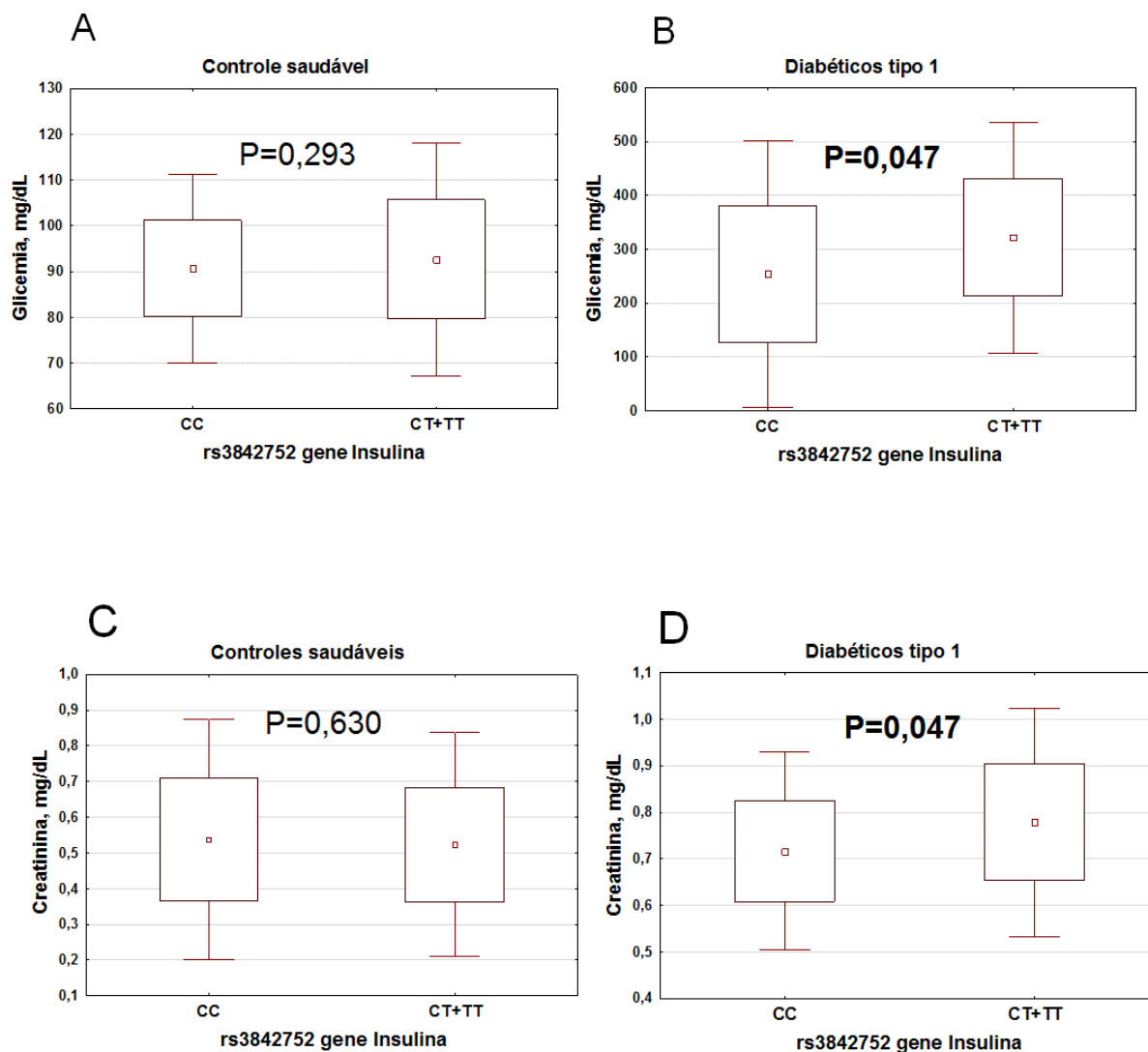
Considerando o intervalo de confiança (95%IC) para a frequência do alelo T [12 a 20%] em saudáveis (controle) encontrada em nosso estudo, esta foi similar à relatada para Africanos (12,0%) e Mexicanos (18,0%), em torno de três vezes maior que a encontrada em Indianos (5,1%) e 6,9 vezes maior que em Japoneses (2,3%).

Este estudo é o primeiro a relatar a frequência alélica e genotípica desse polimorfismo em euro-brasileiros com DM1. Em síntese, o rs3842752 foi associado a proteção ao DM1 em homozigotos TT e, predisposição ao DM1 em homozigotos CC (Tabela 3), sendo que as frequências alélicas apresentaram semelhanças com outras populações de origem Europeia e Caucasiana.

A busca de associação entre genótipos e biomarcadores foi realizado com análise de variância (*one-way ANOVA*), onde os genótipos foram classificados como 1= homozigoto frequente, 2= heterozigoto e 3= homozigoto raro. As análises de variância para este polimorfismo com os genótipos, concentrações séricas dos biomarcadores de ambos os grupos e dados clínicos das crianças com DM1 mostraram associação entre o rs3842752 do gene da insulina com as concentrações

de glicose e creatinina séricas. O alelo de proteção T mostrou associação com glicose ($P=0,047$) e creatinina ($P=0,047$) apenas no grupo com DM1 (Figura 15).

FIGURA 15 - ASSOCIAÇÃO DO POLIMORFISMO rs3842752 DO GENE DA INSULINA COM AS CONCENTRAÇÕES DE GLICEMIA E CREATININA PARA OS GRUPOS EM ESTUDO.



A e B: associação da glicemia sérica com os genótipos CC vs CT+TT dos grupos controle e DM1. C e D: associação da creatinina sérica com os genótipos CC vs CT+TT dos grupos controle e DM1. Os valores são a média (quadrado), 1-DP (caixas), e 2-DP (barras verticais); P probabilidade, teste t-Student (bidirecional).

A presença do alelo T foi associada a um aumento significativo ($P<0,05$) com glicose e creatinina em crianças com DM1. Não há dados para uma formulação de hipótese substanciada, nem mesmo confirmação com outros estudos publicados sobre este efeito do polimorfismo rs3842752 do gene da insulina. Uma hipótese teórica ou especulativa para a associação do alelo T com o aumento de glicose seria de que o alelo T poderia estar associado ao aumento de concentração de glicose

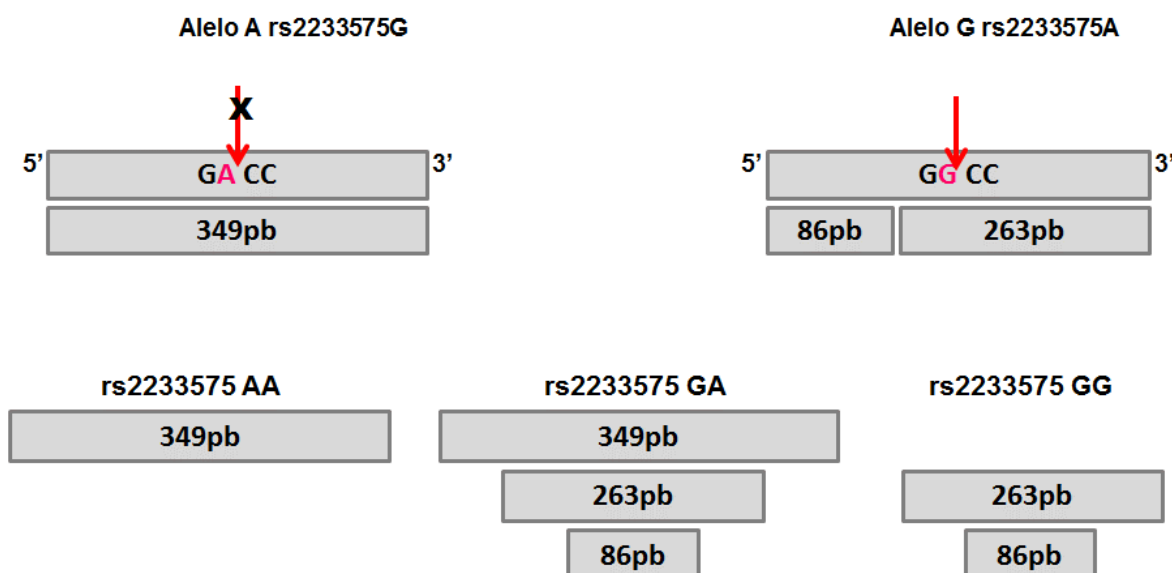
devido à baixa transcrição de insulina em células do pâncreas, uma vez que o alelo de classe III que se encontra em completo desequilíbrio de ligação com o alelo T tem sido associado com altos níveis de mRNA da insulina no timo e baixos níveis no pâncreas.

Não foram encontrados relatos na literatura de associação do rs3842752 com alterações nas concentrações de glicose e creatinina; portanto, mais estudos envolvendo indivíduos de diferentes etnias e com maior tamanho amostral são necessários para substanciar o significado destes resultados.

5.3.2 Polimorfismo rs2233575 do gene *PAX4* (*Paired Box4*)

A genotipagem do polimorfismo rs2233575 no gene *PAX4* foi feita por PCR-RFLP, onde o fragmento de 349 pb foi tratado com a enzima de restrição *Hae* III. A enzima reconhece a sequência GGCC, assim só há restrição quando o alelo G está presente (Figura 16).

FIGURA 16 - FRAGMENTOS DE RESTRIÇÃO E GENÓTIPOS OBTIDOS PELA DIGESTÃO COM A *Hae* III PARA O POLIMORFISMO rs2233575.

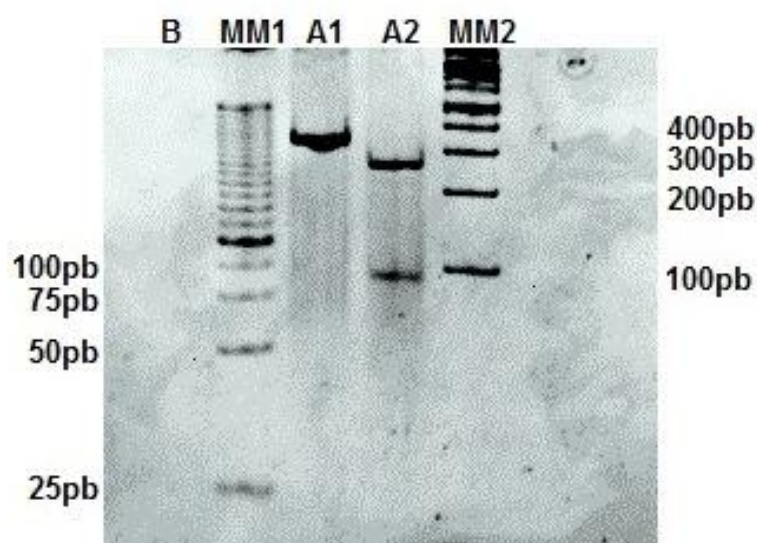


Na presença do alelo A não há clivagem com a enzima *Hae* III (amplicon 349 pb). Na presença do alelo G são gerados os fragmentos de 263 pb e 86 pb. Dessa forma o indivíduo homocigoto AA apresenta um fragmento de 349 pb correspondente ao fragmento gerado pela PCR; o heterocigoto GA apresenta 3 fragmentos (349 pb, 263 pb, e 86 pb) e o homocigoto GG 2 fragmentos (263 pb e 86 pb).

Fonte: O autor (2016).

É possível observar na figura 17 a amostra que sem corte, que não foi colocada em contato com enzima de restrição (A1), gerou um fragmento de 349 pb compatível com a massa molecular esperada. A amostra incubada com a enzima de restrição gerou um fragmento de 263 pb e outro de 86 pb, podendo ser caracterizada como homocigoto do tipo GG. Nesse polimorfismo foi observado apenas um genótipo em toda a população estudada.

FIGURA 17 - PERFIL ELETROFORÉTICO DOS PRODUTOS DE RESTRIÇÃO PARA O POLIMORFISMO rs2233575 DO GENE PAX4



B1: branco da reação, sem adição de amostra; MM1: marcador molecular de 25 pb; A1: amostra sem corte (amplicon 349 pb) genótipo AA; A2: amostra com corte pela enzima *Hae* III que gerou dois fragmentos, 263 pb e 86 pb caracterizando o genótipo GG; MM2: marcador molecular de 100 pb.

Fonte: O autor (2016).

A tabela 5 mostra os resultados das genotipagens das amostras para o polimorfismo rs2233575 do gene *PAX4* para os grupos controle e DM1.

TABELA 5 - FREQUENCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS DO POLIMORFISMO rs2233575 DO GENE *PAX4*.

Polimorfismos Modelos	Genótipos Alelos	Controle (n=168)	DM1 (n=148)	P
<i>PAX4</i> , rs2233575				
Co-dominante	G/G	168 (100)	148 (100)	
	G/A	0 (0)	0 (0)	
	A/A	0 (0)	0 (0)	
A-alelo (95%IC)		0	0	-

Genótipos descritos em n %; 95% IC: Intervalo de confiança de 95%; P, probabilidade, teste de Chi-quadrado.

Fonte: O autor (2016).

Não foi possível realizar análise estatística para comparação dos genótipos, e frequência alélica, uma vez que todos os indivíduos analisados, tanto do grupo controle como do grupo DM1, são homozigotos do tipo GG.

Foi encontrado apenas um estudo na literatura que analisou este polimorfismo em população com DM1. O estudo foi realizado com chineses, onde a frequência do alelo A em indivíduos saudáveis foi de 4,6%, e em indivíduos com DM1 foi de 7,1 %. Os autores encontraram associação entre o polimorfismo e a concentração de insulina plasmática no grupo controle. Indivíduos saudáveis que possuíam o genótipo AA e GA tiveram menor concentração de insulina plasmática do que os indivíduos com genótipo GG (ZHANG *et al.*, 2008).

A frequência do alelo A encontrada em nosso grupo controle foi semelhante à descrita em Europeus, Asiáticos e Africanos saudáveis (HAPMAP).

Em síntese, o polimorfismo rs2233575 do gene *PAX4* não foi associado ao DM1, e a frequência do alelo A observada na população em estudo foi similar à de outras populações (HAPMAP). Este polimorfismo não se mostrou de interesse para estudos de associação com DM1 crianças na população estudada.

5.3.3 Polimorfismo rs712701 do gene *PAX4*

A tabela 6 apresenta os resultados das genotipagens das amostras para o polimorfismo rs712701 G>T do gene *PAX4* para os grupos controle e DM1.

TABELA 6 - FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS DO POLIMORFISMO rs712701 DO GENE *PAX4*.

Polimorfismos Modelos	Genótipos Alelos	Controle (n=168)	DM1 (n=148)	P
<i>PAX4</i> , rs712701				0,598
Co-dominante	G/G	89 (52,9)	84 (56,8)	
	G/T	69 (41,1)	53 (35,8)	
	T/T	10 (6,0)	11 (7,4)	
H-W (P)		0,737	0,743	
T-alelo (95%IC)		26,5 [22-31]	25,3 [20-30]	0,742
Dominante	*GG vs GT+TT	89 vs 79	84 vs 64	0,500
Recessivo	**TT vs GG+GT	10 vs 158	11 vs 137	0,598

Genótipos descritos em n %; 95% IC: Intervalo de confiança de 95%; P, probabilidade, teste de Chi-quadrado. Todos os grupos estão em equilíbrio de *Hardy-Weinberg* ($P > 0,05$); * modelo dominante; ** modelo recessivo.

Fonte: O autor (2016).

A frequência genotípica do polimorfismo analisado apresentou-se de acordo com o esperado pelo equilíbrio de Hardy-Weinberg em ambos os grupos (Tabela 6). Os grupos não apresentaram diferença significativa na distribuição genotípica ($P = 0,598$) ou alélica ($P = 0,742$) (Tabela 6). Dessa forma, o polimorfismo rs712701 do gene *PAX4* não foi associado ao DM1 na amostra em estudo.

Em um estudo realizado com DM1 e controles nas populações Suíça e Alemã, os autores relataram uma associação entre o polimorfismo rs712701 com DM1. O genótipo homocigoto de maior frequência foi consideravelmente maior em indivíduos com DM1 comparado com saudáveis (76,7 vs 31,2% em Suíços) e (71,53 vs 33,9% em Alemães) (BIASON-LAUBER *et al.*, 2005). Contudo, a associação encontrada por BIASON-LAUBER e colaboradores (2005) foi contestada por Paterson (2005) e Maier (2005), uma vez que foi encontrado um erro no cálculo *Odds Ratio* e desequilíbrio no teste de Hardy-Weinberg, apesar de o mesmo não ter sido relatado no estudo original. Desvios no equilíbrio de Hardy-Weinberg não significam apenas uma questão teórica, podem sinalizar problemas importantes, como por exemplo, erro ou peculiaridades no conjunto de dados analisados (GYLVIN *et al.*, 2005). No entanto, é um teste frequentemente negligenciado, onde cerca de 40% dos estudos publicados não informam se as genotipagens estão dentro desse equilíbrio (MAIER *et al.*, 2005).

Estudos realizados no Reino Unido e na Irlanda do Norte não conseguiram replicar a associação entre o polimorfismo rs712701 e o DM1 encontrada por Biason-Lauber e colaboradores (2005) (MAIER *et al.*, 2005; MARTIN *et al.*, 2006).

A tabela 7 apresenta a comparação das frequências genotípicas e alélicas para o polimorfismo rs712701 com outras populações.

TABELA 7 - COMPARAÇÕES ENTRE AS FREQUENCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS DO POLIMORFISMO rs712701 DO GENE PAX4 COM DADOS DA LITERATURA

Grupo étnico	Características	N	GG	Genótipo		Alelo
				(%)	(%)	(%)
				GT	TT	T
Euro-brasileiros (Presente estudo)	DM1	148	84	53	11	25,3
	Controles	168	89	69	10	26,5
Chineses (ZHANG <i>et al.</i> , 2008)	DM1	134	22	76	36	55,2
	Controles	324	60	154	110	57,7
Finlandêses e Hungaros (HERMANN <i>et al.</i> , 2005)	DM1	309	159	131	19	27,3
	Controles	535	281	219	35	27,0
Caucasianos (Flórida) (GENG <i>et al.</i> , 2006)	DM1	322	203	103	16	21,0
	Controles	961	597	321	43	21,2
Caucasianos (Colorado) (GENG <i>et al.</i> , 2006)	DM1	630	382	221	27	21,8
	Controle	666	396	243	27	22,3
Tailandeses (SUJJITJOON <i>et al.</i> , 2016)	DM2	744	120	368	256	59,1
	Controles	561	93	276	192	58,8

Destacadas em negrito as frequências para o alelo menos frequente (A) que são diferentes do Intervalo de Confiança (95%).

A frequência do alelo T menos comum observada para o grupo controle (26,5%; 95%IC, 22-31%) foi similar a descrita por Hermann e colaboradores (2005) para Filandeses e Hungaros (27%) e por Geng e colaboradores (2006) para caucasiano (22,3%); e significativamente menor que a descrita por Zhang e colaboradores (2008) para Chineses (57,7%) e por Sujitjooon e colaboradores (2016) para Tailandeses (58,8%).

Para os indivíduos com DM1 a frequência do alelo T menos comum (25,3%) foi similar a descrita por Hermann e colaboradores (2005) para Filandeses e Hungaros (27,3%) e por Geng e colaboradores (2006) para caucasiano (21,0%); cerca de 2 vezes menor que a descrita por Zhang e colaboradores (2008) para

Chineses (55,2%); e menor que a descrita por Sujitjoo e colaboradores (2016) para Tailandeses com DM2 (59,1%).

Este estudo é o primeiro a relatar a frequência alélica e genotípica desse polimorfismo em euro-brasileiros com DM1. Em resumo, o rs712701 não foi associado ao DM1 em nosso estudo e nos estudos analisados (Tabela 7), sendo que as frequências alélicas apresentaram semelhanças com outras populações Caucasianas.

Análises de variância (ANOVA) realizadas para este polimorfismo na busca de associação dos genótipos com as concentrações séricas de biomarcadores e dados clínicos na amostra em estudo não revelaram nenhuma associação significativa.

Apesar de apenas 10% dos indivíduos apresentarem uma predisposição genética, e um histórico familiar positivo para a doença, parentes de primeiro grau de indivíduos com DM1A apresentam um risco 20 vezes maior de desenvolver a doença (TILLIL; KOBBERLING, 1987; WATKINS et al., 2014). Com o aumento na facilidade de triagem genética, é provável que a combinação de polimorfismos preditores em gene HLA e não-HLA será útil no refinamento de estimativa de risco para o desenvolvimento do DM1 em parente de pacientes DM1 bem como na população em geral (ATKINSON; EISENBARTH; MICHELS, 2014), além de permitir terapias direcionadas para aqueles que se encontram no período de latência de desenvolvimento do DM1A (ONENGUT-GUMUSCU; CONCANNON, 2002; WATKINS et al., 2014). O estudo e identificação sistemática de polimorfismos de DNA presentes no genoma humano, tem sido uma importante ferramenta na pesquisa, por apresentarem importantes subsídios para a elucidação de componentes genéticos da maioria dos fenótipos clínicos e não clínicos (GOLDSTEIN, D. B.; CAVALLERI, 2005; VILLASENOR; BENOIST; MATHIS, 2005). O grande desafio para esclarecer os componentes genéticos de doenças humanas complexas, como o DM1A, a partir da identificação polimorfismos, é que essas doenças possuem vários fatores envolvidos no seu desenvolvimento, como a própria variação genética e fatores ambientais. Assim, permanece a necessidade da exploração de marcadores não genéticos que possam trabalhar coerentemente com a informação genética para elucidar o momento de início do DM1 (ATKINSON; EISENBARTH; MICHELS, 2014).

Assim, o presente estudo buscou identificar potenciais alvos em termos de variabilidade genética e biomarcadores associados ao DM1 em uma população brasileira. O tamanho amostral, adequado para um estudo preliminar, necessita ser ampliado para a confirmação dos nossos resultados.

6 CONCLUSÕES

- O polimorfismo rs3842752 do gene da Insulina foi associado ao DM1. Portadores do alelo T apresentam risco diminuído em um terço (OR: 0,31, 95% IC 0,17 – 0,55) para o desenvolvimento do DM1.
- O alelo menos frequente do polimorfismo rs3842752 do gene da insulina (alelo T) foi associado com o aumento da concentração de glicose e creatinina no grupo com DM1.
- O polimorfismo rs2233575 do gene *Paired Box4* não serve como marcador porque a frequência genotípica e alélica é muito baixa
- O polimorfismo rs712701 do gene *Paired Box4* não foi associados ao DM1 na amostra em estudo.
- No geral as frequências dos alelos menos comuns nos polimorfismos estudados guardam similaridades com outras populações Europeias ou Caucasoides.
- O polimorfismo rs3842752, localizado na região 3'-UTR do gene da Insulina, associado com as classes I e III do VNTR-INS, tem potencial para ser utilizado como marcador de risco ou proteção no DM1 crianças.

REFERÊNCIAS

ADA. American Diabetes Association. Standards of Medical Care in Diabetes—2016. **Diabetes Care**. v. 39 Suppl 1, p. S1-112. 2016.

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.

AGARDH, C. D.; ROSEN, I.; RYDING, E. Persistent vegetative state with high cerebral blood flow following profound hypoglycemia. **Ann Neurol**. v. 14, n.4, p. 482-6. 1983.

AHMED, F.; KAZI, G.; KHAN, W. Type 1 diabetes mellitus presenting with diabetic ketoacidosis (DKA) in a neonate. **J Pak Med Assoc**. v. 66, n.8, p. 1026-8. 2016.

AKERBLOM, H. K.; KNIP, M. Putative environmental factors in Type 1 diabetes. **Diabetes Metab Rev**. v. 14, n.1, p. 31-67. 1998.

AKERBLOM, H. K. *et al.* Environmental factors in the etiology of type 1 diabetes. **Am J Med Genet**. v. 115, n.1, p. 18-29. 2002.

ALIZADEH, B. Z.; KOELEMAN, B. P. Genetic polymorphisms in susceptibility to Type 1 Diabetes. **Clin Chim Acta**. v. 387, n.1-2, p. 9-17. 2008.

ARCANJO, C. L. *et al.* [Lipid profile and anthropometrical evaluation in type 1 diabetes]. **Arq Bras Endocrinol Metabol**. v. 49, n.6, p. 951-8. 2005.

ATKINSON, M. A.; EISENBARTH, G. S. Type 1 diabetes: new perspectives on disease pathogenesis and treatment. **Lancet**. v. 358, n.9277, p. 221-9. 2001.

ATKINSON, M. A.; EISENBARTH, G. S.; MICHELS, A. W. Type 1 diabetes. **Lancet**. v. 383, n.9911, p. 69-82. 2014.

BAGDADE, J. D.; DUNN, F. L. Effects of insulin treatment on lipoprotein composition and function in patients with IDDM. **Diabetes**. v. 41 Suppl 2, p. 107-10. 1992.

BARKER, J. M. Clinical review: Type 1 diabetes-associated autoimmunity: natural history, genetic associations, and screening. **J Clin Endocrinol Metab**. v. 91, n.4, p. 1210-7. 2006.

BARKER, J. M. *et al.* Prediction of autoantibody positivity and progression to type 1 diabetes: Diabetes Autoimmunity Study in the Young (DAISY). **J Clin Endocrinol Metab**. v. 89, n.8, p. 3896-902. 2004.

BARRATT, B. J. *et al.* Remapping the insulin gene/IDDM2 locus in type 1 diabetes. **Diabetes**. v. 53, n.7, p. 1884-9. 2004.

BARROT, A.; HUISMAN, T. A.; PORETTI, A. Neuroimaging findings in acute pediatric diabetic ketoacidosis. **Neuroradiol J.** v. p. 2016.

BELL, G. I.; HORITA, S.; KARAM, J. H. A polymorphic locus near the human insulin gene is associated with insulin-dependent diabetes mellitus. **Diabetes.** v. 33, n.2, p. 176-83. 1984.

BELL, G. I. *et al.* Sequence of the human insulin gene. **Nature.** v. 284, n.5751, p. 26-32. 1980.

BENNETT, S. T. *et al.* Susceptibility to human type 1 diabetes at IDDM2 is determined by tandem repeat variation at the insulin gene minisatellite locus. **Nat Genet.** v. 9, n.3, p. 284-92. 1995.

BENNETT, S. T.; TODD, J. A. Human type 1 diabetes and the insulin gene: principles of mapping polygenes. **Annu Rev Genet.** v. 30, p. 343-70. 1996.

BIASON-LAUBER, A. *et al.* Association of childhood type 1 diabetes mellitus with a variant of PAX4: possible link to beta cell regenerative capacity. **Diabetologia.** v. 48, n.5, p. 900-5. 2005.

BONIFACIO, E.; ZIEGLER, A. G. Advances in the prediction and natural history of type 1 diabetes. **Endocrinol Metab Clin North Am.** v. 39, n.3, p. 513-25. 2010.

BROOKS-WORRELL, B.; PALMER, J. P. Is diabetes mellitus a continuous spectrum? **Clin Chem.** v. 57, n.2, p. 158-61. 2011.

BROWNLEE, M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. **Nature.** v. 414, n.6865, p. 813-20. 2001.

BRUN, T.; GAUTHIER, B. R. A focus on the role of Pax4 in mature pancreatic islet beta-cell expansion and survival in health and disease. **J Mol Endocrinol.** v. 40, n.2, p. 37-45. 2008.

BUNN, H. F. Nonenzymatic glycosylation of protein: relevance to diabetes. **Am J Med.** v. 70, n.2, p. 325-30. 1981.

CAMPBELL, M. S. *et al.* A contrast between children and adolescents with excellent and poor control: the T1D Exchange clinic registry experience. **Pediatr Diabetes.** v. 15, n.2, p. 110-7. 2014.

CHATENOUD, L.; BLUESTONE, J. A. CD3-specific antibodies: a portal to the treatment of autoimmunity. **Nat Rev Immunol.** v. 7, n.8, p. 622-32. 2007.

CHERN, M. M.; ANDERSON, V. E.; BARBOSA, J. Empirical risk for insulin-dependent diabetes (IDD) in sibs. Further definition of genetic heterogeneity. **Diabetes.** v. 31, n.12, p. 1115-8. 1982.

CHUNG, H. R. *et al.* The association of variable number of tandem repeats of the insulin gene with susceptibility to type 1 diabetes among Korean subjects. **Diabetes Metab Res Rev.** v. 26, n.6, p. 474-80. 2010.

CONCANNON, P.; RICH, S. S.; NEPOM, G. T. Genetics of type 1A diabetes. **N Engl J Med.** v. 360, n.16, p. 1646-54. 2009.

COOKE, D. W.; PLOTNICK, L. Type 1 diabetes mellitus in pediatrics. **Pediatr Rev.** v. 29, n.11, p. 374-84; quiz 385. 2008.

CRAIG, M. E. *et al.* ISPAD Clinical Practice Consensus Guidelines 2014. Definition, epidemiology, and classification of diabetes in children and adolescents. **Pediatr Diabetes.** v. 15 Suppl 20, p. 4-17. 2014.

CUCCA, F. *et al.* A correlation between the relative predisposition of MHC class II alleles to type 1 diabetes and the structure of their proteins. **Hum Mol Genet.** v. 10, n.19, p. 2025-37. 2001.

DAHER, G. A Brazilian Experience with a Diabetes Program for Patient Safety in a Tertiary Hospital. **Journal of Diabetes & Metabolism.** v. 06, n.06, p. 2015.

DUNGAN, K. M. 1,5-anhydroglucitol (GlycoMark) as a marker of short-term glycemic control and glycemic excursions. **Expert Rev Mol Diagn.** v. 8, n.1, p. 9-19. 2008.

DUNGER, D. B. *et al.* European Society for Paediatric Endocrinology/Lawson Wilkins Pediatric Endocrine Society consensus statement on diabetic ketoacidosis in children and adolescents. **Pediatrics.** v. 113, n.2, p. e133-40. 2004.

DURINOVIC-BELLO, I. *et al.* Insulin gene VNTR genotype associates with frequency and phenotype of the autoimmune response to proinsulin. **Genes Immun.** v. 11, n.2, p. 188-93. 2010.

DURRINGTON, P. N. *et al.* Effects of insulin and glucose on very low density lipoprotein triglyceride secretion by cultured rat hepatocytes. **J Clin Invest.** v. 70, n.1, p. 63-73. 1982.

EDGE, J. A. *et al.* The risk and outcome of cerebral oedema developing during diabetic ketoacidosis. **Arch Dis Child.** v. 85, n.1, p. 16-22. 2001.

ERGUN-LONGMIRE, B.; MACLAREN, N. K. Management of Type-1 and Type-2 Diabetes Mellitus in Children. In: DE GROOT, L. J.; BECK-PECCOZ, P.; CHROUSOS, G.; DUNGAN, K.; GROSSMAN, A.; HERSHMAN, J. M.; KOCH, C.; MCLACHLAN, R.; NEW, M.; REBAR, R.; SINGER, F.; VINIK, A.; WEICKERT, M. O. **Endotext.** South Dartmouth (MA), 2000

ERLICH, H. *et al.* HLA DR-DQ haplotypes and genotypes and type 1 diabetes risk: analysis of the type 1 diabetes genetics consortium families. **Diabetes.** v. 57, n.4, p. 1084-92. 2008.

ERLICH, H. A. *et al.* HLA class II alleles and susceptibility and resistance to insulin dependent diabetes mellitus in Mexican-American families. **Nat Genet.** v. 3, n.4, p. 358-64. 1993.

ESPARZA MARTIN, N.; GARCIA NIETO, V. Hypouricemia and tubular transport of uric acid. **Nefrologia.** v. 31, n.1, p. 44-50. 2011.

FAJANS, S. S.; BELL, G. I.; POLONSKY, K. S. Molecular mechanisms and clinical pathophysiology of maturity-onset diabetes of the young. **N Engl J Med.** v. 345, n.13, p. 971-80. 2001.

FEITOSA, A. C. *et al.* [Lipid transfer to HDL in women with type 1 diabetes]. **Arq Bras Endocrinol Metabol.** v. 53, n.1, p. 95-101. 2009.

FLORYS, B. *et al.* [Prevalence of chronic diabetes complications depending on the method of insulin therapy in children and adolescents with type 1 diabetes]. **Endokrynol Diabetol Chor Przemiany Materii Wieku Rozw.** v. 10, n.1, p. 31-9. 2004.

FORBES, J. M.; COOPER, M. E. Mechanisms of diabetic complications. **Physiol Rev.** v. 93, n.1, p. 137-88. 2013.

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

FURUSYO, N.; HAYASHI, J. Glycated albumin and diabetes mellitus. **Biochim Biophys Acta.** v. 1830, n.12, p. 5509-14. 2013.

GAGE, B. K.; BAKER, R. K.; KIEFFER, T. J. Overexpression of PAX4 reduces glucagon expression in differentiating hESCs. **Islets.** v. 6, n.2, p. e29236. 2014.

GALE, E. A. Type 1 diabetes in the young: the harvest of sorrow goes on. **Diabetologia.** v. 48, n.8, p. 1435-8. 2005.

GAN, M. J.; ALBANESE-O'NEILL, A.; HALLER, M. J. Type 1 diabetes: current concepts in epidemiology, pathophysiology, clinical care, and research. **Curr Probl Pediatr Adolesc Health Care.** v. 42, n.10, p. 269-91. 2012.

GENG, D. G. *et al.* Comment on: Bason-Lauber A, Boehm B, Lang-Muritano M, et al (2005) Association of childhood type 1 diabetes mellitus with a variant of PAX4: possible link to beta cell regenerative capacity. *Diabetologia* 48:900-905. **Diabetologia.** v. 49, n.1, p. 215-6. 2006.

GILLESPIE, K. M.; GALE, E. A.; BINGLEY, P. J. High familial risk and genetic susceptibility in early onset childhood diabetes. **Diabetes.** v. 51, n.1, p. 210-4. 2002.

GOLDSTEIN, D. E. *et al.* Tests of glycemia in diabetes. **Diabetes Care.** v. 27, n.7, p. 1761-73. 2004.

GOLDSTEIN, D. E. *et al.* Tests of glycemia in diabetes. **Diabetes Care**. v. 26 Suppl 1, p. S106-8. 2003.

GREVEN, W. L. *et al.* Glycemic variability in inadequately controlled type 1 diabetes and type 2 diabetes on intensive insulin therapy: a cross-sectional, observational study. **Diabetes Technol Ther**. v. 12, n.9, p. 695-9. 2010.

GUARIGUATA, L. By the numbers: new estimates from the IDF Diabetes Atlas Update for 2012. **Diabetes Res Clin Pract**. v. 98, n.3, p. 524-5. 2012.

GUARIGUATA, L. *et al.* Global estimates of diabetes prevalence for 2013 and projections for 2035. **Diabetes Res Clin Pract**. v. 103, n.2, p. 137-49. 2014.

GUTHROW, C. E. *et al.* Enhanced nonenzymatic glycosylation of human serum albumin in diabetes mellitus. **Proc Natl Acad Sci U S A**. v. 76, n.9, p. 4258-61. 1979.

GUY, J. *et al.* Lipid and lipoprotein profiles in youth with and without type 1 diabetes: the SEARCH for Diabetes in Youth case-control study. **Diabetes Care**. v. 32, n.3, p. 416-20. 2009.

GYLVIN, T. *et al.* To: Biason-Lauber A, Boehm B, Lang-Muritano M *et al.* (2005) association of childhood type 1 diabetes mellitus with a variant of PAX4: possible link to beta cell regenerative capacity. *Diabetologia* 48:900-905. **Diabetologia**. v. 48, n.10, p. 2183-4. 2005.

HALLER, M. J.; ATKINSON, M. A.; SCHATZ, D. Type 1 diabetes mellitus: etiology, presentation, and management. **Pediatr Clin North Am**. v. 52, n.6, p. 1553-78. 2005.

HAMALAINEN, A. M.; KNIP, M. Autoimmunity and familial risk of type 1 diabetes. **Curr Diab Rep**. v. 2, n.4, p. 347-53. 2002.

HAPMAP. **INTERNATIONAL HAPMAP PROJECT - Genotype and allele frequencies - HapMap**. Disponível em: <<http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov/>>. Acesso em: 10/10/2016.

HARJUTSALO, V.; SJOBERG, L.; TUOMILEHTO, J. Time trends in the incidence of type 1 diabetes in Finnish children: a cohort study. **Lancet**. v. 371, n.9626, p. 1777-82. 2008.

HARVEY, R. A.; FERRIER, D. R. **Bioquímica Ilustrada**. Porto Alegre: Artmed, 2012.

HERMANN, R. *et al.* Lack of association of PAX4 gene with type 1 diabetes in the Finnish and Hungarian populations. **Diabetes**. v. 54, n.9, p. 2816-9. 2005.

HEROLD, K. C. *et al.* Type 1 diabetes: translating mechanistic observations into effective clinical outcomes. **Nat Rev Immunol**. v. 13, n.4, p. 243-56. 2013.

HOLM, P. *et al.* Interaction and association analysis of a type 1 diabetes susceptibility locus on chromosome 5q11-q13 and the 7q32 chromosomal region in Scandinavian families. **Diabetes**. v. 53, n.6, p. 1584-91. 2004.

HORTON, R. *et al.* Gene map of the extended human MHC. **Nat Rev Genet**. v. 5, n.12, p. 889-99. 2004.

HOWSON, J. M. *et al.* Genetic analysis of adult-onset autoimmune diabetes. **Diabetes**. v. 60, n.10, p. 2645-53. 2011.

HUMMEL, M. *et al.* Brief communication: early appearance of islet autoantibodies predicts childhood type 1 diabetes in offspring of diabetic parents. **Ann Intern Med**. v. 140, n.11, p. 882-6. 2004.

IDF. INTERNATIONAL DIABETES-FEDERATION - IDF Diabetes Atlas Seventh Edition. 2015.

JAHROMI, M. M.; EISENBARTH, G. S. Cellular and molecular pathogenesis of type 1A diabetes. **Cell Mol Life Sci**. v. 64, n.7-8, p. 865-72. 2007.

JAMES, R. W.; POMETTA, D. Differences in lipoprotein subfraction composition and distribution between type I diabetic men and control subjects. **Diabetes**. v. 39, n.10, p. 1158-64. 1990.

JEFFREYS, A. J.; WILSON, V.; THEIN, S. L. Hypervariable 'minisatellite' regions in human DNA. **Nature**. v. 314, n.6006, p. 67-73. 1985.

JERSEY, R. C. O. N. **The protein: Insulin**. Disponível em: <<http://phobos.ramapo.edu/~pbagga/cmb/ben/gene.htm>>. Acesso em: 14/02.

JULIER, C. *et al.* Insulin-IGF2 region on chromosome 11p encodes a gene implicated in HLA-DR4-dependent diabetes susceptibility. **Nature**. v. 354, n.6349, p. 155-9. 1991.

KANTAROVA, D.; BUC, M. Genetic susceptibility to type 1 diabetes mellitus in humans. **Physiol Res**. v. 56, n.3, p. 255-66. 2007.

KELLY, M. A. *et al.* Molecular aspects of type 1 diabetes. **Mol Pathol**. v. 56, n.1, p. 1-10. 2003.

KERNER, W.; BRUCKEL, J. Definition, classification and diagnosis of diabetes mellitus. **Exp Clin Endocrinol Diabetes**. v. 122, n.7, p. 384-6. 2014.

KHARROUBI, A. T.; DARWISH, H. M. Diabetes mellitus: The epidemic of the century. **World J Diabetes**. v. 6, n.6, p. 850-67. 2015.

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.

KNIP, M.; VIRTANEN, S. M.; AKERBLOM, H. K. Infant feeding and the risk of type 1 diabetes. **Am J Clin Nutr.** v. 91, n.5, p. 1506S-1513S. 2010.

KOELEMAN, B. P. *et al.* Genotype effects and epistasis in type 1 diabetes and HLA-DQ trans dimer associations with disease. **Genes Immun.** v. 5, n.5, p. 381-8. 2004.

KRISHNAN, S. *et al.* Impact of type 1 diabetes and body weight status on cardiovascular risk factors in adolescent children. **J Clin Hypertens (Greenwich).** v. 13, n.5, p. 351-6. 2011.

KULMALA, P. Prediabetes in children: natural history, diagnosis, and preventive strategies. **Paediatr Drugs.** v. 5, n.4, p. 211-21. 2003.

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, D. *et al.* PAX genes: roles in development, pathophysiology, and cancer. **Biochem Pharmacol.** v. 73, n.1, p. 1-14. 2007.

LEE, J. E. Alternative biomarkers for assessing glycemic control in diabetes: fructosamine, glycated albumin, and 1,5-anhydroglucitol. **Ann Pediatr Endocrinol Metab.** v. 20, n.2, p. 74-8. 2015.

LU, L. *et al.* Association of serum levels of glycated albumin, C-reactive protein and tumor necrosis factor-alpha with the severity of coronary artery disease and renal impairment in patients with type 2 diabetes mellitus. **Clin Biochem.** v. 40, n.11, p. 810-6. 2007.

MACIAS GOMEZ, J.; MARTINEZ Y MARTNEZ, R. [Diabetic ketoacidosis in children and adolescents. Clinical and therapeutical considerations in 25 severe cases]. **Bol Med Hosp Infant Mex.** v. 34, n.5, p. 1089-103. 1977.

MACLAREN, N.; ATKINSON, M. Is insulin-dependent diabetes mellitus environmentally induced? **N Engl J Med.** v. 327, n.5, p. 348-9. 1992.

MAIER, L. M. *et al.* Comment to: Biason-Lauber A, Boehm B, Lang-Muritano M *et al.* (2005) association of childhood type 1 diabetes mellitus with a variant of PAX4: possible link to beta cell regenerative capacity. *Diabetologia* 48:900-905. **Diabetologia.** v. 48, n.10, p. 2180-2; author reply 2185-6. 2005.

MAIER, L. M.; WICKER, L. S. Genetic susceptibility to type 1 diabetes. **Curr Opin Immunol.** v. 17, n.6, p. 601-8. 2005.

MALIK, F. S.; TAPLIN, C. E. Insulin therapy in children and adolescents with type 1 diabetes. **Paediatr Drugs.** v. 16, n.2, p. 141-50. 2014.

MANTOVANI, R. M.; MANTOVANI, L. M.; DIAS, V. M. Thyroid autoimmunity in children and adolescents with type 1 diabetes mellitus: prevalence and risk factors. **J Pediatr Endocrinol Metab.** v. 20, n.6, p. 669-75. 2007.

MARCHAND, L.; POLYCHRONAKOS, C. Evaluation of polymorphic splicing in the mechanism of the association of the insulin gene with diabetes. **Diabetes**. v. 56, n.3, p. 709-13. 2007.

MARTIN, R. J. L. *et al.* The PAX4 gene variant A1168C is not associated with early onset Type 1 diabetes in a UK population. **Diabetic Medicine**. v. 23, p. 924-928. 2006.

MARUICHI, M. D. *et al.* Characteristics of children and adolescents with type 1 Diabetes Mellitus at diagnosis. Comparison of two periods ten years apart in a University Hospital. **Arq Med Hosp Fac Cienc Med Santa Casa São Paulo**. v. 57, n.2, p. 55-58. 2012.

MEHTA, S. N. *et al.* Evaluation of 1,5-anhydroglucitol, hemoglobin A1c, and glucose levels in youth and young adults with type 1 diabetes and healthy controls. **Pediatr Diabetes**. v. 13, n.3, p. 278-84. 2012.

MIJOVIC, C. H. *et al.* HLA-DQA1 and -DQB1 alleles associated with genetic susceptibility to IDDM in a black population. **Diabetes**. v. 40, n.6, p. 748-53. 1991.

NAKA, Y. *et al.* RAGE axis: Animal models and novel insights into the vascular complications of diabetes. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**. v. 24, n.8, p. 1342-9. 2004.

NAPOLITANO, T. *et al.* Pax4 acts as a key player in pancreas development and plasticity. **Semin Cell Dev Biol**. v. 44, p. 107-14. 2015.

NATHAN, D. M. *et al.* Intensive diabetes treatment and cardiovascular disease in patients with type 1 diabetes. **N Engl J Med**. v. 353, n.25, p. 2643-53. 2005.

NERY, M. [Hypoglycemia as a limiting factor in the management of type 1 diabetes]. **Arq Bras Endocrinol Metabol**. v. 52, n.2, p. 288-98. 2008.

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

NOBLE, J. A. *et al.* The role of HLA class II genes in insulin-dependent diabetes mellitus: molecular analysis of 180 Caucasian, multiplex families. **Am J Hum Genet**. v. 59, n.5, p. 1134-48. 1996.

OHKUBO, Y. *et al.* Intensive insulin therapy prevents the progression of diabetic microvascular complications in Japanese patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus: a randomized prospective 6-year study. **Diabetes Res Clin Pract**. v. 28, n.2, p. 103-17. 1995.

ORBAN, T. *et al.* Pancreatic islet autoantibodies as predictors of type 1 diabetes in the Diabetes Prevention Trial-Type 1. **Diabetes Care**. v. 32, n.12, p. 2269-74. 2009.

OWENS, D. *et al.* Blood glucose self-monitoring in type 1 and type 2 diabetes: reaching a multidisciplinary consensus. **Diabetes Prim Care**. v. 6, n.1, p. 1-9. 2004.

PANAGIOTAKOS, D. B. *et al.* The relationship between dietary habits, blood glucose and insulin levels among people without cardiovascular disease and type 2 diabetes; the ATTICA study. **Rev Diabet Stud**. v. 2, n.4, p. 208-15. 2005.

PARK, Y. S. *et al.* Combinations of HLA DR and DQ molecules determine the susceptibility to insulin-dependent diabetes mellitus in Koreans. **Hum Immunol**. v. 59, n.12, p. 794-801. 1998.

PATERSON, A. D. To: Bason-Lauber A, Boehm B, Lang-Muritano M *et al.* (2005) association of childhood type 1 diabetes mellitus with a variant of PAX4: possible link to beta cell regenerative capacity. *Diabetologia* 48:900-905. **Diabetologia**. v. 48, n.10, p. 2179. 2005.

PIHOKER, C. *et al.* Autoantibodies in diabetes. **Diabetes**. v. 54 Suppl 2, p. S52-61. 2005.

PIRES, A. C.; CHACRA, A. R. [Insulin therapy for type 1 diabetes mellitus: past and present]. **Arq Bras Endocrinol Metabol**. v. 52, n.2, p. 268-78. 2008.

PIROT, P.; CARDOZO, A. K.; EIZIRIK, D. L. Mediators and mechanisms of pancreatic beta-cell death in type 1 diabetes. **Arq Bras Endocrinol Metabol**. v. 52, n.2, p. 156-65. 2008.

PITKANEN, E. Serum 1,5-anhydroglucitol in normal subjects and in patients with insulin-dependent diabetes mellitus. **Scand J Clin Lab Invest**. v. 42, n.5, p. 445-8. 1982.

PIVA, J. P. *et al.* Current perspectives for treating children with diabetic ketoacidosis. **J Pediatr (Rio J)**. v. 83, n.5 Suppl, p. S119-27. 2007.

POLYCHRONAKOS, C.; LI, Q. Understanding type 1 diabetes through genetics: advances and prospects. **Nat Rev Genet**. v. 12, n.11, p. 781-92. 2011.

PUGLIESE, A. The insulin gene in type 1 diabetes. **IUBMB Life**. v. 57, n.7, p. 463-8. 2005.

PUGLIESE, A. Pathogenesis of type 1 diabetes: genetics. **International Diabetes Monitor**. v. 22, n.3, p. 101 - 111. 2010.

PUGLIESE, A. *et al.* Self-antigen-presenting cells expressing diabetes-associated autoantigens exist in both thymus and peripheral lymphoid organs. **J Clin Invest**. v. 107, n.5, p. 555-64. 2001.

PUGLIESE, A.; MICELI, D. The insulin gene in diabetes. **Diabetes Metab Res Rev**. v. 18, n.1, p. 13-25. 2002.

PUGLIESE, A. *et al.* The insulin gene is transcribed in the human thymus and transcription levels correlated with allelic variation at the INS VNTR-IDDM2 susceptibility locus for type 1 diabetes. **Nat Genet.** v. 15, n.3, p. 293-7. 1997.

RAGHAV, A.; AHMAD, J. Glycated serum albumin: a potential disease marker and an intermediate index of diabetes control. **Diabetes Metab Syndr.** v. 8, n.4, p. 245-51. 2014.

RAGHUPATHY, P. Diabetic ketoacidosis in children and adolescents. **Indian J Endocrinol Metab.** v. 19, n.Suppl 1, p. S55-7. 2015.

RANI, R.; SOOD, A.; GOSWAMI, R. Molecular basis of predisposition to develop type 1 diabetes mellitus in North Indians. **Tissue Antigens.** v. 64, n.2, p. 145-55. 2004.

REDONDO, M. J.; FAIN, P. R.; EISENBARTH, G. S. Genetics of type 1A diabetes. **Recent Prog Horm Res.** v. 56, p. 69-89. 2001.

REICHARD, P.; NILSSON, B. Y.; ROSENQVIST, U. The effect of long-term intensified insulin treatment on the development of microvascular complications of diabetes mellitus. **N Engl J Med.** v. 329, n.5, p. 304-9. 1993.

RENARD, E. Monitoring glycemic control: the importance of self-monitoring of blood glucose. **Am J Med.** v. 118, n.Suppl 9A, p. 12S-19S. 2005.

REWERS, A. *et al.* Predictors of acute complications in children with type 1 diabetes. **JAMA.** v. 287, n.19, p. 2511-8. 2002.

REWERS, M. J. *et al.* ISPAD Clinical Practice Consensus Guidelines 2014. Assessment and monitoring of glycemic control in children and adolescents with diabetes. **Pediatr Diabetes.** v. 15 Suppl 20, p. 102-14. 2014.

RISCH, N.; MERIKANGAS, K. The future of genetic studies of complex human diseases. **Science.** v. 273, n.5281, p. 1516-7. 1996.

ROBERTS, M. D.; SLOVER, R. H.; CHASE, H. P. Diabetic ketoacidosis with intracerebral complications. **Pediatr Diabetes.** v. 2, n.3, p. 109-14. 2001.

ROCHE, E. F. *et al.* Clinical presentation of type 1 diabetes. **Pediatr Diabetes.** v. 6, n.2, p. 75-8. 2005.

RODRIGUEZ, S.; GAUNT, T. R.; DAY, I. N. Hardy-Weinberg equilibrium testing of biological ascertainment for Mendelian randomization studies. **Am J Epidemiol.** v. 169, n.4, p. 505-14. 2009.

RONNINGEN, K. S. *et al.* Distribution of HLA-DRB1, -DQA1 and -DQB1 alleles and DQA1-DQB1 genotypes among Norwegian patients with insulin-dependent diabetes mellitus. **Tissue Antigens.** v. 37, n.3, p. 105-11. 1991.

ROSENBLOOM, A. L. Intracerebral crises during treatment of diabetic ketoacidosis. **Diabetes Care**. v. 13, n.1, p. 22-33. 1990.

ROSENSTOCK, J.; VEGA, G. L.; RASKIN, P. Effect of intensive diabetes treatment on low-density lipoprotein apolipoprotein B kinetics in type I diabetes. **Diabetes**. v. 37, n.4, p. 393-7. 1988.

RUBINOW, K. B.; HIRSCH, I. B. Reexamining metrics for glucose control. **JAMA**. v. 305, n.11, p. 1132-3. 2011.

RUBIO CABEZAS, O.; ARGENTE OLIVER, J. [Diabetes mellitus in children and adolescents: chronic complications and associated diseases]. **An Pediatr (Barc)**. v. 66, n.3, p. 282-9. 2007.

SACKS, D. B. *et al.* Guidelines and recommendations for laboratory analysis in the diagnosis and management of diabetes mellitus. **Clin Chem**. v. 57, n.6, p. e1-e47. 2011.

SAKURAI, S. *et al.* The AGE-RAGE system and diabetic nephropathy. **J Am Soc Nephrol**. v. 14, n.8 Suppl 3, p. S259-63. 2003.

SBD. SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES - Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes. v. p. 2016.

SCHIPPER, R. F. *et al.* HLA class II associations with Type 1 diabetes mellitus: a multivariate approach. **Tissue Antigens**. v. 57, n.2, p. 144-50. 2001.

SCHMID, H. New options in insulin therapy. **J Pediatr (Rio J)**. v. 83, n.5 Suppl, p. S146-55. 2007.

SELVIN, E. *et al.* Nontraditional markers of glycemia: associations with microvascular conditions. **Diabetes Care**. v. 34, n.4, p. 960-7. 2011.

SERVITJA, J. M.; FERRER, J. Transcriptional networks controlling pancreatic development and beta cell function. **Diabetologia**. v. 47, n.4, p. 597-613. 2004.

SESTERHEIM, P.; SAI TOVITCH, D.; STAUB, H. L. Type 1 diabetes mellitus: multifactors that confer susceptibility to the autoimmune pathogenesis. **Scientia Medica**. v. 17, n.4, p. 212-217. 2007.

SHAW, J. E.; SICREE, R. A.; ZIMMET, P. Z. Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030. **Diabetes Res Clin Pract**. v. 87, n.1, p. 4-14. 2010.

SHE, J. X. Susceptibility to type I diabetes: HLA-DQ and DR revisited. **Immunol Today**. v. 17, n.7, p. 323-9. 1996.

SHICHIRI, M.; IWAMOTO, H.; SHIIGAI, T. Diabetic renal hypouricemia. **Arch Intern Med**. v. 147, n.2, p. 225-8. 1987.

SHIMADA, C. S. **Patologia Clínica e Onco-hematologia**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2013.

SILVA, M. E.; MORY, D.; DAVINI, E. [Genetic and humoral autoimmunity markers of type 1 diabetes: from theory to practice]. **Arq Bras Endocrinol Metabol**. v. 52, n.2, p. 166-80. 2008.

SINGAL, D. P.; BLAJCHMAN, M. A. Histocompatibility (HL-A) antigens, lymphocytotoxic antibodies and tissue antibodies in patients with diabetes mellitus. **Diabetes**. v. 22, n.6, p. 429-32. 1973.

SODRE, F. L.; COSTA, J. C. B.; LIMA, J. C. C. Evaluation of renal function and damage: a laboratorial challenge. **J Bras Patol Med Lab**. v. 43, n.5, p. 329-337. 2007.

STAHL, M. *et al.* Can capillary whole blood glucose and venous plasma glucose measurements be used interchangeably in diagnosis of diabetes mellitus? **Scand J Clin Lab Invest**. v. 62, n.2, p. 159-66. 2002.

STECK, A. K. *et al.* Effects of non-HLA gene polymorphisms on development of islet autoimmunity and type 1 diabetes in a population with high-risk HLA-DR,DQ genotypes. **Diabetes**. v. 61, n.3, p. 753-8. 2012.

STERN, D. M. *et al.* Receptor for advanced glycation endproducts (RAGE) and the complications of diabetes. **Ageing Res Rev**. v. 1, n.1, p. 1-15. 2002.

STRATTON, I. M. *et al.* Association of glycaemia with macrovascular and microvascular complications of type 2 diabetes (UKPDS 35): prospective observational study. **BMJ**. v. 321, n.7258, p. 405-12. 2000.

SUJJITJOON, J. *et al.* PAX4 R192H and P321H polymorphisms in type 2 diabetes and their functional defects. **J Hum Genet**. v. 61, n.11, p. 943-949. 2016.

SURANI, S. *et al.* Effect of diabetes mellitus on sleep quality. **World J Diabetes**. v. 6, n.6, p. 868-73. 2015.

TAHARA, Y.; SHIMA, K. The response of GHb to stepwise plasma glucose change over time in diabetic patients. **Diabetes Care**. v. 16, n.9, p. 1313-4. 1993.

THE DIABETES CONTROL AND COMPLICATIONS TRIAL RESEARCH GROUP. Effect of intensive therapy on the development and progression of diabetic nephropathy in the Diabetes Control and Complications Trial. The Diabetes Control and Complications (DCCT) Research Group. **Kidney Int**. v. 47, n.6, p. 1703-20. 1995.

THORSBY, E.; UNDLIEN, D. The HLA associated predisposition to type 1 diabetes and other autoimmune diseases. **J Pediatr Endocrinol Metab**. v. 9 Suppl 1, p. 75-88. 1996.

TODD, J. A.; WICKER, L. S. Genetic protection from the inflammatory disease type 1 diabetes in humans and animal models. **Immunity**. v. 15, n.3, p. 387-95. 2001.

TRIPLITT, C. *et al.* Classification of Diabetes Mellitus. In: DE GROOT, L. J.; BECK-PECCOZ, P.; CHROUSOS, G.; DUNGAN, K.; GROSSMAN, A.; HERSHMAN, J. M.; KOCH, C.; MCLACHLAN, R.; NEW, M.; REBAR, R.; SINGER, F.; VINIK, A.; WEICKERT, M. O. **Endotext**. South Dartmouth (MA), 2000

TUOMILEHTO, J. A glucose tolerance test is important for clinical practice. **Diabetes Care**. v. 25, n.10, p. 1880 - 1882. 2002.

UNITED-KINGDOM-PROSPECTIVE-DIABETES-STUDY. Effect of intensive blood-glucose control with metformin on complications in overweight patients with type 2 diabetes (UKPDS 34). UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. **Lancet**. v. 352, n.9131, p. 854-65. 1998.

USHER-SMITH, J. A. *et al.* The pathway to diagnosis of type 1 diabetes in children: a questionnaire study. **BMJ Open**. v. 5, n.3, p. e006470. 2015.

VAFIADIS, P. *et al.* Class III alleles of the variable number of tandem repeat insulin polymorphism associated with silencing of thymic insulin predispose to type 1 diabetes. **J Clin Endocrinol Metab**. v. 86, n.8, p. 3705-10. 2001.

VAN BELLE, T. L.; COPPIETERS, K. T.; VON HERRATH, M. G. Type 1 diabetes: etiology, immunology, and therapeutic strategies. **Physiol Rev**. v. 91, n.1, p. 79-118. 2011.

VANELLI, M. *et al.* Effectiveness of a prevention program for diabetic ketoacidosis in children. An 8-year study in schools and private practices. **Diabetes Care**. v. 22, n.1, p. 7-9. 1999.

WALLBERG, M.; COOKE, A. Immune mechanisms in type 1 diabetes. **Trends Immunol**. v. 34, n.12, p. 583-91. 2013.

WANG, Y. *et al.* Nested case-control study of energy regulation candidate gene single nucleotide polymorphisms and breast cancer. **Anticancer Res**. v. 27, n.1B, p. 589-93. 2007.

WANG, Y. *et al.* Limitations of the current world health organization growth references for children and adolescents. **Food Nutr Bull**. v. 27, n.4 Suppl Growth Standard, p. S175-88. 2006.

WATERLOW, J. C. *et al.* The presentation and use of height and weight data for comparing the nutritional status of groups of children under the age of 10 years. **Bull World Health Organ**. v. 55, n.4, p. 489-98. 1977.

WATKINS, R. A. *et al.* Established and emerging biomarkers for the prediction of type 1 diabetes: a systematic review. **Transl Res**. v. 164, n.2, p. 110-21. 2014.

WAUTIER, J. L.; SCHMIDT, A. M. Protein glycation: a firm link to endothelial cell dysfunction. **Circ Res**. v. 95, n.3, p. 233-8. 2004.

WEETS, I. *et al.* The incidence of type 1 diabetes in the age group 0-39 years has not increased in Antwerp (Belgium) between 1989 and 2000: evidence for earlier disease manifestation. **Diabetes Care**. v. 25, n.5, p. 840-6. 2002.

WENZLAU, J. M. *et al.* The cation efflux transporter ZnT8 (Slc30A8) is a major autoantigen in human type 1 diabetes. **Proc Natl Acad Sci U S A**. v. 104, n.43, p. 17040-5. 2007.

WHITE, N. H. *et al.* Beneficial effects of intensive therapy of diabetes during adolescence: outcomes after the conclusion of the Diabetes Control and Complications Trial (DCCT). **J Pediatr**. v. 139, n.6, p. 804-12. 2001.

WHITING, D. R. *et al.* IDF diabetes atlas: global estimates of the prevalence of diabetes for 2011 and 2030. **Diabetes Res Clin Pract**. v. 94, n.3, p. 311-21. 2011.

WHO. Multinational Project for Childhood Diabetes Group. Familial insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM) epidemiology: standardization of data for the DIAMOND Project. . **Bull World Health Organ**. v. 69, n.6, p. 767-77. 1991.

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

WINTER, W. E.; SCHATZ, D. A. Autoimmune markers in diabetes. **Clin Chem**. v. 57, n.2, p. 168-75. 2011.

WOLFSDORF, J.; GLASER, N.; SPERLING, M. A. Diabetic ketoacidosis in infants, children, and adolescents: A consensus statement from the American Diabetes Association. **Diabetes Care**. v. 29, n.5, p. 1150-9. 2006.

WON, J. C. *et al.* 1,5-Anhydroglucitol reflects postprandial hyperglycemia and a decreased insulinogenic index, even in subjects with prediabetes and well-controlled type 2 diabetes. **Diabetes Res Clin Pract**. v. 84, n.1, p. 51-7. 2009.

XAVIER, H. T. *et al.* [V Brazilian Guidelines on Dyslipidemias and Prevention of Atherosclerosis]. **Arq Bras Cardiol**. v. 101, n.4 Suppl 1, p. 1-20. 2013.

YISAHAK, S. F. *et al.* Diabetes in North America and the Caribbean: an update. **Diabetes Res Clin Pract**. v. 103, n.2, p. 223-30. 2014.

YONEKURA, H. *et al.* Roles of the receptor for advanced glycation endproducts in diabetes-induced vascular injury. **J Pharmacol Sci**. v. 97, n.3, p. 305-11. 2005.

YOON, J. W.; JUN, H. S. Autoimmune destruction of pancreatic beta cells. **Am J Ther**. v. 12, n.6, p. 580-91. 2005.

ZHANG, Y. *et al.* The association of the PAX4 gene with type 1 diabetes in Han Chinese. **Diabetes Res Clin Pract**. v. 81, n.3, p. 365-9. 2008.

ZIEGLER, A. G. *et al.* Autoantibody appearance and risk for development of childhood diabetes in offspring of parents with type 1 diabetes: the 2-year analysis of the German BABYDIAB Study. **Diabetes**. v. 48, n.3, p. 460-8. 1999.

ANEXOS

ANEXO 1 – PARECER DO COMITE DE ETICA

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



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: AVALIAÇÃO DE BIOMARCADORES LABORATORIAIS E MOLECULARES EM CRIANÇAS E ADOLESCENTES SAUDÁVEIS E PORTADORAS DE DIABETES

Pesquisador: Fabiane Gomes de Moraes Rego

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 24676613.6.0000.0102

Instituição Proponente: Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas

Patrocinador Principal: Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 655.477

Data da Relatoria: 21/05/2014

Apresentação do Projeto:

AVALIAÇÃO DE BIOMARCADORES LABORATORIAIS E MOLECULARES EM CRIANÇAS E ADOLESCENTES SAUDÁVEIS E PORTADORAS DE DIABETES

Autora: Dra Fabiane Gomes de Moraes Rego. **Equipe da Pesquisa:** Aline Borsato Hauser, Geraldo Picheth, Leticia Carneiro Gomes, Railson Henneberg, SUZANA NESI FRANÇA.

Objetivo da Pesquisa:

Dosar os biomarcadores de controle glicêmico com ênfase no 1,5 anidroglicitol e albumina glicada, perfil lipídico, função renal, função hepática, função hematológica, metabolismo do cálcio e vitamina D e anticorpos relacionados ao desenvolvimento do diabetes em crianças e adolescentes de escolas Estaduais de Curitiba e pacientes diabéticos e seus familiares atendidos pelo Hospital de Clínicas da UFPR.

Determinar as frequências genotípicas e alélicas de polimorfismos genéticos relacionados ao diabetes e suas complicações. Associar as variações genéticas estudadas com os biomarcadores em estudo, com ênfase nos associados ao controle glicêmico e no perfil lipídico. Buscar novos biomarcadores laboratoriais ou moleculares para o diagnóstico precoce do diabetes em crianças e adolescentes.

Endereço: Rua Padre Camargo, 280

Bairro: 2º 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 -



Continuação do Parecer: 655.477

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

O projeto em questão prevê riscos para os pacientes como algum desconforto inerente à punção venosa, bem como riscos associados a coleta da amostra de sangue como hematomas e irritações locais e o desconforto em coletar os dados antropométricos das crianças e adolescentes que serão o grupo controle. Para os pesquisadores, não haverá riscos visto que os procedimentos analíticos a serem empregados são de domínio dos mesmos. Os procedimentos técnicos que serão empregados estão bem estabelecidos na literatura e não há relatos de riscos bem como dano ao meio ambiente. Há descrição de que os materiais utilizados no projeto serão armazenados, lavados e/ou descartados seguindo as normas vigentes de biossegurança e proteção ao meio ambiente. O projeto apresenta benefícios que permitirão a avaliação da utilização de biomarcadores que não estão contemplados na rotina laboratorial, permitindo novas perspectivas de acurácia no diagnóstico, monitoramento e conhecimento das características do diabetes no Brasil, beneficiando os afetados pela patologia, os profissionais de saúde envolvidos no processo de tratamento e o sistema público de saúde.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa apresenta cunho relevante haja visto que o diabetes é uma patologia que afeta 8% da população e principalmente o controle glicêmico é difícil principalmente em crianças e adolescentes. A assertiva de que é necessário estudar e avaliar múltiplos e diferentes marcadores em conjunto para a extração de elementos representativos que possam ser utilizados como biomarcadores de risco e ou proteção associados ao diabetes são o ponto central desta pesquisa. Portanto, novos biomarcadores proteicos e genômicos, associados a marcadores clássicos do diabetes como glicemia de jejum, glicemia pós-prandial, 1,5 anidroglicitol (1,5AG), albumina glicada (AG), insulina e hemoglobina glicada, são elementos centrais nessa pesquisa.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os termos exigidos por este CEP foram anexados. anexada a declaração final modelo CONEP, onde o Coparticipante declara ter lido e concordar com o Parecer deste CEP/SD, lembrando que a Resolução em vigor é a 466/2012/CNS, em substituição a 196/96/CNS.

Recomendações:

Solicitamos que sejam apresentados a este CEP, relatórios semestrais sobre o andamento da pesquisa, bem como informações relativas às modificações do protocolo, cancelamento,

Endereço: Rua Padre Camargo, 280

Bairro: 2º 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 -



Continuação do Parecer: 655.477

encerramento e destino dos conhecimentos obtidos, através da Plataforma Brasil - no modo: NOTIFICAÇÃO.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

É obrigatório retirar na secretaria do CEP/SD uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido com carimbo onde constará data de aprovação por este CEP/SD, sendo este modelo reproduzido para aplicar junto ao participante da pesquisa.

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)

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

O TCLE deverá conter duas vias, uma ficará com o pesquisador e uma cópia ficará com o participante da pesquisa, tanto o participante como o pesquisador deverão rubricar todas as páginas do TCLE, opondo assinaturas na última página do referido Termo (Carta Circular nº. 003/2011CONEP/CNS).

CURITIBA, 21 de Maio de 2014

Assinado por:
IDA CRISTINA GUBERT
(Coordenador)

Endereço: Rua Padre Camargo, 280

Bairro: 2º andar

CEP: 80.060-240

UF: PR

Município: CURITIBA

Telefone: (41)3360-7259

E-mail: cometica.saude@ufpr.br

ANEXO 2 – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE) DE DIABÉTICOS A CIMA DE 12 ANOS.

TERMO DE ASSENTIMENTO INFORMADO LIVRE E ESCLARECIDO

Adolescentes maiores de 12 anos e menores de 18 anos

Título do Projeto: AVALIAÇÃO DE BIOMARCADORES LABORATORIAIS E MOLECULARES EM CRIANÇAS E ADOLESCENTES SAUDÁVEIS E PORTADORAS DE DIABETES MELLITUS

Responsável: Fabiane Gomes de Moraes Rego (orientador)

Local da Pesquisa: Laboratório de Bioquímica Clínica da Universidade Federal do Paraná.

Endereço: Rua Prefeito Lothário Meissner, 632 – Campus Jardim Botânico, Curitiba – PR

O que significa assentimento?

O assentimento significa que você concorda em fazer parte de um grupo de adolescentes, da sua faixa de idade (entre 12 e 18 anos), para participar de uma pesquisa. Serão respeitados seus direitos e você receberá todas as informações por mais simples que possam parecer.

Pode ser que este documento denominado TERMO DE ASSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO contenha palavras que você não entenda. Por favor, peça ao responsável pela pesquisa ou à equipe do estudo para explicar qualquer palavra ou informação que você não entenda claramente.

Informação ao Paciente:

O objetivo desta pesquisa é estudar o perfil bioquímico e molecular de adolescentes das escolas de Curitiba visando uma melhor compreensão de doenças que possam afetar estes. Pesquisas como esta podem ajudar no desenvolvimento de novas metodologias de diagnóstico e tratamento.

Caso você participe da pesquisa, os dados pessoais biométricos (como idade, peso, altura) serão necessários. Além disso, será necessário coletar uma amostra do sangue sua.

O sangue será coletado durante a visita na sua escola pela nossa equipe de pesquisadores, com necessidade de coleta específica para a pesquisa.

É possível que você experimente algum desconforto, principalmente relacionado à agulhada da coleta de sangue.

Alguns riscos relacionados ao estudo podem ser: dor e aparecimento de pequenos hematomas no local da coleta de sangue, que desaparecerão com o tempo.

Aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do Setor de Ciências da Saúde/UFPR.
Parecer CEP/SD-PB.nº 655/477
na data de 21/05/2014

Rubricas:
Sujeito da Pesquisa e /ou responsável legal _____
Pesquisador Responsável ou quem aplicou o TCLE _____

Os benefícios esperados com essa pesquisa são: 1) melhor conhecimento do perfil bioquímico e molecular dos adolescentes 2) a expectativa do desenvolvimento de novos ensaios laboratoriais que permitam um melhor diagnóstico e tratamento de doenças ligadas a adolescentes. No entanto, nem sempre ele será diretamente beneficiado com o resultado da pesquisa, mas poderá contribuir para o avanço científico.

Caso você autorize, seu sangue será armazenado corretamente e poderá ser utilizado em outras pesquisas semelhantes a esta, que buscam aumentar o conhecimento sobre doenças e melhorar a qualidade de vida dos pacientes. Toda nova pesquisa a ser feita com o seu material armazenado, será submetida à apreciação do Comitê de Ética em Pesquisa, e a cada nova pesquisa, o sujeito será contatado para consentir novo uso de sua amostra, o qual será formalizado através de um TCLE específico.

Sua amostra de sangue será armazenada por até 10 anos, mas poderá ser descartada devido à inadequação da amostra por critérios de qualidade. Neste caso, a amostra será colocada em recipientes apropriados e será descartada seguindo normas bem definidas, sem causar riscos a saúde de ninguém, tampouco ao meio ambiente.

A sua participação neste estudo é voluntária e se você não quiser mais fazer parte da pesquisa poderá desistir a qualquer momento e solicitar que lhe devolvam o termo de consentimento livre e esclarecido assinado.

As informações relacionadas ao estudo poderão ser conhecidas por pessoas autorizadas. No entanto, se qualquer informação for divulgada em relatório ou publicação, isto será feito através de códigos, para que a sua identidade seja preservada e seja mantida a confidencialidade.

As despesas necessárias para a realização da pesquisa (exames laboratoriais) não são de sua responsabilidade e pela sua participação no estudo você não receberá qualquer valor em dinheiro. Você terá a garantia de que problemas como: hematomas e dor no local da punção para coleta do sangue decorrentes do estudo serão tratados pela própria equipe de pesquisadores

Quando os resultados forem publicados, não aparecerá seu nome, e sim um código.

Rubricas: Sujeito da Pesquisa e /ou responsável legal _____ Pesquisador Responsável ou quem aplicou o TCLE _____

Contato para dúvidas

Se você ou os responsáveis por você tiver(em) dúvidas com relação ao estudo, direitos do participante, ou no caso de riscos relacionados ao estudo, você deve contatar o(a) Investigador(a) do estudo ou membro de sua equipe Os pesquisadores responsáveis por este estudo são: Fabiane Gomes de Moraes Rego (rego@ufpr.br), Geraldo Picheth (geraldopicheth@ufpr.br) e Aline Borsato Hauser (alinehauser@ufpr.br); farmacêuticos, poderão ser contatados

Aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa
em Seres Humanos do Setor de Ciências da
Saúde/UFPR.
Parecer CEP/SD-PB.nº 655477
na data de 21/05/2014

de segunda a sexta-feira, das 14 às 18h, no Laboratório de Bioquímica Clínica da Universidade Federal do Paraná, sito à Rua Prefeito Lothário Meissner, 632 – Jardim Botânico, Curitiba – PR, ou pelo telefone (41) 3360-4068, para esclarecer eventuais dúvidas que você possa ter e fornecer-lhe as informações que queira, antes, durante ou depois de encerrado o estudo.

Se você tiver dúvidas sobre seus direitos como um paciente de pesquisa, você pode contatar o Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos (CEP) do Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná, pelo telefone 3360-7251. O CEP é constituído por um grupo de profissionais de diversas áreas, com conhecimentos científicos e não científicos que realizam a revisão ética inicial e continuada da pesquisa para mantê-lo seguro e proteger seus direitos.

DECLARAÇÃO DE ASSENTIMENTO DO PACIENTE:

Eu li e discuti com o investigador responsável pelo presente estudo os detalhes descritos neste documento. Entendo que eu sou livre para aceitar ou recusar, e que posso interromper a minha participação a qualquer momento sem dar uma razão. Eu concordo que os dados coletados para o estudo sejam usados para o propósito acima descrito.

Eu entendi a informação apresentada neste TERMO DE ASSENTIMENTO. Eu tive a oportunidade para fazer perguntas e todas as minhas perguntas foram respondidas.

Eu receberei uma cópia assinada e datada deste Documento DE ASSENTIMENTO INFORMADO.

NOME DO ADOLESCENTE	ASSINATURA	DATA
---------------------	------------	------

NOME DO INVESTIGADOR	ASSINATURA	DATA
----------------------	------------	------

Comitê de ética em Pesquisa do Setor de Ciências da Saúde da UFPR
Rua Pe. Camargo, 280 – 2º andar – Alto da Glória – Curitiba-PR – CEP:80060-240
Tel (41)3360-7259 - e-mail: cometica.saude@ufpr.br

Aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa
em Seres Humanos do Setor de Ciências da
Saúde/UFPR.
Parecer CEP/SD-PB.nº 655477
na data de 21/05/2014

**ANEXO 3 - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)
PARA ASSINATURA DOS PAIS**

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Nós, Fabiane Gomes de Moraes Rego, Dr Suzana Nesi França e Geraldo Picheth, pesquisadores da Universidade Federal do Paraná, estamos convidando o seu filho menor de idade, a participar de um estudo intitulado "AVALIAÇÃO DE BIOMARCADORES LABORATORIAIS E MOLECULARES EM CRIANÇAS E ADOLESCENTES SAUDÁVEIS E PORTADORAS DE *DIABETES MELLITUS*", que vai avaliar o perfil bioquímico e molecular do seu filho. É através de pesquisas como esta que ocorrem os avanços na medicina e sua participação é de fundamental importância.

- a) O objetivo desta pesquisa é estudar os aspectos genéticos envolvidos com o diabetes para uma melhor compreensão desta doença. Pesquisas como esta podem ajudar no desenvolvimento de novas metodologias de diagnóstico e tratamento.
- b) Caso você autorize a participação de seu filho na pesquisa, os dados pessoais biométricos (como idade, peso, altura) serão necessários. Além disso, será necessário coletar uma amostra do sangue dele.
- c) O sangue do seu filho será coletado durante a consulta de rotina do irmão (diabético tipo 1) pela equipe de coletadores do Serviço de Endocrinologia Pediátrica e Adolescência do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná, com a necessidade de coleta específica para a pesquisa.
- d) É possível que ele experimente algum desconforto, principalmente relacionado à agulhada da coleta de sangue.
- e) Alguns riscos relacionados ao estudo podem ser: dor e aparecimento de pequenos hematomas no local da coleta de sangue, que serão totalmente avaliados e se necessário tratados sob a responsabilidade da equipe de coletadores do Hospital de Clínicas ou pela Dr Suzana Nesi França.
- f) Os benefícios esperados com essa pesquisa são: 1) melhor conhecimento do perfil bioquímico e molecular dos adolescentes 2) a expectativa do desenvolvimento de novos ensaios laboratoriais que permitam um melhor diagnóstico e tratamento de doenças ligadas a adolescentes. No entanto, nem sempre ele será diretamente beneficiado com o resultado da pesquisa, mas poderá contribuir para o avanço científico.
- g) Caso você autorize, o sangue de seu filho menor de idade será armazenado corretamente e poderá ser utilizado em outras pesquisas semelhantes a esta, que buscam aumentar o conhecimento sobre doenças e melhorar a qualidade de vida dos pacientes. Toda nova pesquisa a ser feita com o material dele armazenado, será submetida à apreciação do Comitê de Ética em Pesquisa, e a cada nova pesquisa, o sujeito será contatado para consentir novo uso de sua amostra, o qual será formalizado através de um TCLE específico.
- h) A amostra de sangue de seu filho menor de idade será armazenada por até 10 anos, mas poderá ser descartada devido à inadequação da amostra por critérios de qualidade. Neste caso, a amostra será colocada em recipientes apropriados e será descartada seguindo normas bem definidas, sem causar riscos a saúde de ninguém, tampouco ao meio ambiente.

<p>Rubricas: Sujeito da Pesquisa e /ou responsável legal _____ Pesquisador Responsável _____ Orientador _____ Orientado _____</p>
--

<p>Comitê de Ética em Pesquisa do Setor de Ciências da Saúde da UFPR Telefone: (41) 3360-7259 e-mail: cometica.saude@ufpr.br</p>

- i) Os pesquisadores responsáveis por este estudo: Fabiane Gomes de Moraes Rego (rego@ufpr.br), Geraldo Picheth (geraldopicheth@ufpr.br) e Dr Suzana Nesi França (snesifranca@hotmail.com); os farmacêuticos poderão ser contatados de segunda a sexta-feira, das 14 às 18 h, no Laboratório de Bioquímica Clínica da Universidade Federal do Paraná, sito à Rua Prefeito Lothário Meissner, 632 – Jardim Botânico, Curitiba – PR, ou pelo telefone (41) 3360-4068, e a médica poderá ser contatada de segunda a sexta-feira, das 14 às 18 h, no consultório Endocrinologia Pediátrica e Adolescente na rua Bruno Filgueira 2495 – Centro, Curitiba – PR, ou pelo telefone (41) 3339-0370, para esclarecer eventuais dúvidas que você possa ter e fornecer-lhe as informações que queira, antes, durante ou depois de encerrado o estudo.
- j) A participação do seu filho neste estudo é voluntária e se você não quiser mais que ele faça parte da pesquisa poderá desistir a qualquer momento e solicitar que lhe devolvam o termo de consentimento livre e esclarecido assinado.
- k) As informações relacionadas ao estudo poderão ser conhecidas por pessoas autorizadas. No entanto, se qualquer informação for divulgada em relatório ou publicação, isto será feito através de códigos, para que a identidade dele seja preservada e seja mantida a confidencialidade.
- l) As despesas necessárias para a realização da pesquisa (exames laboratoriais) não são de sua responsabilidade e pela participação do seu filho no estudo ele não receberá qualquer valor em dinheiro. Ele terá a garantia de que problemas como: hematomas e dor no local da punção para coleta do sangue decorrentes do estudo serão tratados pela próprio equipe de pesquisadores.
- m) Quando os resultados forem publicados, não aparecerá o nome dele, e sim um código.

Eu, _____ li esse termo de consentimento e compreendi a natureza e objetivo do estudo do qual concordei que meu filho participe. A explicação que recebi menciona os riscos e benefícios. Eu entendi que sou livre para interromper a participação do meu filho a qualquer momento sem justificar minha decisão e sem que esta decisão afete o tratamento dele. Eu entendi o que o meu filho não pode fazer durante a pesquisa e fui informado que meu filho será atendido sem custos se ele apresentar algum problema dos relacionados no item "e".

Eu concordo voluntariamente na participação do meu filho neste estudo, e autorizo a coleta, o armazenamento e guarda do sangue dele para futuras pesquisas, sabendo que a cada nova pesquisa, serei contatado(a) para consentir ou não o novo uso da amostra do meu filho, o qual será formalizado através de um TCLE específico.

(Assinatura do sujeito de pesquisa ou responsável legal)

Local e data

Assinatura do Pesquisador

<p>Comitê de Ética em Pesquisa do Setor de Ciências da Saúde da UFPR Telefone: (41) 3360-7259 e-mail: cometica.saude@ufpr.br</p>
--

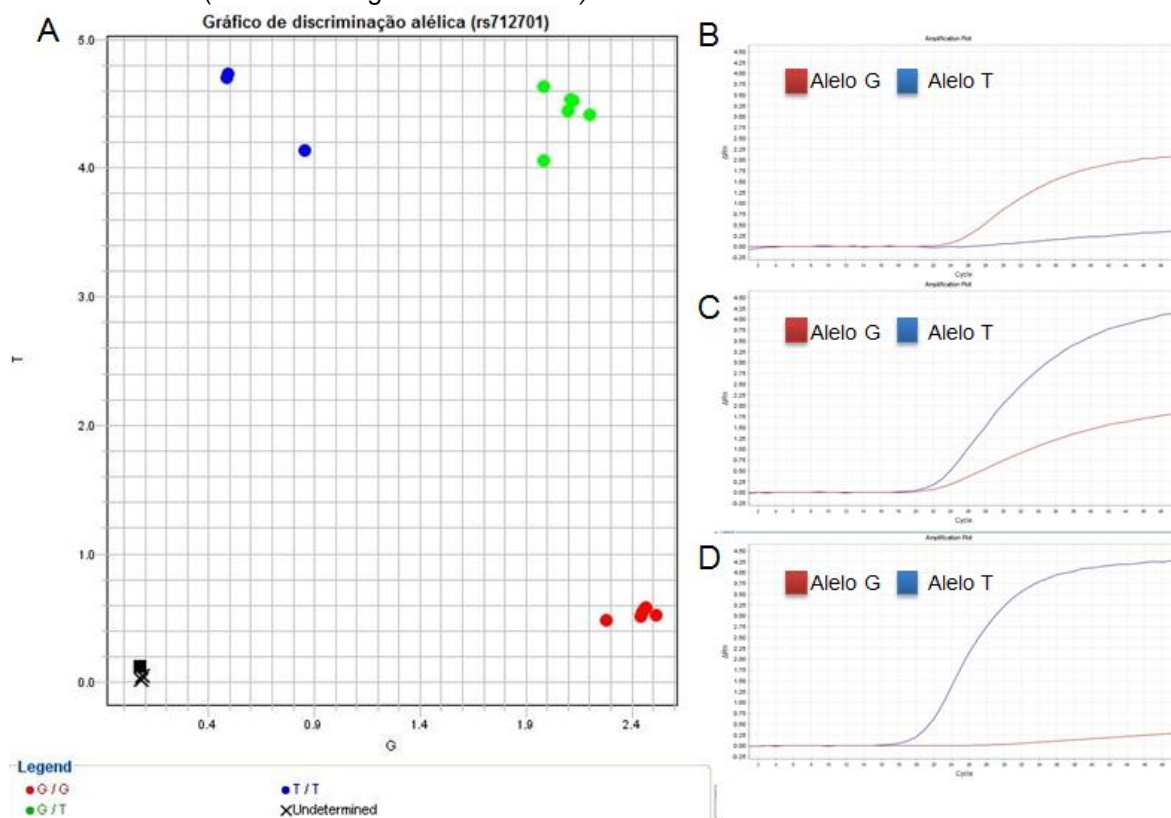
ANEXO 4 – QUESTIONÁRIO UTILIZADO PARA COLETA DE DADOS DOS PACIENTES

COLETA DE DADOS

Paciente nº _____ Registro HC: _____

1. Nome: _____
2. Data de nascimento: _____
3. Paciente () Parente () Parentesco: _____
4. Sexo Masculino () Feminino ()
5. Púbere () Pré Púbere () Tanner _____
6. CAD no diagnóstico Sim () Não ()
7. CAD no último ano Sim () Não ()
8. Consanguinidade Sim () Não ()
9. Idade de diagnóstico (meses ou anos) _____
10. Tempo de diabetes (meses) _____
11. Peso (kg) _____
12. Peso (DP) _____
13. Estatura (cm) _____
14. Estatura (DP) _____
15. IMC (kg/m²) _____
16. IMC (DP) _____
17. Tipo de insulina: Análogo Sim () Não ()
18. Necessidade de insulina (U/kg/dia) _____.
19. Tempo de tratamento com insulina:
() Não tratado com insulina, () tratado com até 6 meses depois diagnóstico, () tratado mais de 6 meses depois do diagnóstico
20. Comorbidades : () Doença tireoideana, () Doença celíaca, Outros () Qual _____
21. História familiar de Diabetes Sim (), (...)pais ou () avós, Não ()
22. História familiar de doença cardiovascular Sim () Não ()
23. Tipo de Pele Fitzpatrick I&II () II&III () IV&V ()
24. Etnia: ()Euro-brasileiro, (...) Afro-brasileiro, () Oriental, () Outro
25. Média índice UV nos últimos 35 dias _____
26. Uso de fotoproteção _____
27. Uso de suplemento vitamínico Sim () Não () Qual? _____

ANEXO 5 – EXEMPLO DE DETECÇÃO DE POLIMORFISMOS POR PCR EM TEMPO REAL
(rs712701 do gene *Paired Box4*)



A) Gráfico de discriminação alélica: em vermelho estão amostras homocigotas (genótipo GG); em verde, amostras heterocigotas (genótipo GT), e em azul amostras homocigotas (genótipo TT), em preto controle negativo. B) Gráfico de amplificação dos alelos: genótipo GG. C) Gráfico de amplificação dos alelos: genótipo GT. D) Gráfico de amplificação dos alelos: genótipo TT.