

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

SUSAN WEBBER DE SOUZA

**POLIMORFISMOS DA REGIÃO PROMOTORA DO GENE *apoM*
EM CRIANÇAS COM DIABETES *MELLITUS* TIPO 1**

CURITIBA

2016

SUSAN WEBBER DE SOUZA

**POLIMORFISMOS DA REGIÃO PROMOTORA DO GENE *apoM*
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: Prof^a. Dr^a. Fabiane G.de M. Rego
Co-orientador: Prof. Dr. Geraldo Picheth

CURITIBA

2016

Souza, Webber de

Polimorfismos da região promotora do gene *apom* em crianças com diabetes *mellitus* tipo 1. / Susan Weber de Souza – Curitiba, 2016.

108 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. 3. Gene apoM. I. Rego, Fabiane G.de M. II. Picheth, Geraldo. III. Universidade Federal do Paraná. IV. Título.

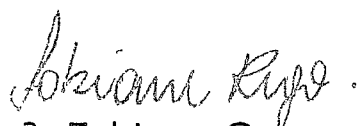
CDD 615.1

TERMO DE APROVAÇÃO

SUSAN WEBBER DE SOUZA

Título: "Polimorfismos da região promotora do gene apoM em crianças com *Diabetes mellitus* tipo 1"

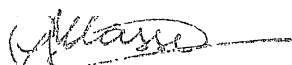
Dissertação aprovada como requisito parcial para a obtenção de grau de Mestre, no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal do Paraná, área de concentração: Análises Clínicas.



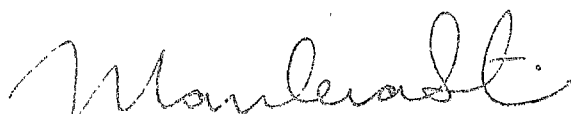
Prof^a. Dr^a. Fabiane Gomes de Moraes Rego
Orientadora



Prof. Dr. Geraldo Picheth
Co-orientador



Prof^a. Dr^a. Giseli Klassen
Universidade Federal do Paraná



Prof^a. Dr^a. Mariléia Scartezini
Universidade Federal do Paraná

Curitiba, 15 de dezembro de 2016.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar àquele o qual eu devo tudo: Deus, obrigada por seu alento e socorro, não há como descrever minha gratidão por Ti.

À minha família: mamãe Jocelir, grata por ser essa pessoa tão incrível, companheira, conselheira e além de mãe, amiga com a qual eu posso contar em todos os momentos, sua determinação e coragem me incentivaram a prosseguir; hoje devo tudo o que sou ao seu papel de pai e mãe tão bem desempenhado, embora não tenha sido fácil, conseguimos! Minha irmã Kathleen, obrigada por nossas longas conversas, cafés e companhia agradáveis, você é meu anjo aqui na Terra, meu mais que obrigada. Vovó Jandira, suas orações e incentivo foram fundamentais nessa caminhada. Tia Cleuci, mesmo de longe e talvez sem saber, foi uma inspiração de fé, força e coragem. Lucas Wolff, obrigada pela paciência de sempre, sua tranquilidade me manteve mais amena. Mais que namorado, meu companheiro de longa data Rafael, foi um vencedor ao aguentar-me nos dias cinzas, nunca serei capaz de pagar de forma alguma seu jeito de me entender e respeitar. A todos vocês não tenho como agradecer e retribuir toda a paciência, incentivo, amor, carinho e créditos que depositaram em mim todo o tempo, acreditaram em mim mais que eu mesma, seguramente.

A todos os meus amigos que amo como se fossemos irmãos, especialmente ao Fernando Betim, o qual me incentivou desde a inscrição: obrigada pelas conversas, risadas, momentos de descontração e jantares, que nessa loucura de vida acadêmica, era uma desculpa para nos reunir e falar sobre os projetos.

Aos meus orientadores Dr^a Fabiane Rego e ao Dr^o Geraldo Picheth: vocês foram simplesmente sensacionais, grata pela paciência e sede de dividir o conhecimento, são verdadeiros educadores, não fui eu quem escolheu esse grupo de pesquisa, mas ele me escolheu, agradeço não apenas por me ensinarem a desenvolver pesquisa, mas me desenvolver como ser humano.

A Dr^a Dayane Alberton que com sua doçura e gentileza pode conseguir tudo. És simplesmente incrível no mais amplo sentido que a palavra possa alcançar e ter sua confiança sempre foi reconfortante.

As minhas companheiras de laboratório, obrigada, pela parceria, companheirismo, pelos almoços no RU, pelas conversas descontraídas e momentos

de estudos, agradeço também por me mostrarem tantas possibilidades e caminhos, pois cada uma com seu jeito único de ser me ensinou algo, mesmo que não saiba.

A minha amiga de coleta, de experimentos e de momentos inusitados Bruna Martins, seu jeito de levar a vida me surpreende, tanto quanto nossas aventuras de fazer géis e mais géis de poliacrilamida, nossas corridas de PCR ou nossas idas para dosagem de DNA, sua amizade é muito importante para mim, você é alguém que realmente vale a pena conhecer e ter por perto, a levarei comigo para sempre.

A equipe de Histocompatibilidade e Imunogenética do Hospital de Clínicas, os quais me deram minha primeira oportunidade de estágio e me mostraram um mundo de possibilidades, o incentivo de vocês foi o início de tudo.

A banca examinadora minha singela gratidão, pois a gratidão é o único tesouro dos humildes.

*“A força não vem da capacidade física e
sim de uma vontade indomável.”*

Mahatma Gandhi

RESUMO

O *Diabetes mellitus* (DM) atualmente considerada uma epidemia, é um grupo heterogêneo de doenças metabólicas caracterizada por hiperglicemia, resultante de defeitos na secreção ou na ação da insulina. Em crianças e adolescentes a forma mais comum de diabetes é o tipo 1 (DM1), que pode corresponder até 10% dos casos de DM. O DM1 se desenvolve como consequência de uma combinação de predisposição genética, associados a fatores ambientais levando à destruição das células β , produtoras de insulina. O diagnóstico precoce, o bom controle glicêmico e lipídico, além de tratamento adequado minimizam as comorbidades associadas à doença. O objetivo deste trabalho foi estudar variações genéticas da região promotora do gene apoM associadas ao DM1, correlacionando com biomarcadores de controle glicêmico. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Paraná – Setor de Ciências da Saúde (CAAE: 24676613.6.0000.0102). Neste estudo 317 crianças com idade de até 14 anos foram divididas em dois grupos: o de crianças controle (n=169), com indivíduos saudáveis e o grupo DM1 (n=148) com indivíduos doentes. Foram quantificados biomarcadores de controle glicêmico, perfil lipídico e de função renal. Os altos valores encontrados para HbA1c (9,7%) e baixos para o 1,5-AG (2,9 $\mu\text{g/mL}$), caracterizam o mau controle glicêmico encontrado no grupo DM1. Embora as concentrações do colesterol total, HDL-c, LDL-c e triglicérides tenham sido estatisticamente diferentes entre os grupos ($P < 0,001$) permanecem dentro dos intervalos de referência para os respectivos parâmetros analisados, não caracterizando os indivíduos como dislipidêmicos. Para os biomarcadores de função renal as diferenças entre os grupos tiveram um $P < 0,001$, com exceção da albumina, porém os indivíduos não foram declarados com qualquer tipo de lesão renal até o fim deste estudo. Os polimorfismos da região promotora do gene apoM foram genotipados para ambos os grupos, sendo utilizadas as técnicas de PCR-RFLP para os polimorfismos rs805296 e rs9404941 e a de PCR em tempo real com sonda TaqMan® para o rs805297. Todos os polimorfismos analisados estão no equilíbrio de Hardy-Weinberg. Neste estudo os polimorfismos rs805296 ($P=0,142$) e rs9404941 ($P=0,142$) não foram associados ao DM1 quando analisados no modelo co-dominante. As frequências para os alelos raros dos polimorfismos em estudo foram, no geral, similares aos descritos para outras populações europeias ou Caucasoídes e menores quando comparados a Orientais. O alelo raro (C) do polimorfismo rs9404941 foi associado ao aumento das concentrações de glicemia ao acaso ($P=0,011$) e diminuição da concentração de LDL-colesterol apenas em crianças portadoras de DM1, não havendo relatos anteriores da associação entre este polimorfismo com ambos os parâmetros bioquímicos para pacientes diabéticos. O rs805297 quando analisado no modelo recessivo mostrou diferença estatística entre os grupos ($P=0,021$), sugerindo associação do alelo A como sendo protetor à doença, embora novos estudos com diferentes populações e maior tamanho amostral devam ser realizados para substanciar os resultados encontrados.

Palavras-chave: *Diabetes mellitus*, polimorfismo, gene apoM.

ABSTRACT

Diabetes *mellitus* (DM) actually considered an epidemic is a heterogeneous group of metabolic diseases characterized by hyperglycemia resulting from defects in secretion or insulin action. In children and adolescents the most common form of diabetes is type 1 (DM1), which may correspond to 10% of cases of diabetes. Develops DM1 as a result of a combination of genetic predisposition, environmental factors associated with leading to the destruction of β cells produce insulin. Early diagnosis, glycemic and lipid control appropriate, and proper treatment minimizes the comorbidities associated with the disease. The objective of this work was to study genetic variations in the promoter region of apoM gene associated DM1, correlating with biomarkers glycemic control. The project was approved by the Ethics Committee of the Federal University of Paraná - Health Sciences Sector (CAAE: 24676613.6.0000.0102). This study 317 children aged up to 14 years, were divided into two groups: control children (n=169), with healthy subjects and DM1 group (n=148) with diseased individuals. Were measured biomarkers glycemic control, lipid profile and renal function. The high values found for HbA1c (9.7%) and lower for 1,5-AG (2.9 mg/mL) characterize poor glycemic control found in DM1 group. Though the concentrations of total cholesterol, HDL-c, LDL-c and triglycerides were statistically different between groups ($P < 0.001$) remain within reference ranges for the respective analysis parameters no featuring as dyslipidemic individuals. To biomarkers of renal function differences between groups had a $P < 0.001$, with the exception of albumin, but the subjects were not reported in any type of renal injury until the end of the study. The polymorphisms of the promoter region of gene apoM were genotyped both groups being used PCR-RFLP techniques to rs805296 and rs9404941 polymorphisms and real-time PCR with TaqMan probe to rs805297. All polymorphisms analyzed in Hardy-Weinberg equilibrium. This study rs805296 ($P=0.142$) and rs9404941 ($P = 0.142$) polymorphisms, were not associated with DM1 when analyzed in co-dominant model. The frequencies to the rare alleles of polymorphisms were generally similar to described for other European or Caucasoid populations and lowers to compared Eastern. The rare allele (C) rs9404941 polymorphism was associated with increased glucose concentrations random ($P = 0.011$) and decrease LDL-cholesterol concentration only in children DM1 with no previous reports of the association between this polymorphism with both biochemical parameters for diabetic patients. The rs805297 when analyzed in the recessive model demonstrate statistical differences between groups ($P = 0.021$), that suggest association of the allele to be protector to disease, although further studies with different populations and increased sample amount should be conducted to prove results.

Keywords: *Diabetes mellitus, polymorphism, gene apoM.*

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	DISTRIBUIÇÃO GLOBAL DO DIABETES MELLITUS	22
FIGURA 2	CRIANÇAS COM DM1	23
FIGURA 3	FASES DO DESENVOLVIMENTO DO DM1	28
FIGURA 4	EQUILÍBRIO DO SISTEMA IMUNOLÓGICO NA PATOGENESE DA DOENÇA.	29
FIGURA 5	IMUNOLOGIA DO DM1	30
FIGURA 6	ESTRUTURA DA INSULINA HUMANA	39
FIGURA 7	LOCALIZAÇÃO DO GENE DA APOM NO CROMOSSOMO.	44
FIGURA 8	FATORES ASSOCIADOS À EXPRESSÃO DO GENE DA <i>apoM</i>	45
FIGURA 9	PRINCÍPIO DA PCR EM TEMPO REAL COM SONDAS FLUORESCENTES TAQMAN®	53
FIGURA 10	SÍTIOS DE RESTRIÇÃO DAS ENDONUCLEASES	56
FIGURA 11	FLUXOGRAMA DE TRABALHO	59
FIGURA 12	ASSOCIAÇÃO DO POLIMORFISMO rs805297 COM AS CONCENTRAÇÕES DO BIOMARCADOR CREATININA PARA OS GRUPOS EM ESTUDO	69
FIGURA 13	SÍTIOS DE RESTRIÇÃO PARA O POLIMORFISMO rs805296	71
FIGURA 14	SÍTIOS DE RESTRIÇÃO PARA O POLIMORFISMO rs9404941	76
FIGURA 15	ASSOCIAÇÃO DO POLIMORFISMO rs9404941 DO GENE <i>apoM</i> COM AS CONCENTRAÇÕES DE GLICEMIA AO ACASO PARA OS GRUPOS EM ESTUDO	79
FIGURA 16	ASSOCIAÇÃO DO POLIMORFISMO rs9404941 DO GENE <i>apoM</i> COM AS CONCENTRAÇÕES DE LDL-COLESTEROL PARA OS GRUPOS EM ESTUDO.	80

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	CARACTERIZAÇÃO DOS POLIMORFISMOS EM ESTUDO	52
TABELA 2	PROTOCOLO UTILIZADO PARA GENOTIPAGEM DO GENE <i>apoM</i> COM SONDAS FLUORESCENTES NA PCR EM TEMPO REAL	54
TABELA 3	PROTOCOLO UTILIZADO NA TÉCNICA PCR-RFLP PARA GENOTIPAGEM DOS POLIMORFISMOS rs805296 E rs9404941 DO GENE <i>apoM</i> .	55
TABELA 4	PROTOCOLO UTILIZADO PARA REAÇÃO DE RESTRIÇÃO DOS POLIMORFISMOS rs805296 E rs9404941	56
TABELA 5	PRINCÍPIOS METODOLÓGICOS E REAGENTES PARA DOSAGEM DOS PARÂMETROS BIOQUÍMICOS	57
TABELA 6	CARACTERIZAÇÃO ANTROPOMÉTRICA E CLÍNICA DOS GRUPOS DM1 EM CRIANÇAS E CONTROLES SAUDÁVEIS	60
TABELA 7	CONCENTRAÇÕES DOS PARÂMETROS BIOQUÍMICOS PARA OS GRUPOS DM1 E CRIANÇAS-CONTROLE	63
TABELA 8	FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS PARA O POLIMORFISMO rs805297 DO GENE <i>apoM</i> NOS GRUPOS EM ESTUDO	67
TABELA 9	COMPARAÇÕES ENTRE FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS DO POLIMORFISMO rs805297 DO GENE <i>apoM</i> COM A LITERATURA	68
TABELA 10	FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS PARA O POLIMORFISMO rs805296 DO GENE <i>apoM</i> NA AMOSTRA EM ESTUDO	70
TABELA 11	COMPARAÇÕES ENTRE FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS DO POLIMORFISMO rs805296 DO GENE <i>apoM</i> COM A LITERATURA	73
TABELA 12	FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS PARA O POLIMORFISMO rs9404941 DO GENE <i>apoM</i> NA AMOSTRA EM ESTUDO	77
TABELA 13	COMPARAÇÕES ENTRE FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS DO POLIMORFISMO rs9404941 DO GENE <i>apoM</i> COM A LITERATURA.	78
TABELA 14	CORRELAÇÕES SIGNIFICATIVAS ENTRE OS POLIMORFISMOS DO GENE <i>apoM</i> EM ESTUDO E PARÂMETROS LABORATORIAIS NOS GRUPOS EM ESTUDO	81

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1	SINAIS E SINTOMAS DO DIABETES MELLITUS TIPO 1 EM CRIANÇAS	25
QUADRO 2	CRITÉRIOS DE DIAGNÓSTICO PARA DM1	25
QUADRO 3	AÇÃO DOS TIPOS DE INSULINA	40

LISTA DE ANEXOS

ANEXO 1	TERMO DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA	99
ANEXO 2	TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	102
ANEXO 3	QUESTIONÁRIO APLICADO AOS PARTICIPANTES DA PESQUISA	107
ANEXO 4	PCR EM TEMPO REAL PARA O GENE <i>apoM</i>	108

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

1,5 AG	1,5 Anidroglicitol
ADA	<i>American Diabetes Association</i> ; Associação Americana de Diabetes
apoM	apolipoproteína M
AVC	Acidente vascular cerebral
CAD	Cetoacidose diabética
CT	Colesterol total
DAC	Doença arterial coronariana
DM	Diabetes <i>mellitus</i>
DM1	Diabetes <i>mellitus</i> tipo 1
DM2	Diabetes <i>mellitus</i> tipo 2
DMG	Diabetes <i>mellitus</i> gestacional
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> ; Ácido desoxirribonucleico
FPIR	<i>First phase insulin response</i> ; Primeira Fase de Resposta à Insulina
GAD	<i>Glutamic Acid Decarboxylase</i> ; Anti-descarboxilase do ácido glutâmico
GADA	<i>Autoantibodies to GAD</i> ; Autoanticorpos para GAD
GAD65	<i>Isoform of Glutamate Decarboxylase</i> ; Isoforma do ácido glutâmico
HbA1c	Hemoglobina glicada fração A1C
HDL-C	<i>High density lipoprotein – cholesterol</i> ; HDL- colesterol
HLA	<i>Human Leukocyte Antigen</i> ; Antígeno leucocitário humano
H-W	Equilíbrio de Hardy-Weinberg
IAA	<i>Insulin autoantibodies</i> ; Autoanticorpos anti-insulina
IA-2	<i>Islet Antigen 2</i> ; Autoanticorpos anti-ilhotas
IC 95%	Índice de confiança de 95%
ICA	<i>Islet Cell Antibodies</i> ; Autoanticorpos citoplasmáticos anti-ilhotas
IMC	Índice de massa corpórea
ISPAD	<i>International Society for Pediatric and Adolescent Diabetes</i> ; Sociedade internacional para crianças e adolescentes com diabetes
IVGTT –	<i>Intravenous Glucose Tolerance Test</i> ; Teste intravenoso de tolerância à glicose
LDL-C	<i>Low Density Lipoprotein – cholesterol</i> ; LDL-colesterol

MODY	<i>Maturity-Onset Diabetes of the Young</i> ; Diabetes da maturidade de início precoce
P	Probabilidade
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> ; Reação em cadeia da polimerase
RFLP	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i> ; Polimorfismo no Comprimento do Fragmento de Restrição
SBD	Sociedade Brasileira de Diabetes
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphisms</i> ; Polimorfismos de único nucleotídeo
VLDL	<i>Very low density lipoprotein – cholesterol</i> ; Lipoproteína de densidade muito baixa
WHO	<i>World Health Organization</i> ; Organização mundial da saúde
ZnT8	<i>Zinc Transporter-8</i> ; Transportador de Zinco

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
1.1	OBJETIVOS	20
1.1.1	Objetivo geral	20
1.1.2	Objetivos específicos	20
2	REVISÃO DE literatura	21
2.1	DIABETES <i>MELLITUS</i>	21
2.1.1	Diabetes <i>mellitus</i> tipo 1	23
2.2	COMPLICAÇÕES ASSOCIADAS AO DM1	31
2.2.1	Cetoacidose diabética	32
2.3	BIOMARCADORES ASSOCIADOS AO DIABETES <i>MELLITUS</i> TIPO 1	35
2.4	TRATAMENTO DO DM1	37
2.5	POLIMORFISMOS DE ÚNICO NUCLEOTÍDEO (SNPs)	41
2.5.1	Polimorfismos associados ao diabetes <i>mellitus</i> tipo 1	41
2.6	GENE APOLIPOPROTEÍNA M	43
2.6.1	Regulação da expressão do gene <i>apoM</i>	45
2.7	PERSPECTIVAS	47
3	MATERIAL E MÉTODOS	49
3.1	AMOSTRAS	49
3.1.1	Critérios para a caracterização da amostra	50
3.2	EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DO DNA GENÔMICO	51
3.3	GENOTIPAGEM DOS POLIMORFISMOS NO GENE <i>ApoM</i>	51
3.4	DOSAGENS BIOQUÍMICAS	57
3.5	ANÁLISES ESTATÍSTICAS	58
3.6	FLUXOGRAMA DE TRABALHO	59
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	60
4.1	CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA	60
4.2	ANÁLISES BIOQUÍMICAS	63
4.3	ANÁLISES MOLECULARES	66
4.3.1	Polimorfismo rs805297 do gene <i>apoM</i>	66
4.3.2	Polimorfismo rs805296 do gene <i>apoM</i>	70
4.3.3	Polimorfismo rs9404941 do gene <i>apoM</i>	75
4.4	ANÁLISES DE CORRELAÇÃO LINEAR DE PEARSON	80
5	CONCLUSÕES	84
	REFERÊNCIAS	85

1 INTRODUÇÃO

O Diabetes *mellitus* (DM) é um grupo heterogêneo de doenças metabólicas, caracterizado por hiperglicemia, resultante de defeitos na secreção ou na ação da insulina. A hiperglicemia crônica que ocorre no diabetes está associada a danos em longo prazo, à disfunção e falha de diferentes órgãos e sistemas, especialmente olhos, rins, sistema nervoso, coração e vasos sanguíneos (ADA, 2014b; SBD, 2016).

A grande maioria dos pacientes diabéticos é classificada em duas grandes categorias: diabetes *mellitus* tipo 1 (DM1), que é causada por uma deficiência absoluta de insulina, e diabetes *mellitus* tipo 2 (DM2), que é caracterizado pela presença de resistência à insulina com um aumento compensatório na secreção de insulina inadequada. Além disso, mulheres que desenvolvem diabetes durante a gestação são classificadas como tendo diabetes *mellitus* gestacional (DMG). Há outros tipos de diabetes ou “outros tipos específicos” classificados separadamente (TRIPLITT *et al.*, 2000), incluindo um grupo designado MODY (*Maturity-Onset Diabetes of the Young*), síndromes diabéticas monogênicas (ADA, 2016).

O diabetes *mellitus* tipo 1 (DM1) se desenvolve como consequência de uma combinação de predisposição genética, associados a fatores ambientais desconhecidos e eventos aleatórios, onde há destruição das células β , produtoras de insulina nas ilhotas de Langerhans no pâncreas (ANDERSON; BLUESTONE, 2005; BLUESTONE; HEROLD; EISENBARTH, 2010). O DM tipo 1 é caracterizado por destruição das células beta que levam a uma deficiência de insulina, sendo subdivido em tipos 1A e 1B. Devido a deficiência da insulina, estes pacientes frequentemente apresentam os sintomas agudos do diabetes e marcada elevação da glicemia, e aproximadamente 1/3 são diagnosticados em cetoacidose com risco de vida. (EDIC, 2003; MAAHS; REWERS, 2006; BLUESTONE; HEROLD; EISENBARTH, 2010).

A maioria dos casos de DM1, o tipo 1A, é caracterizada pela presença de auto anticorpos, sendo os mais comuns o anticélulas das ilhotas (ICA), anti-ácido glutâmico descarboxilase (GAD), antitirosino fosfatases IA-2 e IA-2 β e anti insulina, que identificam o processo autoimune da doença e levam a destruição das células, sendo caracterizado como diabetes imunomediado. A destruição autoimune das

células possuem várias predisposições genéticas, além de estar relacionada a fatores ambientais que ainda não estão bem definidos (GAVIN *et al.*, 2002).

Já em outros casos de diabetes *mellitus* tipo 1 com etiologias desconhecidas ou onde nenhuma evidência de autoimunidade está presente, os pacientes são classificados como diabéticos idiopáticos ou tipo 1B. Os indivíduos com esta forma de diabetes sofrem episódios de cetoacidose e exibem diferentes graus de deficiência de insulina entre um episódio e outro. A minoria dos pacientes com DM1 se enquadram nessa categoria, sendo a maioria dos pacientes desse subgrupo de origem africana ou asiática. (GAVIN *et al.*, 2002).

A genética do diabetes *mellitus* tipo 1 não pode ser classificada de acordo com um modelo específico dominante ou recessivo, ou herança intermediária de um conjunto específico de genes, pois o DM1 representa uma heterogênea e poligênica desordem. Evidências mais diretas têm sido observadas em forte associação entre várias variantes genéticas e o DM1. O primeiro *locus* de risco genético principal foi detectado em 1974 por Nerup e colaboradores (NERUP *et al.*, 1974) seguido por Cudworth e Woodrow (CUDWORTH; WOODROW, 1975), que detectaram associação com o sistema HLA. Desde então, 30 anos de estudos genéticos tem avançado significativamente nosso conhecimento sobre os fatores de susceptibilidade genética para o DM1, tornando-a uma das doenças genéticas complexas mais estudada até o momento (ALIZADEH; KOELEMAN, 2008).

Os polimorfismos genéticos que se mostraram envolvidos com DM1 tem aumentado significativamente nosso conhecimento sobre quais vias metabólicas estão afetadas no DM1 (ALIZADEH; KOELEMAN, 2008).

A variante T-778C (rs805296) localizada no promotor do gene *apoM* está associada com susceptibilidade de risco para o DM1 (WU *et al.*, 2009). Apolipoproteína M (*apoM*) é uma nova apolipoproteína descoberta em 1999 e é uma carreadora do mediador metabolicamente ativo, esfingosina-1-fosfato, na lipoproteína colesterol de alta densidade (HDL) e está implicada no transporte reverso do colesterol mediada pela HDL (DUAN; DAHLBACK; VILLOUTREIX, 2001; CHRISTOFFERSEN *et al.*, 2006; CHRISTOFFERSEN *et al.*, 2011).

Estudos sugerem que as concentrações plasmáticas de *apoM* podem mudar em pacientes com hiperlipidemia (CHRISTOFFERSEN *et al.*, 2012; TABATABAEI-MALAZY *et al.*, 2014) e em modelos *in vivo* (NOJIRI *et al.*, 2014) e *in vitro* (WOLFRUM *et al.*, 2008; NOJIRI *et al.*, 2014) de diabetes.

Por ser uma apolipoproteína descoberta recentemente, com poucos estudos, sugerindo maiores pesquisas e investigação, justifica-se esse projeto de pesquisa com objetivo de responder as várias perguntas existentes sobre o gene apoM relacionada ao diabetes *mellitus* tipo 1.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

Estudar variações genéticas do gene apoM associadas ao *Diabetes mellitus* tipo 1, correlacionando com biomarcadores de controle glicêmico e lipídico.

1.1.2 Objetivos específicos

- Selecionar amostras de sangue de crianças para o grupo com diabetes tipo 1 e para o grupo controle saudável;
- Verificar as frequências genotípicas e alélicas para os polimorfismos do gene *apoM* (rs805297, rs9404941, rs805296) em pacientes com diabetes *mellitus* tipo 1 e indivíduos saudáveis usados como controle;
- Associar as variantes genéticas aos marcadores laboratoriais do perfil lipídico, controle glicêmico, função renal e nutricional.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 DIABETES *MELLITUS*

O diabetes é uma condição definida principalmente pela hiperglicemia causando danos vasculares, a qual está associada à redução da expectativa de vida como qualidade de vida, devido às complicações microvasculares (retinopatia, nefropatia e neuropatia) e macrovasculares (doença isquêmica do coração, acidente vascular cerebral (AVC) e doença vascular periférica) (ADA, 2016).

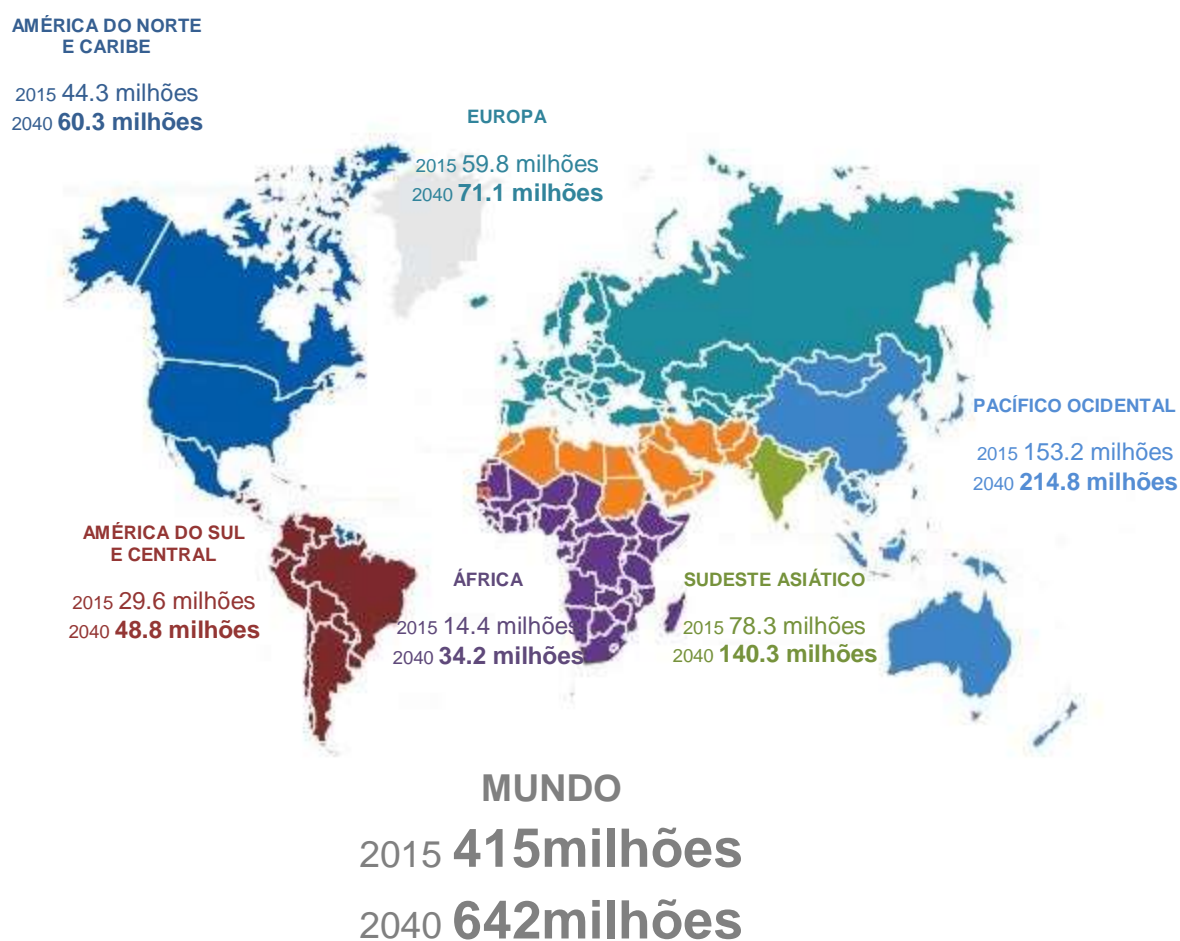
O diabetes pode ser classificado nas seguintes categorias gerais: diabetes *mellitus* tipo 1 (DM1); diabetes *mellitus* tipo 2; diabetes *mellitus* gestacional (DMG), e os tipos específicos de diabetes devido a outras causas, como por exemplo, síndromes do diabetes monogênico (MODY - *Maturity-Onset Diabetes of the Young*), doenças do pâncreas exócrino, como a fibrose cística; por uso de drogas, como o tratamento para HIV/AIDS ou após transplante de órgãos (ADA, 2015).

Embora seja classificado em quatro categorias gerais, a grande maioria dos casos de diabetes dividem-se em dois grandes grupos etiopatogênicos: DM1 e DM2. O DM1 é causado pela deficiência absoluta da secreção de insulina. Os indivíduos com risco aumentado de desenvolvimento deste tipo de diabetes podem frequentemente ser identificados pela evidência sorológica de um processo patológico autoimune, que ocorre nas ilhotas pancreáticas e por marcadores genéticos. Em sua maioria, a destruição das células β é mediada por autoimunidade, caracterizando o DM1A ou autoimune, porém existem casos sem evidências de processo autoimune, a esse tipo de DM refere-se como DM1B ou idiopático (SBD, 2014). Já, o DM2, muito mais prevalente, é causado pela combinação de resistência à ação da insulina e resposta secretora compensatória inadequada à insulina (ADA, 2014a).

Uma epidemia de diabetes mellitus (DM) está em curso. Atualmente, estima-se que a população mundial com diabetes seja da ordem de 415 milhões e que alcance 642 milhões em 2040, como mostrado na FIGURA 1. Cerca de 80% desses indivíduos vivem em países em desenvolvimento, onde a

epidemia tem maior intensidade e há crescente proporção de pessoas acometidas em grupos etários mais jovens, as quais coexistem com o problema que as doenças infecciosas ainda representam (WILD *et al.*, 2004; IDF, 2015a).

FIGURA 1 - DISTRIBUIÇÃO GLOBAL DO DIABETES MELLITUS.



Estimativa do número de pessoas afetadas pelo diabetes em todo o mundo, subdividido por região em 2015 e 2040 com idade entre 20 e 79 anos. FONTE: Adaptado de IDF 2015a.

O custo do diabetes nos Estados Unidos no ano de 2002 estimado pela *American Diabetes Association* (ADA) foi de 132 bilhões de dólares, podendo chegar a 192 bilhões em 2020 e em 2040 a estimativa é de que esse valor ultrapasse os 800 bilhões de dólares (ADA, 2003; IDF, 2015b). Estimativas do custo direto para o Brasil estão em torno de 3,9 bilhões de dólares, havendo cerca de 490.000 indivíduos adultos com diabetes diagnosticados e catalogados até dezembro de 2012 (BARCELO *et al.*, 2003; DATASUS, 2015).

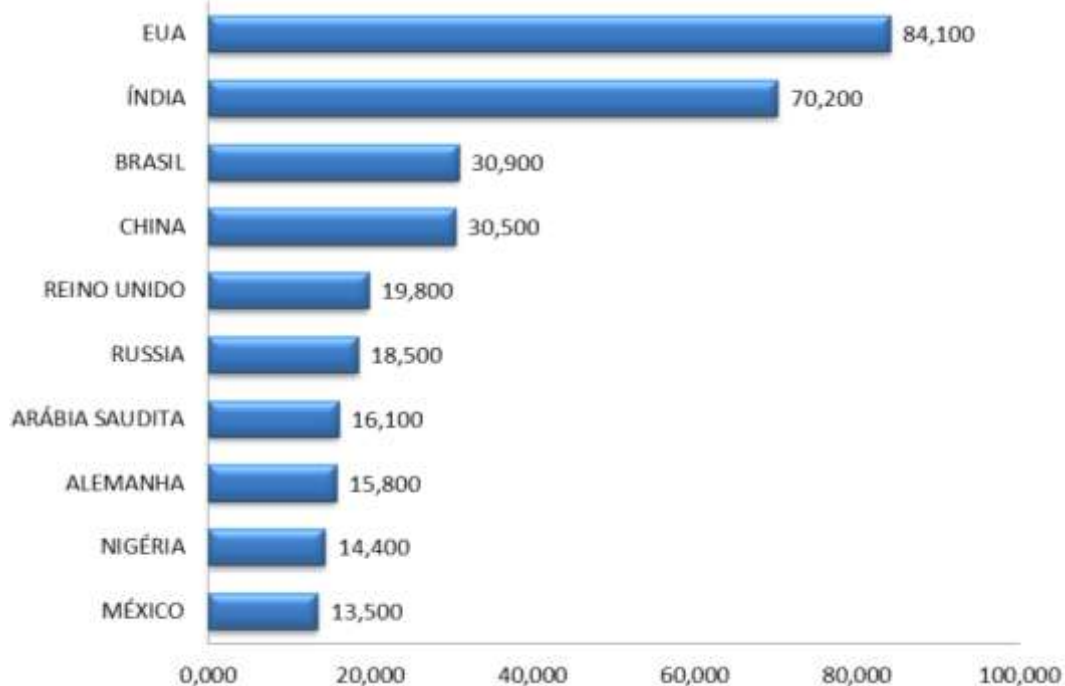
Diabetes é uma doença crônica e complexa, que exige cuidados médicos permanentes, com estratégias de redução de riscos multifatoriais, além do controle glicêmico. A educação do paciente, o autogerenciamento e apoio são essenciais para prevenir complicações agudas e reduzir o risco de complicações a longo prazo (ADA, 2015).

2.1.1 Diabetes *mellitus* tipo 1

O diabetes *mellitus* tipo 1 (DM1) representa de 5 a 10% do diabetes *mellitus*, em geral seu aumento tem sido em todo o mundo, aproximadamente 86.000 crianças desenvolvem essa patologia ao ano, o que representa 3% (IDF, 2015a).

A incidência varia amplamente entre os diferentes países e entre as diferentes etnias. Em 2015, o número de crianças com DM1 em todo o mundo foi de 542 milhões (IDF, 2015a), sendo o Brasil ocupante do terceiro lugar no *ranking*, conforme FIGURA 2.

FIGURA 2 - CRIANÇAS COM DM1.



O gráfico mostra o *ranking* de 10 países com os respectivos números de crianças diagnosticadas com DM1, tendo idade entre 0 e 14 anos.
FONTE: Adaptado de IDF, 2015a.

Possivelmente, o aumento da incidência juntamente com reduzida mortalidade precoce, contribui para o aumento da prevalência da doença (VANBUECKEN; LORD; GREENBAUM, 2000).

O diabetes *mellitus* tipo 1 (DM1) é caracterizado por ser uma doença crônica com destruição total na maioria dos casos ou parcial das células β , o que resulta na incapacidade progressiva de produzir insulina (CRAIG *et al.*, 2014). Os pacientes dependem de insulina para sua sobrevivência, explicando o antigo termo diabetes *mellitus* insulino-dependente. Sem insulina, estes pacientes desenvolvem complicações metabólicas graves, como cetoacidose aguda e coma (BLOOM; HAYES; GAMBLE, 1975; ATKINSON, 2012).

Como a insulina é um importante hormônio anabólico, o comprometimento da função da insulina afeta não apenas o metabolismo de glicose, como também o metabolismo de lipídeos e proteínas. A absorção diminuída ou abolida de glicose pelos tecidos adiposo e muscular e a neoglicogênese hepática resulta em hiperglicemia grave e glicosúria. A glicosúria induz diurese osmótica (poliúria), causando perda de água e eletrólitos, o que estimula a sede (polidipsia). O catabolismo de proteínas e lipídeos tende a induzir um balanço energético negativo (polifagia), completando a tríade clássica do diabetes: poliúria, polidipsia e polifagia (IDF, 2013).

Embora o DM1 possa afetar todas as faixas etárias, a maioria dos pacientes recebe o diagnóstico na infância ou adolescência (ATKINSON, 2012), sendo episódios de cetoacidose diabética o primeiro sintoma em alguns casos (ver tópico 2.2.1), ressaltando que em bebês e crianças os sinais e sintomas relacionados na QUADRO 1 podem ser mais difíceis de se detectar (IDF, 2013).

QUADRO 1 - SINAIS E SINTOMAS DO DIABETES *MELLITUS* TIPO 1 EM CRIANÇAS

MAIS COMUM	MENOS COMUM	GRAVE	
Perda de peso	Fome excessiva	Vômitos e dores abdominais agudas	
Poliúria: em crianças incontinência urinária é comum	Visão turva	Bochechas coradas	Cheiro cetônico característico
Cansaço	Infecções de pele	Diminuição no nível de consciência	
	Dores abdominais	Coma	Choque

FONTE: Adaptado de IDF, 2013.

Por isso, além da presença ou ausência de sintomas, os critérios de diagnóstico para o DM1 em crianças são baseados também nas concentrações plasmáticas de glicose, (WHO, 2006; ADA, 2014b, 2016), podendo ser utilizados diferentes métodos para o diagnóstico (QUADRO 2). Assim, o critério diagnóstico para o diabetes é baseado nas concentrações plasmáticas de glicose e na presença ou ausência de sintomas (ADA, 2016). É recomendado que mesmo na ausência de hiperglicemia, porém com sintomas evidentes, os exames sejam refeitos em outro momento para confirmação do diagnóstico (CRAIG *et al.*, 2014), positivo ou negativo.

QUADRO 2 - CRITÉRIOS DE DIAGNÓSTICO PARA DM1

Os sintomas clássicos de diabetes ou crise hiperglicêmica, com a concentração de glicose ao acaso no plasma $\geq 200\text{mg/dL}$;
Glicose no plasma em jejum ¹ $\geq 126\text{mg/dL}$;
Glicemia 2-horas após 75 g de glucose oral (teste oral de tolerância a glucose (TOTG) ² $\geq 200\text{mg/dL}$;
Hemoglobina glicada (HbA1c) ³ $\geq 6.5\%$ ⁴ .

FONTE: WHO, 2006; CRAIG *et al.*, 2014; ADA, 2016.

¹ O jejum é definido como a ausência de ingestão calórica por pelo menos 8 horas.

² O teste deve ser realizado usando 75 g de glicose.

³ O teste deve ser realizado usando um método *National Glycohemoglobin Standardization Program* (NGSP) certificado e nos padrões da *Diabetes Control and Complications Trial* (DCCT).

⁴ Um valor inferior a 6,5% não exclui o DM1 diagnosticado por meio do teste de glicose. O papel da HbA1c independente do diagnóstico de DM1 em crianças ainda não está totalmente esclarecida.

Assim como ocorre em todas as doenças autoimunes, a susceptibilidade genética e os fatores ambientais são importantes na patogenia do DM1A.

Os primeiros *loci* de susceptibilidade para DM1 identificados estão localizados no cromossomo 6, na região do HLA (*Human Leukocyte Antigen*), e sabe-se que essa região está aproximadamente 60% relacionada aos casos dessa patologia (REDONDO; FAIN; EISENBARTH, 2001; ATKINSON, 2012). A importância dos genes HLA para o risco do DM1 ressalta o papel do sistema imune adaptativo no desenvolvimento da auto-imunidade (NOBLE; ERLICH, 2012).

Existem três classes HLA, designadas I, II e III. Os peptídeos ligados a moléculas de HLA de classe I são reconhecidos pelas células T CD8; os antígenos ligados a moléculas de classe II são reconhecidos por células T CD4 (REDONDO; FAIN; EISENBARTH, 2001), a região de classe III ainda vem sendo estudada, mas sabe-se que codificam uma variedade de moléculas com várias funções, incluindo os componentes do sistema complemento (C2, C4, e Bf) e fator de necrose tumoral (TNF) (KELLY *et al.*, 2003). O risco para a DM1 está fortemente associado ao HLA de classe II haplótipos DR3 e DR4, com maior risco aqueles com o genótipo DR3/DR4 (ATKINSON; EISENBARTH; MICHELS, 2014).

Novos estudos têm descoberto múltiplos outros genes que também contribuem para o risco para o DM1 (KELLY *et al.*, 2003; CONCANNON; RICH; NEPOM, 2009). O gene *INS-VNTR* (*Insulin - Variable Number Tandem Repeat*), localizado na região promotora do gene da insulina (*INS*) situado no cromossomo 11, contribui com mais de 10% da susceptibilidade genética do DM1 (DAVIES *et al.*, 1994). Ainda podem ser citados os genes *CTLA-4* (*cytotoxic T lymphocyte associated-4*), (NISTICO *et al.*, 1996) *IL2RA* (*IL-2 receptor complex locus*) (VELLA *et al.*, 2005), *PTPN22* (*protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 22*) (BEGOVICH *et al.*, 2004), além de outros, como contribuintes para susceptibilidade genética da doença.

Estes genes, na sua maioria, também impactam a função do sistema imune, contudo, sua contribuição é ofuscada pelo impacto dos genes HLA. De forma interessante, estudos recentes sugerem que os genes HLA contribuem primariamente para o desenvolvimento de auto-anticorpos, enquanto que os genes não-HLA e fatores ambientais possam ser mais importantes na

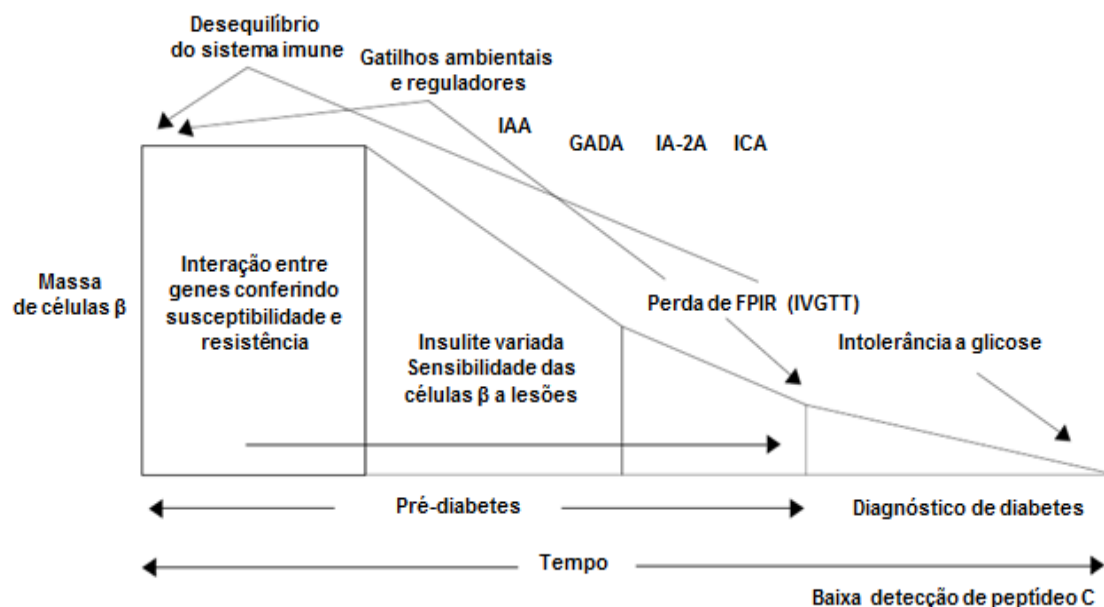
progressão de autoanticorpos para a manifestação clínica da doença (KNIP *et al.*, 2002; STECK *et al.*, 2015).

A etiologia autoimune do DM1 é marcada pela presença de autoanticorpos circulantes, específicos para as células β , desempenhando um papel importante na progressão de lesões autoimune. Os principais marcadores de humorais de agressão autoimune para o DM1 são os autoanticorpos: anti-ilhotas pancreáticas (ICA), anti-insulina (IAA), anti-descarboxilase do ácido glutâmico isoformas de massa molecular 65 kDa (GAD 65), anti-tirosina fosfatases (IA2 e IA2B) e anti-transportador de zinco (Znt8) (KELLY *et al.*, 2003; GROOP; POCIOT, 2014; SBD, 2016), sendo esses autoanticorpos detectáveis de 85 a 90% em indivíduos com DM1 no momento do diagnóstico (KELLY *et al.*, 2003).

Três mecanismos interligados são responsáveis pela destruição das células das ilhotas no DM1A: susceptibilidade genética, autoimunidade e agressão ambiental. O modelo da história natural sugere fases que começam com uma susceptibilidade genética (fase I); na qual os indivíduos geneticamente suscetíveis entram em contato com um agente externo/ambiental (fase II) podem desencadear a autoimunidade (fase III). Inicialmente os indivíduos com o sistema autoimune ativado mantem o nível de produção de insulina; durante a fase IV as anormalidades imunológicas persistem, então ocorre uma perda progressiva do -produção de insulina estimulada por glicose, apesar das concentrações normais de glicose plasmática. Na fase V, sinais clínicos da doença ficam evidentes, seguido de uma destruição em massa das células β (RABINOWE; EISENBARTH, 1984).

Embora este modelo tenha servido à comunidade científica como referência para pesquisas e melhor entendimento do DM1, ao longo dos anos sofreu modificações devido principalmente ao grande avanço das pesquisas na área genética (FIGURA 3) (ATKINSON, 2012).

FIGURA 3 - FASES DO DESENVOLVIMENTO DO DM1.

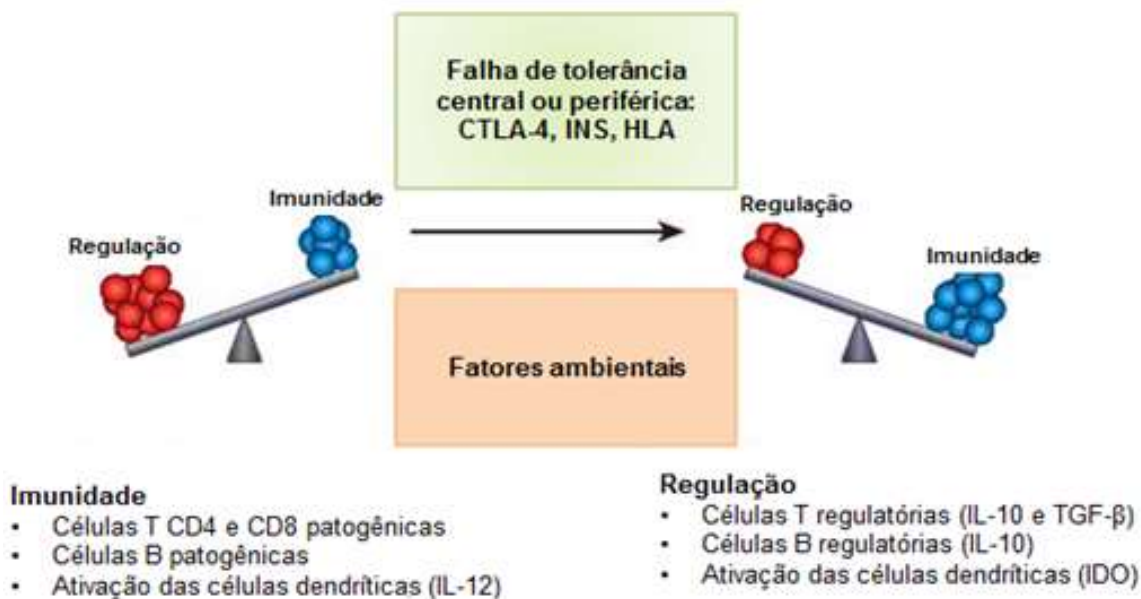


Modelo atual das fases do desenvolvimento do DM1, incluindo informações de pesquisas que elucidam o entendimento dos papéis exercidos pela genética, imunologia e fatores ambientais relacionados ao DM1. IAA-auto-anticorpos contra insulina; GADA-auto-anticorpos contra GAD; IA-A2-autoanticorpos contra IA-2; ICA-auto-anticorpos contra células da ilhota; FPIR- primeira fase de resposta à insulina; IVGTT – teste intravenoso de tolerância à glicose. FONTE: Adaptado de ATKINSON, 2012.

Indivíduos geneticamente susceptíveis, no momento que entrarem em contato com um gatilho ambiental, darão início ao processo autoimune, desencadeando uma queda linear da massa de células, desenvolvendo autoanticorpos, hiperglicemia até eventual perda de peptídeo C (CHATENOUD; BLUESTONE, 2007). Diferentes pesquisadores argumentam que a progressão da doença não é um processo linear, mas sim, apresenta um ritmo variado entre os pacientes (CHATENOUD; BLUESTONE, 2007).

Bonifácio e colaboradores (1999) e van Belle e colaboradores (2011) propõem uma versão mais detalhada desse modelo não-linear descrevendo o DM1 como uma doença “remitente-recorrente”. Os autores sugerem que ocorre um desequilíbrio entre as células T efectoras autorreativas e as células T reguladoras desenvolvido ao longo do tempo, levando a eventual diminuição das células β (BONIFACIO *et al.*, 1999; VAN BELLE; COPPIETERS; VON HERRATH, 2011), ilustrado na FIGURA 4

FIGURA 4 - EQUILÍBRIO DO SISTEMA IMUNOLÓGICO NA PATOGÊNESE DA DOENÇA.

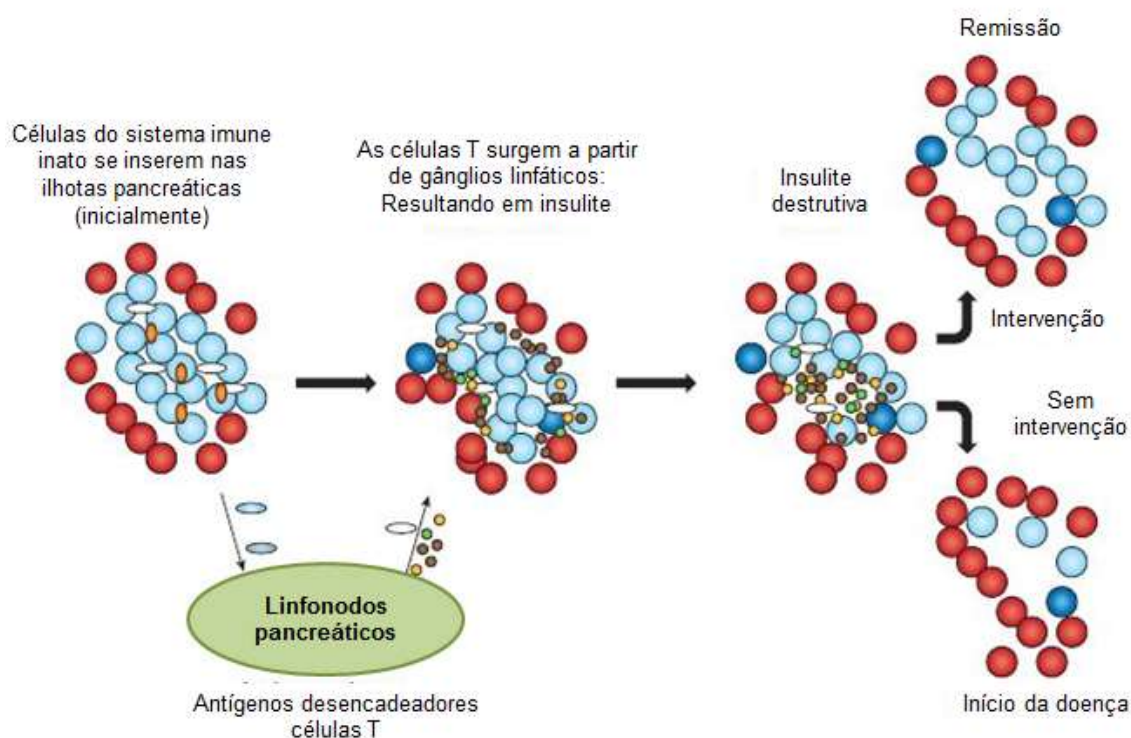


Esquema ilustrando o equilíbrio da regulação imune contra a patogênia, destacando alguns genes que podem influenciar o equilíbrio através da tolerância central ou periférica e dos efeitos ambientais que controlam o sistema imune. Os tipos principais de células que afetam o equilíbrio durante as respostas imunitárias são as interleucinas (IL) e IDO (indoleamina-2,3 dioxigenase). FONTE: Adaptado de BLUESTON; HEROLD; EISENBARTH, 2010.

Considerando esse desequilíbrio, após a administração de insulina exógena, há um efeito temporariamente contrário através de resposta proliferativa das células β , podendo ser traduzida numa fase transitória na produção de insulina tardia chamada *honeymoon* (“lua de mel”) (BONIFACIO *et al.*, 1999; VAN BELLE; COPPIETERS; VON HERRATH, 2011), conforme FIGURA 5.

A idade avançada, na qual a apresentação inicial da doença é menos grave, e baixos valores ou ausência dos autoanticorpos ICA ou IA-2 estão associados consistente e constantemente a mais profunda e longa remissão (CHASE *et al.*, 2004).

FIGURA 5 - IMUNOLOGIA DO DM1.



Um gatilho imunológico indefinido ocorre em um indivíduo com predisposição genética e inicia um processo imunológico. Os eventos iniciadores envolvem infiltração de células imunes inatas, os monócitos e células *natural killer* (NK) com células B autorreativas (elipse laranja) nas ilhotas pancreáticas. O sítio principal da apresentação de antígeno é encontrado no o linfonodo pancreático onde antígenos das ilhotas são apresentados por células apresentadoras de antígenos, as APCs (elipse branca) para as células T (pontos castanhos). As elipses em cor azul clara são APCs carregadas com antígenos das ilhotas. As células B (pontos verdes) e as células dendríticas podem estar entre as APCs. A infiltração celular das ilhotas continua ocorrendo, mas a insulite é desigual. Ilhotas com infiltração podem estar localizadas perto de ilhotas sem células. O processo visa especificamente às células B produtoras de insulina (círculos azul-claros), enquanto que outras células endócrinas (círculos vermelhos) dentro das ilhotas são poupadas. Nos linfonodos, o ciclo de apresentação de antígeno, ativação das células da imunidade adaptativa, permissão de células T efetoras continuam ocorrendo, sempre com a perda de células B ao longo do tempo. Há evidências de uma tentativa de regeneração de células B no meio da inflamação das ilhotas (círculos azul-escuros) (*honeymoon phase*). As células T reguladoras (pontos amarelos) podem conter esse processo num primeiro momento, mas não são capazes de inibir nos estágios finais. Com a perda contínua de células B a hiperglicemia pode ser detectada. Terapias imunológicas podem recuperar a capacidade de produção de insulina das células, que ainda não foram destruídas, apesar de se fazer necessária o uso da insulina, porém sem intervenção, a perda de células B continua trazendo danos traumáticos aos portadores de DM1. FONTE: Adaptado de BLUESTON; HEROLD; EISENBARTH, 2010.

Em resumo, embora os autoanticorpos derivados das células B possam refletir um prognóstico para autoimunidade, são provavelmente participantes ativos na resposta imune devido a sua capacidade de apresentar antígenos diabetogênicos para células T CD4 e CD8 (VAN BELLE; COPPIETERS; VON HERRATH, 2011).

Com a identificação e descrição de autoanticorpos em indivíduos com DM1 (NIERRAS; ATKINSON; GOLDSTEIN, 2010) em combinação com a crescente compreensão da susceptibilidade genética, vêm sendo possível prever quais pacientes irão desenvolver DM1 (BONIFACIO; ZIEGLER, 2010).

Contudo, algumas formas de DM1 não possuem etiologias conhecidas, como o DM1 subtipo B ou idiopático, que é caracterizado por supostos mecanismos lesivos sobre as células β e potencialmente sobre outros componentes do pâncreas endócrino e exócrino (VLAD; TIMAR, 2012). Pacientes portadores desse tipo de DM têm permanente insulinopenia e são propensos a cetoacidose, não havendo evidências de autoimunidade nem associação ao HLA; sendo esta forma de diabetes fortemente ligada à herança genética (ADA, 2015).

2.2 COMPLICAÇÕES ASSOCIADAS AO DM1

Através de estudos clínicos prospectivos acredita-se que as concentrações plasmáticas de glicose constituam o principal fator etiológico envolvido na patogênese dos danos microvasculares (THE-DIABETES-CONTROL-AND-COMPLICATIONS-TRIAL-RESEARCH-GROUP, 1993; WRITING TEAM FOR THE DIABETES; COMPLICATIONS TRIAL/EPIDEMOLOGY OF DIABETES; COMPLICATIONS RESEARCH, 2002; WHITE *et al.*, 2008; DIABETES *et al.*, 2009). Poderia se argumentar, que embora todas as células do corpo estejam expostas a elevadas concentrações de glicose plasmática em pacientes com DM1, nem todas as células desenvolvem alterações associadas à injúria vascular (MELENDEZ-RAMIREZ; RICHARDS; CEFALU, 2010). As células do endotélio capilar da retina, as células mesangiais no glomérulo e as células de *Schwann* dos nervos periféricos estão vulneráveis às altas concentrações de glicose porque não são capazes de regular eficientemente o transporte da glicose para o interior da célula, resultando em hiperglicemia intracelular, a qual induz mecanismos intracelulares que resultam em dano (BROWNLEE, 2001). Os mecanismos pelos quais a glicose induz as alterações bioquímicas e metabólicas que causam as anormalidades nestes tecidos, tais como aumento da

permeabilidade endotelial resultando em extravasamento de plasma e proteínas, não são completamente compreendidos (BROWNLEE, 2001).

Além do controle glicêmico, outros fatores são relevantes para o desenvolvimento de complicações relacionadas ao DM1, como o tempo de diabetes, idade, histórico familiar, dislipidemia e hipertensão (GLASTRAS; MOHSIN; DONAGHUE, 2005).

Algumas complicações relacionadas ao DM1 mais especificamente em crianças podem ser citadas (IDF, 2013):

- Baixas doses de insulina levam ao crescimento insuficiente e à puberdade tardia;
- Retinopatia: resultando em perda da visão levando à cegueira;
- Nefropatia diabética: causando hipertensão e insuficiência renal;
- Neuropatia: causando dor, fraqueza muscular, parestesia e disfunção autonômica ou disautonomia;
- Complicações macrovasculares: podendo causar doenças cardíacas dos mais variados tipos e níveis, acidente vascular cerebral (AVC), além da doença vascular periférica com perda de membros.

As complicações do diabetes são um problema de saúde, que ocasionam morbidade e mortalidade e piora significativa da qualidade de vida por incapacitação e diminuição da sobrevida nos afetados pelo DM1. O controle da glicemia através da educação intensiva e imediato tratamento após o diagnóstico reduz de maneira significativa as complicações e sua severidade (IDF, 2013).

2.2.1 Cetoacidose diabética

A cetoacidose diabética (CAD) é causada por uma redução efetiva na insulina circulante, associada ao aumento dos hormônios contra-regulatórios incluindo glucagon, catecolaminas, cortisol e hormônio do crescimento, levando ao aumento da produção de glicose pelo fígado e rins e à uma diminuição no uso da glicose periférica, resultando em hiperglicemia e hiperosmolaridade. O aumento da lipólise com formação dos corpos cetônicos (ácido acetoacético e

ácido β -hidroxibutírico), provoca cetonemia e acidose metabólica. A hiperglicemia e acidose resultam em diurese osmótica e desidratação, causando obrigatoriamente a perda de eletrólitos (DUNGER; SPERLING; ACERINI; BOHN; DANEMAN; DANNE; GLASER; HANAS; HINTZ; LEVITSKY; SAVAGE; TASKER; WOLFSDORF; EUROPEAN SOCIETY FOR PAEDIATRIC; *et al.*, 2004).

A cetoacidose diabética (CAD) ocorre quando há deficiência de insulina, sendo detectada mais frequentemente no momento do diagnóstico em crianças e adolescentes com diabetes, usualmente na fase aguda da doença (IDF, 2013).

Os critérios bioquímicos estabelecidos pela IDF (2013) e ISPAD (2013) para CAD são:

- Hiperglicemia: glicose plasmática ao acaso > 200 mg/dL;
- pH venoso <7,3;
- Cetonúria e cetonemia.

Os sintomas clássicos de CAD são hiperglicemia, acidose e desidratação (WHITE, 2000). Os sintomas mais severos são vômitos, dores abdominais, faces coradas, cheiro doce (cetótico, hálito com odor de frutas) ao respirar, desidratação e contínua poliúria, mudanças na respiração começando rápido e superficial, passando a suspiros profundos (respiração de *Kussmaul*), até diminuir o nível de consciência podendo levar o paciente ao coma (WHITE, 2000; IDF, 2013).

Os princípios gerais para controle da cetoacidose diabética incluem (WHITE, 2000; KITABCHI *et al.*, 2001; IDF, 2013):

- Função cardiovascular adequada, garantindo oxigenação e circulação apropriadas;
- Correção do desequilíbrio eletrolítico e da acidose metabólica;
- Redução gradual da glicemia e osmolaridade do plasma;
- Avaliar e tratar as causas básicas da cetoacidose, por exemplo uma infecção;
- Monitorar atentamente e tratar qualquer complicação de CAD, através de sinais vitais e acompanhamento neurológico.

Os protocolos de tratamento para a cetoacidose diabética pediátrica variam consideravelmente entre deferentes centros (DUNGER; SPERLING; ACERINI; BOHN; DANEMAN; DANNE; GLASER; HANAS; HINTZ; LEVITSKY; SAVAGE; TASKER; WOLFSDORF; ESPE; *et al.*, 2004; WOLFSDORF *et al.*, 2006; WOLFSDORF *et al.*, 2009). O protocolo ideal para administração de fluido intravenoso constitui uma área de controvérsia, principalmente devido a possibilidade de associação entre a taxas de infusão endovenosa com edema cerebral, a mais comum e mais temida complicação da CAD em crianças. A manifestação clínica do edema cerebral potencialmente fatal ocorre em cerca de 0,3 a 1,0% nos episódios de CAD (EDGE *et al.*, 2001; GLASER *et al.*, 2001).

O edema cerebral é o acúmulo de água nos espaços intra e extracelular do cérebro que podem ser de dois tipos: edema vasogênico e edema citotóxico (KLATZO, 1967). No edema vasogênico ocorre ruptura das junções endoteliais da barreira entre o cérebro e o sangue, resultando no extravasamento de proteína intravascular e líquido no espaço intersticial cerebral. A maior parte deste fluido ultrafiltrado acumula na matéria branca por causa de sua maior complacência (RAPOPORT, 1978). No edema citotóxico, as junções endoteliais da barreira entre o cérebro e o sangue permanecem intactos e a causa do edema cerebral é a retenção celular de sódio e água resultante da alteração do metabolismo energético e da bomba Na^+/K^+ -ATPase. Microscopicamente, o edema celular consiste do inchaço dos astrócitos com redução correspondente do espaço extracelular. Tasker e colaboradores ao avaliarem evidências clínicas de estudos neuropatológicos em pacientes pediátricos em cetoacidose diabética sugerem que o edema cerebral é de origem vasogênica (TASKER; ACERINI, 2014).

Os sintomas e sinais do edema cerebral são vários, porém os mais comuns são: aparecimento de dor de cabeça, diminuição gradual ou deterioração no nível de consciência, desaceleração imprópria de pulso, e aumento da pressão sanguínea (ROSENBLOOM, 1990).

A cetoacidose constitui a maior causa de morbidade e mortalidade em crianças com DM1 (DUNGER; SPERLING; ACERINI; BOHN; DANEMAN; DANNE; GLASER; HANAS; HINTZ; LEVITSKY; SAVAGE; TASKER; WOLFSDORF; EUROPEAN SOCIETY FOR PAEDIATRIC; *et al.*, 2004). Há

relatos de 15 a 67% de episódios de cetoacidose no momento do diagnóstico (WHITE, 2000; REWERS *et al.*, 2002; DUNGER; SPERLING; ACERINI; BOHN; DANEMAN; DANNE; GLASER; HANAS; HINTZ; LEVITSKY; SAVAGE; TASKER; WOLFSDORF; EUROPEAN SOCIETY FOR PAEDIATRIC; *et al.*, 2004). A mortalidade está relacionada predominantemente ao edema cerebral (DUNGER; SPERLING; ACERINI; BOHN; DANEMAN; DANNE; GLASER; HANAS; HINTZ; LEVITSKY; SAVAGE; TASKER; WOLFSDORF; EUROPEAN SOCIETY FOR PAEDIATRIC; *et al.*, 2004).

A prevenção da cetoacidose diabética não está relacionada apenas com a correta administração de insulina, uma vez que está associada à eventos precipitantes comuns como, por exemplo, uma infecção (BRINK *et al.*, 2014).

2.3 BIOMARCADORES ASSOCIADOS AO DIABETES *MELLITUS* TIPO 1

Embora seja difícil comparar Europa e Estados Unidos com o resto do mundo, a causa específica de mortalidade relacionada ao DM1 mudou no início do século XXI, se comparada às últimas décadas do século XX. A mortalidade devido a complicações metabólicas agudas, principalmente cetoacidose, condição de risco de vida, é ainda inaceitavelmente alta em crianças com acesso ao diagnóstico e abordagens terapêuticas amplamente disponíveis em países industrializados. Embora as taxas de mortalidade devido a complicações crônicas também mostram sinais de diminuição, se tem pouca informação sobre a evolução em países em desenvolvimento (ABI KHALIL *et al.*, 2012).

No DM1, o papel do controle glicêmico na contribuição das complicações crônicas está claro e é bem estabelecido através de observações e estudos clínicos prospectivos. As complicações estão relacionadas com exposição do indivíduo à hiperglicemia, sendo um dos marcadores de controle glicêmico, a hemoglobina glicada (HbA1c) (MELENDEZ-RAMIREZ; RICHARDS; CEFALU, 2010).

Hemoglobina glicada (HbA1c) é a medida “padrão ouro” para o controle glicêmico no diabetes. A maioria dos pacientes não gestantes devem manter a HbA1c < 7%, pois esta concentração foi relacionada a menor complicação

microvascular, sendo que o tratamento precoce da hiperglicemia pode reduzir as complicações macrovasculares no futuro (ADA, 2016).

A quantificação da HbA1c deve ser realizado rotineiramente a cada 3 meses na avaliação de pacientes diabéticos, independentemente do tipo (ADA, 2016). O laboratório responsável pela dosagem desse biomarcador, deve seguir um protocolo certificado pelo *National Glycohemoglobin Standardization Program* (NGSP) (ADA, 2016).

Um monossacárido de ocorrência natural, estruturalmente semelhante à glicose, o 1,5 anidroglicitol (1,5AG), foi aprovado pelo FDA em 2003 como um marcador laboratorial de curto prazo para excursões glicêmicas, capturando picos de hiperglicemia pós-prandial após 1 dia com efeito perdurando até 2 semanas (BUSE *et al.*, 2003; NGUYEN *et al.*, 2007). O 1,5AG é filtrado nos rins e 99,9% sofre reabsorção tubular (BUSE *et al.*, 2003). Quando a concentração de glicose no soro excede o limiar renal (cerca de 180 mg/dL), a reabsorção do 1,5-AG é inibida competitivamente pela glicose, promovendo a excreção urinária de 1,5-AG e consequente redução nas concentrações séricas deste marcador (NERBY; STICKLE, 2009).

Para rastrear possíveis complicações renais (nefropatia), exame de urina deve ser realizado anualmente em crianças com DM1, seguindo uma das duas recomendações feita pela ISPAD (2014), que pode ser a coleta da primeira urina da manhã, para ver a razão entre albumina/creatinina ou uma coleta de urina cronometrada para verificar as taxas de excreção de albumina (DONAGHUE *et al.*, 2014). Contudo, devem ser excluídas outras causas relacionadas ao aumento da excreção de proteína, tais como glomerulonefrite, infecções do trato urinário, infecções intercorrentes e proteinúria ortostática (GLASTRAS; MOHSIN; DONAGHUE, 2005).

Segundo White e colaboradores (2000), a medida da concentração plasmática do peptídeo C, determina a quantidade de células β preservadas. Foi mostrado que crianças menores com frequentes episódios de cetoacidose tem concentrações menos elevadas de peptídeo C quando comparados a outros grupos de diferentes idades, sugerindo que em crianças menores com ocorrências frequentes de CAD as concentrações do peptídeo C refletem a diminuição da função das células β (WHITE, 2000).

Estudos populacionais estimam que 14-45% das crianças com DM1 possuem dois ou mais fatores de risco para doença cardiovascular (RODRIGUEZ *et al.*, 2006; SCHWAB *et al.*, 2006; MARGEIRSDOTTIR *et al.*, 2008), e a prevalência de risco aumenta com a idade (SCHWAB *et al.*, 2006). Assim, toda criança diagnosticada com DM1 com idade ≥ 10 anos deve realizar a quantificação do perfil lipídico após estabilização da glicemia, para verificar possível dislipidemia. Na presença de dislipidemia, monitoramento anual é razoável. Se os valores de LDL-C estiverem dentro dos intervalos aceitáveis de risco (<100 mg/dL), o perfil lipídico deve ser repetido a cada 3-5 anos (ADA, 2016; AMERICAN DIABETES, 2016)).

Alguns estudos (RIDKER *et al.*, 2000; YUDKIN *et al.*, 2000; TARGHER *et al.*, 2001) mostram que indivíduos jovens portadores de DM1 com bom controle glicêmico e sem qualquer evidência clínica de complicações micro ou macrovasculares, tem um aumento acentuado de níveis séricos de IL-6 (interleucina-6), quando comparados ao grupo saudável. A IL-6 desempenha um papel importante para iniciar ou acelerar inflamações crônicas, constituindo um marcador de processo inflamatório sem especificidade para uma determinada patologia.

Apesar de estudos detalhados de vários tipos de auto-anticorpos envolvidos na fisiopatologia do DM1, é difícil prever o momento em que clinicamente a doença irá se manifestar, destacando a importância e necessidade de biomarcadores adicionais (CABRERA *et al.*, 2016).

2.4 TRATAMENTO DO DM1

Em 1921 com a descoberta da insulina foi inicialmente acreditou-se que a cura do diabetes *mellitus* havia sido encontrada, um conceito errôneo obviamente (ATKINSON; EISENBARTH, 2001), porém esse foi o primeiro grande passo para o tratamento relacionado à doença.

A insulina é um polipeptídeo com massa molecular de 5800 Dalton (Da), secretada por células β . A insulina é formada por duas cadeias, a cadeia A com 21 aminoácidos e uma ponte dissulfeto intracadeia, e a cadeia B com 30 aminoácidos (RAMESAN; SHARMA, 2009), conforme FIGURA 6.

O pâncreas secreta a insulina de duas maneiras: basal e *bolus*. A basal é uma secreção constante de insulina que permanece em baixas concentrações no sangue o tempo todo, ou seja, é produzida de forma contínua, enquanto o termo *bolus*, refere-se a quantidades maiores de insulina que são liberadas na circulação sanguínea em momentos de maior necessidade, como por exemplo, após as refeições ou quando há aumento de açúcar no sangue (SBD, 2016).

Algumas limitações clínicas da insulina tradicional levaram ao desenvolvimento de análogos (DANNE *et al.*, 2014), ou seja, outras formas de insulina. Os análogos resultam de alterações na sequência de aminoácidos da insulina, buscando melhorar as propriedades farmacodinâmicas como absorção, distribuição, metabolismo e excreção (LIU *et al.*, 2016). Os análogos são produzidos biossinteticamente através de técnicas recombinantes com reduzida imunogenicidade, eliminando qualquer complicação terapêutica, como alergia, resistência à insulina ou lipodistrofia imunomediada, além de ter disponibilidade altamente purificada (MALIK; TAPLIN, 2014) sendo substancialmente mais caros (IDF, 2013).

Os análogos de insulina desenvolvidos podem ser de ação rápida: Asparte, glulisina e lispro, possuem tempo de ação rápida, mas com curta duração quando comparados a insulina regular (DANNE *et al.*, 2014). A glargina e a detemir são análogos de ação prolongada, com propriedades de absorção e desaceleração, e atua por até 24 horas no organismo, garantindo uma glicemia mais estável (LIU *et al.*, 2016).

vezes ao dia), e a NHP, de ação intermédia, uma ou duas vezes ao dia (à noite, ou de manhã e à noite).

O quadro abaixo descreve mais detalhadamente as características dos diferentes tipos de insulina recomendados pela ISPAD, IDF e SBD para crianças e adolescentes (IDF, 2013; DANNE *et al.*, 2014; SBD, 2014, 2016).

QUADRO 3 - AÇÃO DOS TIPOS DE INSULINA

TIPO DE INSULINA		INÍCIO DA AÇÃO	PICO DE AÇÃO	DURAÇÃO DA AÇÃO	APLICAÇÃO
Rápida (análogas)	Apidra® (Glulisina) Humalog® (Lispro) NovoRapid® (Asparte)	15-30 minutos	1-2 horas	3-5 horas	Sempre antes das refeições
Regular	Humulin® Novolin®	30-6 minutos	2-4 horas	5-8 horas	30 minutos antes das refeições
NHP	Humulin® N Novolin® N	2-4 horas	4-10 horas	12-24 horas	30 minutos antes das refeições
Ação longa (análogas)	Levemir® (Detemir)	1-2 horas	6-12 horas	6 a 8 horas	Uma ou duas vezes ao dia
	Lantus® (Glargina)	2-4 horas	Relativamente sem picos	Até 24 horas	
Pré-mistura	Combinação de Rápida e longa duração ou regular e longa duração (25/75 ou 30/70)	30 minutos	4-12 horas	8-24 horas	30 minutos antes das refeições

O início da ação é o tempo necessário para a insulina começa a agir após a injeção; o pico é a hora em que a insulina atinge o ponto máximo no que diz respeito à redução de glicemia; e a duração é o tempo em que a insulina age no organismo. FONTE: Adaptado IDF, 2013; ISPAD 2014; SBD, 2016.

A bomba de insulina é uma alternativa interessante, confiável e segura para o paciente, principalmente para crianças e adolescentes. Através de um pequeno cateter auto-inserido, entrega insulina de ação rápida continuamente por infusão no tecido subcutâneo ao longo do dia, sem necessidade de injeções periódicas (MALIK; TAPLIN, 2014).

Transplante de ilhotas pancreáticas representa uma alternativa atraente e constitui uma técnica promissora de terapia gênica para o controle da glicemia.

As ilhotas podem ser simplesmente infundidas através de um cateter no fígado (ATKINSON; EISENBARTH, 2001).

2.5 POLIMORFISMOS DE ÚNICO NUCLEOTÍDEO (SNPS)

Com a conclusão do projeto genoma humano, a atenção voltou-se rapidamente para o estudo da variação genética do indivíduo. A fonte mais abundante de variação genética no genoma humano é representada pelo *single nucleotide polymorphisms*, ou mais comumente chamado SNPs, que podem representar diferenças hereditárias interindividuais em fenótipos complexos (SUH; VIJG, 2005). Os SNPs são posições únicas de pares de bases no DNA genômico em que diferentes sequências ou alelos, existem em indivíduos normais em uma população, onde o alelo menos frequente tem uma porcentagem igual ou superior a 1%. Contudo, as bases variantes de inserção ou deleção simples (*indels*) não são consideradas SNPs (BROOKES, 1999).

Com o mapeamento do genoma humano tornou-se possível desenvolver mapas de haplótipos, a fim de melhor definir a variabilidade dos SNPs humanos. O mapa de haplótipos ou HapMap (www.hapmap.org) permite encontrar genes e variações genéticas que afetam a saúde e a doença (SOBRINO; BRION; CARRACEDO, 2005).

Estudos de associação entre os SNPs e a doenças como cardiopatias, hipertensão, diabetes e câncer, constituem um grande potencial para aplicação clínica direta, com a identificação de novos marcadores genéticos, além de mais precisos, para fins de diagnóstico, prognóstico e possíveis alvos terapêuticos. Nos últimos anos, muitos polimorfismos descritos foram associados aos diferentes tipos de diabetes (LANDER; SCHORK, 1994; SUH; VIJG, 2005; YANG *et al.*, 2011; TANG *et al.*, 2012).

2.5.1 Polimorfismos associados ao diabetes *mellitus* tipo 1

Em geral, o DM1 está associado a características genéticas complexas, ou seja, não apenas múltiplos *loci* genéticos contribuem para sua

susceptibilidade, mas fatores ambientais desempenham papel importante na determinação do risco. Várias são as evidências que tanto a susceptibilidade quanto a resistência à doença, são herdadas geneticamente (POCIOT; MCDERMOTT, 2002).

Após um longo histórico de pesquisa na avaliação de genes ligados à doença, duas regiões cromossômicas associadas ao DM1 surgiram com evidências significativas, sendo a região do HLA, presente no cromossomo 6p21.3 e a região onde se localiza o gene da insulina (*INS*), localizado no cromossomo 11p15 (POCIOT; MCDERMOTT, 2002).

Polimorfismos associados ao DM1 tem 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 tem sido utilizados para estratificar risco futuro em pessoas com genótipos de risco HLA (STECK *et al.*, 2012).

Lempainen e colaboradores (LEMPAINEN *et al.*, 2015) mostraram que o polimorfismo rs45450798 no gene *PTPN2*, afeta a taxa de progressão da autoimune das células β entre crianças com HLA de classe II suscetível ao DM1. A homozigose do alelo de menor frequência (G) foi claramente associado a maior risco para o DM1 por Smyth e colaboradores (SMYTH *et al.*, 2008). Outros polimorfismos, como o rs2476601 (*PTPN22*) e rs689 (*INS*), foram fortemente associados ao desenvolvimento dos sintomas clínicos do DM1. Além disso, o rs689 no gene *INS*, mostrou-se associado ao aparecimento de auto-anticorpos e ao efeito humoral das células β (LEMPAINEN *et al.*, 2015).

Redondo e colaboradores mostraram (2016) que o genótipo rs7903146TT no gene *TCF7L2*, é mais frequente em pessoas jovens não obesas portadores de DM1 sem um genótipo de HLA de alto risco para a

doença, sugerindo então a susceptibilidade desse genótipo para DM1 em crianças.

Os polimorfismos dos genes *PTPN22* e *IFIH1* afetam o início da autoimunidade das células β . Estes resultados indicam que associações genéticas de várias vias incluem também fases posteriores do processo e não apenas diferentes fatores iniciais que induzem a auto-imunidade e que a patogênese do DM1 é constituída de várias vias diferentes que diferem entre os indivíduos (LEMPAINEN *et al.*, 2015).

Estas descobertas indicam que as associações genéticas de várias vias incluem também fases posteriores no processo do que apenas diferentes factores iniciais que induzem a auto-imunidade.

Foi demonstrado que o gene *apoM* está envolvido em funções de resposta imune, como resposta anti-inflamatória e regulação imunológica (HUANG, X. S. *et al.*, 2007), podendo estar envolvido na patogênese do DM1 (WU *et al.*, 2009).

2.6 GENE APOLIPOPROTEÍNA M

Uma análise, de aproximadamente 2.500 polimorfismos localizados na região do HLA, demonstrou que o gene *apoM*, pode estar associada ao desenvolvimento do DM1 (HUANG, L. Z. *et al.*, 2015).

O gene que codifica a apolipoproteína M (*apoM*) em humanos está localizado na região de classe III do MHC, no cromossomo 6p21.3 (FIGURA 7). O gene da *ApoM* é composto por seis *exons* e cinco *introns*, compreendendo uma região genômica de aproximadamente 2,3 kb. O cDNA da *ApoM* é composto por 734 pares de bases e codifica uma proteína com 188 resíduos de aminoácidos, sendo que os primeiros 20 resíduos constituem um segmento hidrofóbico com características de peptídeo sinal (XU, N.; DAHLBACK, 1999; HU, Y. W.; ZHENG; WANG, 2010).

FIGURA 7 – LOCALIZAÇÃO DO GENE DA APOM NO CROMOSSOMO.



O gene APOM está localizado no cromossomo 6, na região p21.3, (traço em vermelho).
 FONTE: UCSC Genome Browser on Human Dec. 2013 (GRCh38/hg38) Assembly

Vários genes, que flanqueiam o gene *ApoM*, apresentam funções biológicas desconhecidas, tais como as linfotoxinas α e β , BAT3 e BAT4, além de genes responsáveis por codificar o fator de necrose tumoral (TNF), o que indica sua associação a muitos processos inflamatórios (REN *et al.*, 2015).

A estrutura do gene *apoM* é preservada entre as mais variadas espécies, como camundongo (*Mus musculus*), orangotango (*Pongo pygmaeus*), chimpanzé (*Pan troglodytes*), cães (*Canine familiaris*), peixe-zebra (*Danio rerio*) e baiacu (*Tetraodon nigroviridis*). A presença generalizada em espécies distantes reforça a importância da função biológica desse gene (DAHLBACK; NIELSEN, 2006).

Em humanos, o gene *apoM* é superexpresso no fígado e rins, onde é fortemente regulado por fatores transcricionais, hormônios e citocinas, (XU, N.; DAHLBACK, 1999; CHRISTOFFERSEN *et al.*, 2006; HU, Y. W.; ZHENG; WANG, 2010). A apoM está predominantemente associada à partícula HDL (*high density lipoprotein*; lipoproteína de densidade alta) influenciando o transporte reverso de colesterol (WOLFRUM; POY; STOFFEL, 2005), mas também está associada a outras classes de lipoproteínas, incluindo quilomicrons (Qm) e LDL (*low density lipoprotein*). Em humanos, a apoM é a menor apolipoproteína sendo encontrada em apenas 5% do total de partículas HDL e 2% do total de LDL (XU, N.; DAHLBACK, 1999).

Estudos indicam que polimorfismos na região promotora do gene *apoM*, em particular os rs9404941 (T-855C), rs805296 (T-778C) e rs805297 (C-1065A), estão associados à susceptibilidade à artrite reumatoide (AR) (HU, H. J. *et al.*, 2011), acidente vascular cerebral (AVC) (JIAO *et al.*, 2007; ZHAO *et al.*, 2011), DM1 (WU *et al.*, 2009), DM2 (NIU *et al.*, 2007; ZHOU *et al.*, 2011) e doença arterial coronariana (DAC) (XU, N.; HURTIG; *et al.*, 2004).

Zhang e colaboradores (2007) demonstraram que tanto a insulina quanto a glicose poderiam inibir a expressão de *apoM*. A redução na concentração plasmáticas da apoM, além da diminuição significativa da expressão hepática

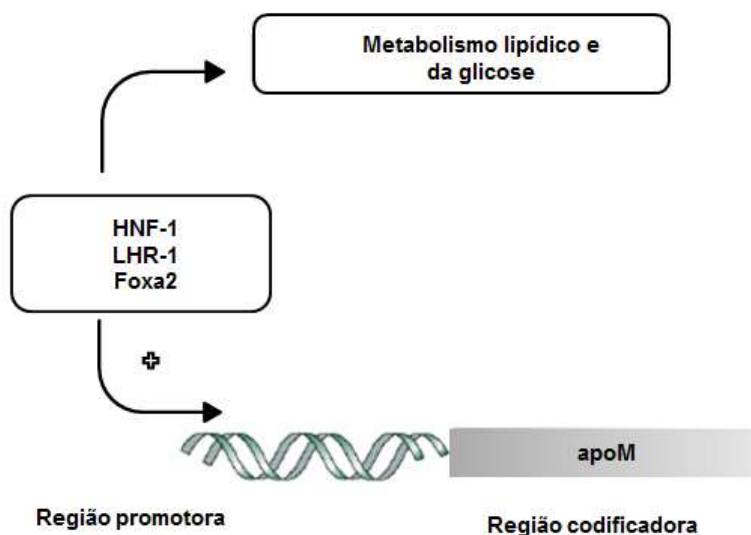
do gene, sugerindo a supressão da expressão de *apoM* em camundongos diabéticos e obesos, pode estar relacionada principalmente com a hiperglicemia, mais que com a depleção ou resistência à insulina.

2.6.1 Regulação da expressão do gene *apoM*

Em humanos, a expressão do mRNA (ácido ribonucleico mensageiro) da *apoM* é mais forte em hepatócitos, seguido pelas células tubulares epiteliais renais. Já em outros tecidos a expressão da *apoM* é baixa (XU, N.; DAHLBACK, 1999; FABER *et al.*, 2004; ZHANG, X. Y. *et al.*, 2004).

A expressão do gene *apoM* é diretamente regulada por fatores de transcrição que, controlam o metabolismo lipídico hepático, tais como: fator nuclear do hepatócito (HNF-1 α), receptor fígado homólogo-1 (LRH-1) e o *forkhead box A2* (Foxa2), anteriormente designado de fator nuclear hepático 3 β (VENTECLEF *et al.*, 2006; WOLFRUM *et al.*, 2008). Isto poderia indicar que o gene *apoM* está ligado ao perfil lipídico e a homeostase da glicose (NIELSEN *et al.*, 2009), conforme ilustrado na FIGURA 8.

FIGURA 8 – FATORES ASSOCIADOS À EXPRESSÃO DO GENE DA *apoM*.



A expressão da *apoM* é regulada por fatores de transcrição que controlam o metabolismo lipídico hepático e o metabolismo da glicose. A região promotora do gene possui sítios de ligação para HNF1 α , LRH-1 e Foxa2, indicando que a expressão de *apoM* poderia estar relacionada aos metabolismos da glicose e de lipídios.

FONTE: Adaptado de NIELSEN *et al.*, 2009.

O promotor do gene *apoM* contém uma sequência de DNA conservada, que se liga ao fator de transcrição do hepatócito-1 α (HNF-1 α) (RICHTER *et al.*, 2003). HNF-1 α é o principal regulador da expressão gênica hepática (NIELSEN *et al.*, 2009), além de desempenhar um papel importante na a regulação da expressão de genes em células β , intestino, rins e fígado (RICHTER *et al.*, 2003).

Em camundongos com deficiência completa de HNF-1 α a expressão do gene *apoM* é praticamente abolida (RICHTER *et al.*, 2003; FABER *et al.*, 2004), e a haploinsuficiência está associada com reduzidas concentrações plasmáticas de apolipoproteína apoM (NIELSEN *et al.*, 2009). Além disso, Richter e colaboradores (2003) mostraram que 11 pacientes com MODY 3 (*Maturity-Onset Diabetes of the Young*), ou seja, que apresentaram mutação deletéria no gene HNF-1 α em heterozigose, tiveram uma redução de aproximadamente 36% na concentração plasmática de apoM através da técnica de *western blotting*. Contudo, estes resultados, utilizando um número amostral maior, não foram confirmados por Skupien e colaboradores (2007). Observou-se também, que camundongos com deficiência desse fator de transcrição, possuem anormalidades graves nos rins, pâncreas, além da função hepática diminuída, prejudicando a síntese de colesterol, o metabolismo do HDL e a homeostase da glicose (SHIH *et al.*, 2001).

O LRH-1 (receptor fígado homólogo-1) foi o primeiro receptor nuclear descrito envolvido na regulação da transcrição do gene *apoM*; (HU, Y. W.; ZHENG; WANG, 2010). Este receptor regula diretamente a expressão de *apoM* (HUANG, L. Z. *et al.*, 2015) sendo que a sua ausência resulta no silenciamento do gene *apoM* (VENTECLEF *et al.*, 2008). Análises de bioinformática revelaram a presença de vários supostos sítios de ligação para LRH-1 na região promotora, no entanto, apenas um sítio localizado na região a montante (-83 a -67) do local de início da transcrição foi demonstrado funcional por ensaios *in vitro* e *in vivo* (VENTECLEF *et al.*, 2008).

O *forkhead box protein A2* (*Foxa2*) é um fator de transcrição envolvido no desenvolvimento pancreático e hepático através da regulação da homeostase da glicose no fígado e em células β (HU, Y. W.; ZHENG; WANG, 2010). Wolfrum e colaboradores (WOLFRUM *et al.*, 2008) demonstram que a expressão de *apoM* e pré- β -HDL estavam diminuídas em camundongos

obesos, devido a inativação de Foxa2, acompanhadas de um estado de hiperinsulinemia. Estudos (WOLFRUM *et al.*, 2003; NIELSEN *et al.*, 2009) mostram que a insulina plasmática inibe o fator de transcrição Foxa2 por exclusão nuclear através de sua fosforilação, contribuindo para a redução da expressão de genes regulados por Foxa2 (WOLFRUM *et al.*, 2003), inclusive o gene *apoM*. Em jejum, o fator de transcrição ativa a transcrição de genes envolvidos no metabolismo lipídico e cetônico (WOLFRUM *et al.*, 2003). A prevenção da fosforilação de Foxa2 através do *design* de drogas específicas, que possam inibir a fosforilação de Foxa-2, mostrou-se uma abordagem terapêutica eficaz para o tratamento de algumas formas de DM (WOLFRUM *et al.*, 2003; WOLFRUM *et al.*, 2004).

2.7 PERSPECTIVAS

Numa época de rápida evolução tecnológica, grandes avanços no tratamento de pacientes com DM1 foram e estão sendo realizadas, como por exemplo, a bomba de insulina, grande facilitadora para um melhor monitoramento da glicose (JACOBSEN; SCHATZ, 2016). Há um esforço para melhorar biotecnologicamente as bombas de insulina, pois a melhor compreensão da função e fisiologia das células β , poderá ser o caminho para produção do pâncreas artificial ou sistema de circuito fechado, que imita a funcionalidade das células β , pois esse sistema tem como objetivo melhorar o controle da glicose, simulando a funcionalidade das células β (JACOBSEN; SCHATZ, 2016; THABIT; HOVORKA, 2016).

Várias abordagens inovadoras da bioengenharia são aplicadas em terapias do DM1, principalmente baseados em células, como microesferas e nanopartículas para liberação controlada de insulina, além de dispositivos de câmara de difusão para imunisolamento e hidrogéis para transplante de células β (LIU *et al.*, 2016).

Não apenas busca por novos e melhores fármacos chama a atenção dos pesquisadores ao estudar o diabetes, a terapia gênica, tem se mostrado promissora ao promover níveis normais de glicemia no sangue (euglicemia) de pacientes diabéticos (ATKINSON; EISENBARTH, 2001), além de pesquisas

com células tronco. Vanikar e colaboradores (2016) mostraram que o transplante de células tronco é tão seguro e tem melhor custo-benefício se comparado ao uso contínuo de insulina ou ao transplante de ilhotas pancreáticas ou de pâncreas propriamente dito.

As pesquisas das últimas décadas têm esclarecido muitos mecanismos fisiopatológicos envolvidos no desenvolvimento do DM1, sendo a tradução das novas descobertas tratamentos mais eficaz, contudo o esforço contínuo vem sendo empregado no desenvolvimento de novos moduladores imunes, pois a questão do metabolismo, na criação de tratamentos regeneradores das células β combinado com diferentes terapias, reforça que a terapia autoimune para o DM1 está próximo (PERAKAKIS; MANTZOROS, 2016), pois nesse complexo jogo chamado DM1, pesquisadores são instigados a continuar a busca de uma cura biológica (JACOBSEN; SCHATZ, 2016).

Embora, a descoberta da insulina e desenvolvimento da insulina humana recombinante e análogos, bombas sofisticadas e sensores como terapias para o DM1 representam coletivamente um avanço terapêutico formidável. Contudo, insulina não é a cura, e o DM1 permanece uma doença irreversível e progressiva, com complicações que resultam em risco à vida. Desta forma, existe uma enorme necessidade de continuar os estudos em estratégias primárias e secundárias, bem como na melhora das modalidades de tratamento. Mas antes da implementação de modalidades de prevenção, especialmente para os que apresentam risco significativo, biomarcadores e testes diagnósticos que indiquem acuradamente o desenvolvimento eminente e a progressão do DM1 precisam ser estabelecidos (WATKINS *et al.*, 2014).

Sem dúvida, os estudos que vem sendo realizados têm ajudado muito no conhecimento da fisiopatologia do DM1, o que vem facilitando e a previsão de futuros casos da doença (ATKINSON; EISENBARTH, 2001) e melhorando o prognóstico dos pacientes.

O DM1 usualmente ocorre em indivíduos com susceptibilidade genética subsequentemente expostos a fatores de risco ambientais. Embora, apenas 10% dos indivíduos com DM1 apresentem história familiar positiva, esta predisposição genética coloca os parentes de primeiro grau em um risco 20 vezes maior quando comparados ao risco da população em geral em

desenvolver DM1 (TILLIL; KOBBERLING, 1987; BONIFACIO; ZIEGLER, 2010; SIMELL; WINTER; SCHATZ, 2010).

Embora muitos *loci* tenham sido associados ao DM1, poucos, de fato, foram identificados como específicos à patologia (TODD, 1999), o que reforça a característica poligênica da doença. Estudos genéticos relacionados ao DM1 necessitam replicações em diferentes populações para confirmar o efeito de risco ou proteção, com a combinação genética característica e as vezes única, da população em estudo (GILLESPIE, 2006).

3 MATERIAL E MÉTODOS

Este projeto foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Paraná – Setor de Ciências da Saúde/SCS e aprovado sob o Protocolo CEP-HC Nº 071. EXT.025/2003-02 (ANEXO 1).

3.1 AMOSTRAS

As amostras biológicas de 148 crianças portadoras de DM1 foram obtidas durante os exames de rotina, conforme o protocolo do serviço de atendimento aos pacientes do laboratório de Análises Clínicas do HC (Unidade de Endocrinologia Pediátrica do Hospital de Clínicas da UFPR- UEP), não sendo necessária coleta específica para este projeto. As amostras de 169 crianças pertencentes ao grupo controle saudável, sem diabetes, foram obtidas de voluntários de escolas municipais da região metropolitana de Curitiba, após consentimento livre e esclarecido.

Os participantes acima de 12 anos, assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, autorizado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná (CAAE: 24676613.6.0000.0102). Nos casos em que os pacientes tinham menos de 12 anos, o termo de consentimento foi assinado pelos pais ou responsável legal (ver ANEXO 2).

Após a coleta de sangue os tubos com gel separador (BD Vacutainer® SST™; Becton, Dickinson, Co.), foram centrifugados (*Hermle Z206A*) por 10 minutos a 6.000 rotações por minuto (rpm). Os tubos contendo o anticoagulante

EDTAK₂ (BD Vacutainer® K₂EDTA; Becton, Dickinson, Co.) foram homogeneizados por 15 minutos e retirado de alíquota (~1,0 mL) para posterior quantificação de hemoglobina glicada (HbA1c). Após, os tubos com EDTA foram centrifugados (*Hermle Z326K*) e o creme leucocitário (*buffy coat*) foi estocado para extração do DNA. Alíquotas de soro (~1,5 mL) foram estocadas em freezer -20 e -80°C. As amostras fazem parte do Biorrepositório do Laboratório de Bioquímica Clínica da UFPR, homologado pela Portaria N° 2.201, de 14 de setembro de 2011. Amostras hemolisadas, lipêmicas e ictéricas foram excluídas das análises.

3.1.1 Critérios para a caracterização da amostra

O projeto é um estudo tipo caso-controle com uma amostra da população brasileira. Os dois grupos em estudo foram caracterizados com os critérios:

- A) Grupo Diabetes *mellitus* tipo 1 (DM1): os critérios para diagnóstico do DM1 foram aqueles preconizados pela *American Diabetes Association* (ADA, 2015) e ISPAD (*International Society for Pediatric and Adolescent Diabetes*) (CRAIG *et al.*, 2014), descritos no Quadro 2 desta dissertação.
- B) Grupo controle (CTRL, crianças saudáveis), considerando a glicemia em jejum <100 mg/dL, ausência de sintomas clínicos ou quaisquer outras patologias conhecidas reportadas pelo voluntário de pesquisa ou seu guardião legal.

Os grupos em estudo foram pareados por gênero. Os dados antropométricos e clínicos dos pacientes foram obtidos nos prontuários do Serviço do Hospital de Clínicas e pela entrevista do pesquisador. O *z-score* foi obtido com o calculador do *The Children's Hospital of Philadelphia* (<http://zscore.research.chop.edu/>).

3.2 EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DO DNA GENÔMICO

O DNA genômico foi extraído a partir do sangue total (Vacuette EDTAK3, Greiner) pelo método de *salting out* de Lahiri e Nurnberger adaptado (1991).

A quantificação do DNA genômico foi realizada por espectrofotometria em 260 e 280 nm, sendo critério de exclusão amostras com concentração inferior a 20 ng/μL ou grau de pureza (razão $A_{260/280}$) menor que 1,5 ou superior a 2,1, o que caracteriza contaminação e baixa qualidade da amostra. As amostras de DNA foram diluídas à concentração final de 100 ng/μL com água ultrapura estéril para análises de genotipagem pelo sistema PCR-RFLP (*Polimerase Chain Reaction - Restriction Fragment Length Polymorphism*). Já para as análises pelo sistema Taqman[®], as amostras foram diluídas à concentração final de 20 ng/μL com água ultrapura estéril e ambas concentrações foram armazenadas em *freezer* -20°C.

3.3 GENOTIPAGEM DOS POLIMORFISMOS NO GENE APOM

A TABELA 1 apresenta os polimorfismos do gene *apoM* estudados neste trabalho. A genotipagem dos polimorfismos rs9404941 e rs805296 foi realizada através de PCR-RFLP, utilizando as enzimas de restrição *Hae* III (New England BioLabs) para o polimorfismo 855T>C (rs9404941) e *Rsa* I (New England BioLabs) para o polimorfismo 778T>C (rs805296).

TABELA 1 - CARACTERIZAÇÃO DOS POLIMORFISMOS EM ESTUDO.

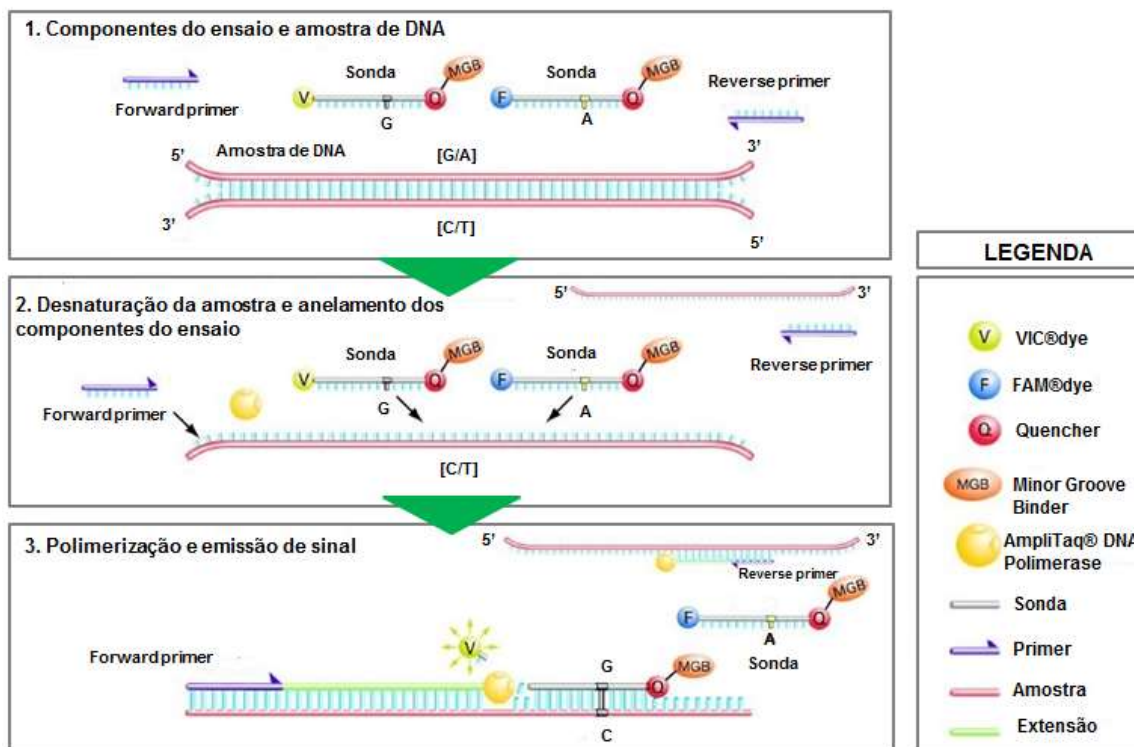
DESIGNAÇÃO GENE	REGIÃO DO GENE	POLIMORFISMOS		TÉCNICA
OMIM 606907 <i>apoM</i> Posição Cromossômica 6p21.33	promotor	rs805297	C>A	Taqman®
				C__7514748_10
	promotor	rs805296	T>C	PCR-RFLP
				<i>Rsa</i> I
	promotor	rs9404941	T>C	PCR-RFLP
				<i>Hae</i> III

rs: *reference sequence* (sequência de referência do SNP); OMIM, Online Mendelian Inheritance in Man®; TaqMan: sonda específica para determinado polimorfismo.
 FONTE: NCBI, 2016; OMIM, 2016.

A genotipagem do rs805297 foi realizada utilizando a PCR em tempo real com sonda fluorescente específica (C__7514748_10) do sistema TaqMan® (*Applied Biosystems, Foster City, CA, USA*). Essa técnica é utilizada para amplificar sequências alvo e simultaneamente gerar um sinal do genótipo e discriminação alélica de forma fácil, rápida e eficiente (MEIJERMAN *et al.*, 2007).

O sistema TaqMan® utiliza dois oligonucleotídeos específicos (*forward* e *reverse*) para amplificar a região polimórfica em estudo. Sondas fluorescentes específicas TaqMan® para os dois alelos em estudo, marcados com fluoróforos VIC e FAM, estão ligadas a um silenciador (*quencher*). Enquanto a sonda não estiver ligada ao DNA, o sinal da fluorescência é baixo devido à presença do *quencher*, assim que a sonda, por complementariedade de bases, anelar-se ao DNA, o silenciador é clivado pela DNA polimerase, sendo então liberado, permitindo que o fluoróforo seja medido e quantificado (SCHLEINITZ; DISTEFANO; KOVACS, 2011), conforme ilustrado na FIGURA 9.

FIGURA 9 - PRINCÍPIO DA PCR EM TEMPO REAL COM SONDAS FLUORESCENTES TAQMAN®.



1. Componentes do ensaio e amostra de DNA: os *primers* (oligonucleotídeos iniciadores) forward e reverse usados para amplificar a sequência polimórfica de interesse e duas sondas marcadas com fluoróforos (VIC e FAM) na extremidade 5' para a detecção específica do alelo. A fluorescência é bloqueada pelo quencher na extremidade 3', acoplado a um agente estabilizador, o Minor Groove Binder (MGB), com função de estabilizar o complexo sonda/DNA molde. 2. Desnaturação da fita dupla de DNA molde e anelamento dos componentes do ensaio. 3. Polimerização e emissão do sinal fluorescente: a Taq DNA polimerase inicia a síntese de uma nova fita de DNA e encontra a sonda; o sinal fluorescente ligado a extremidade 5' da sonda é clivado e um sinal de fluorescência é emitido, podendo ser detectada pelo equipamento.

FONTE: Adaptado de (MAYO *et al.*, 2010).

Os experimentos de genotipagem foram realizados no equipamento 7500 Fast™ (*Applied Biosystems, Foster City, CA, USA*), utilizando-se reagentes (*Master Mix®*, *SNP Genotyping Assay®*) e demais suplementos fornecidos pelo fabricante (*Applied Biosystems*).

As reações seguiram o protocolo descrito na Tabela 2, realizadas em placas de 96 poços, dentro da câmara de fluxo laminar para evitar contaminação. A placa foi coberta com filme específico e posteriormente centrifugada (*Hermler Z326K*) por 2 minutos a 4.000 rpm para remoção de bolhas e sedimentação da mistura.

TABELA 2 - PROTOCOLO UTILIZADO PARA GENOTIPAGEM DO rs805297 DO GENE *apoM* COM SONDAS FLUORESCENTES NA PCR EM TEMPO REAL

REAGENTES	VOLUME (8 μ L)
Master Mix ^{®*}	3,0 μ L
SNP Genotyping Assay [®]	0,1 μ L
Água ultra-pura	1,9 μ L
DNA molde (20 ng/ μ L)	3,0 μ L
CICLAGEM	TEMPERATURA \rightarrow TEMPO
1 ciclo	60°C \rightarrow 30 s (pré-PCR)
1 ciclo	95°C \rightarrow 60 s (ativação polimerase)
50 ciclos	[95°C \rightarrow 15 s (desnaturação)
	[60°C \rightarrow 90 s (anelamento/extensão)
1 ciclo pós-PCR	60°C \rightarrow 30 s

Master Mix[®]: sistema de reação composto pela Taq DNA polimerase, Mg⁺⁺, tampão e ativadores, otimizado para uso com sondas TaqMan[®]. SNP Genotyping Assay[®], sondas fluorescentes específicas para genotipagem com os fluoróforos VIC e FAM.

FONTE: O autor, 2016.

Em cada placa foram utilizados dois poços como controle negativo, contendo apenas o *Super Master Mix*, para avaliar a contaminação no sistema. As amostras do grupo controle e diabéticas foram inseridas nas placas de maneira aleatória. Para todas as análises, a qualidade da genotipagem foi superior a 98% identificada pelo *software* do sistema 7500 *Fast*[™]. Exemplos das discriminações alélicas observada no ensaio TaqMan para o polimorfismo em estudo estão apresentados no ANEXO 4.

A PCR-RFLP (*Polimerase Chain Reaction - Restriction Fragment Length Polymorphism*) foi realizada utilizando os oligonucleotídeos iniciadores *forward* 5'-AGACAGAGTCTCTGTCGCCCAAG-3' e *reverse* 5'-GCCAAGGTGGGCGGATGGCTTGA-3' para amplificação do fragmento de 231 pb da região promotora do gene *apoM* contendo os polimorfismos rs805296 e rs9404941 como descrito por Niu e colaboradores (2007) (TABELA 3).

TABELA 3 - PROTOCOLO UTILIZADO NA TÉCNICA PCR-RFLP PARA GENOTIPAGEM DOS POLIMORFISMOS rs805296 E rs9404941 DO GENE *apoM*.

Primers		
	forward 5'-AGACAGAGTCTCTGTCGCCCAAG-3'	
	reverse 5'-GCCAAGGTGGGCGGATGGCTTGA-3'	
REAGENTES	VOLUMES	CONCENTRAÇÃO FINAL
Água ultra-pura	14,5 µL	-
dNTP, 5 mM	0,8 µL	0,2 mM
MgCl ₂ , 50 mM	0,6 µL	1,5 mM
Tampão de PCR (10x)*	2,0 µL	1x
Primer forward, 10 pmol/µL	0,5 µL	0,05 pmol
Primer reverse, 10 pmol/µL	0,5 µL	0,05 pmol
Platinum® Taq polimerase 5 U/µL	0,15 µL	0,75 U
DNA molde (100 ng/µL)	1,0 µL	100 ng/µL
Volume final	20,0 µL	-
CICLAGEM	TEMPERATURA → TEMPO	
1 ciclo	94°C → 120 s (desnaturação do DNA molde e ativação polimerase)	
32 ciclos	{ 94°C → 30 s (desnaturação) 70°C → 30 s (anelamento) 72°C → 30 s (extensão)	
1 ciclo pós-PCR	72°C → 60 s (extensão final)	

*Tampão TAQ 10X, (NH₄)₂SO₄ 750 mM, Tris-HCl (pH 8,8; 25°C); 0,1% (v/v) Tween 20. Taq DNA polymerase (Invitrogen). Fonte: O autor (2016).

FONTE: o autor, 2016.

A qualidade da reação de PCR foi verificada pela eletroforese de uma alíquota de 2 µL do produto de PCR, misturada a 4 µL de tampão de aplicação (glicerol 30%; azul de bromofenol 0,05% e xilenocianol 0,05%)- A mistura foi submetidos à eletroforese submarina em gel de agarose 2,0% com voltagem constante (60 Volts; ~22 mA), em temperatura ambiente por aproximadamente 2 horas, em tampão TBE 1x (Tris-hidroximetilaminometano 89 mmol/L; ácido bórico 89 mmol/L e EDTA 1 mmol/L, pH 8,2). Em seguida, 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), e as imagens obtidas com o sistema de fotodocumentação L-PIX (Loccus Biotecnologia).

Após a confirmação da amplificação, os produtos de PCR foram digeridos com endonucleases *Rsa* I (Invitrogen™) e a *Hae* III (Promega) para a genotipagem dos polimorfismos rs805296 e rs9404941, respectivamente (FIGURA 10).

FIGURA 10 – SÍTIOS DE RESTRIÇÃO DAS ENDONUCLEASES.



As setas vermelhas indicam os locais de clivagem das endonucleases *Rsa I* e *Hae III*.

FONTE: O autor, 2016.

As reações de restrição seguiram os protocolos detalhados na TABELA 4, sendo a incubação por 12 horas em banho-maria a 37°C.

TABELA 4 - PROTOCOLO UTILIZADO PARA REAÇÃO DE RESTRIÇÃO DOS POLIMORFISMOS rs805296 E rs9404941.

REAGENTES	VOLUMES	CONCENTRAÇÃO FINAL
Água ultra-pura	2,8 µL	-
<i>Buffer T 10X*</i>	0,5 µL	1x
BSA, 0,1%	0,5 µL	0,04%
Enzima <i>Rsa I</i> 10U/µL	0,2 µL	2 U
Produto de PCR (~20 ng/µL)	1,0 µL	20 ng
Volume final	5,0 µL	-
REAGENTES	VOLUMES	CONCENTRAÇÃO FINAL
Água ultra pura	3,25 µL	-
RE <i>Buffer C</i> , 10x**	0,5 µL	1x
BSA acetilada, 10 mg/mL	0,05 µL	5 µg
Enzima <i>Hae III</i> , 10 U/µL	0,2 µL	2 U
Produto de PCR (~20ng/µL)	1,0 µL	20 ng
Volume final	5,0 µL	-

**Buffer T 10X*: 10mM Tris-HCl (pH 7.4 at 25°C), 100mM KCl, 1mM EDTA, 1mM DTT, 0.2mg/ml BSA and 50% glicerol. ** RE *Buffer C 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.

FONTE: O Autor, 2016.

Os fragmentos de DNA obtidos das reações de restrição foram separados em eletroforese em gel de poliacrilamida 12% (29:1) em cuba miniProtean 3, BioRad (100x75x0,75 mm).

3.4 DOSAGENS BIOQUÍMICAS

As determinações de parâmetros bioquímicos foram realizadas em sistema automatizado Labmax 400 (Labtest Diagnóstica SA) utilizando reagentes, calibradores e controles adequados ao sistema automatizado. As amostras de soro foram descongeladas e homogeneizadas por 30 minutos antes de serem dosadas. Os princípios dos métodos utilizados estão descritos na TABELA 5.

TABELA 5 - PRINCÍPIOS METODOLÓGICOS E REAGENTES PARA DOSAGEM DOS PARÂMETROS BIOQUÍMICOS.

DOSAGEM	PRINCÍPIO METODOLÓGICO	CVa(%)	INTERVALO DE REFERÊNCIA
Ácido úrico	Colorimétrico (Enzimático Trinder)	4,3	0,5-6,0 mg/dL
Albumina	Colorimétrico (Verde de Bromocresol)	1,6	2,9-4,7g/dL
Colesterol total	Colorimétrico (Enzimático Trinder)	2,7	Desejável: <170 mg/dL Limítrofe: 170-199 mg/dL Elevado: >200 mg/dL
Creatinina	Colorimétrico (Picrato alcalino)	2,7	0,26-0,81 mg/dL
Glicose	Hexoquinase-UV	2,2	<100 mg/dL
HDL-colesterol	Ensaio homogêneo	3,6	Desejável: 35-40 mg/dL
LDL-colesterol	Cálculo* Tri ≥ 400 mg/dL ou Ensaio homogêneo	4,2	Desejável: <110 mg/dL Limítrofe: 110-129 mg/dL Elevado: 130 mg/dL
HbA1c	Imunoensaio	1,7	4-6%
Proteínas Totais	Colorimétrica (Biureto)	1,4	6-8 g/dL
Triglicérides	Colorimétrica (Reação de Trinder)	3,2	Desejável: >100 mg/dL Elevado: >130 mg/dL
Ureia	Urease-UV	4,2	8-36 mg/dL
1,5 anidroglicitol	Enzimático Glycomark	3,4	>10 µg/mL

CVa: Coeficiente de Variação analítico interensaio.

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

O intervalo de referência usado neste ensaio é para crianças e adolescentes.

FONTE: O autor, 2016.

3.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As variáveis contínuas foram analisadas para normalidade com o teste de *Kolmogorov-Smirnov* e a presença de *outliers* foi realizada pelo método gráfico disponível no programa *Statistica* para *windows* 10.0 (*StatSoft Inc, Tulsa OK, USA*).

Para as variáveis descontínuas foram utilizados os testes de *Chi-quadrado* (χ^2), para as análises de correlação, o modelo descrito por *Pearson* (correlação linear).

As variáveis contínuas com distribuição normal foram comparadas pelo teste “t” de *Student* bidirecional para amostras não pareadas. As variáveis que não apresentaram distribuição normal foram “normalizadas” por transformação logarítmica ou analisadas pelo teste *U* de *Mann-Whitney*, conforme apropriado. As variáveis com distribuição normal foram representadas pela média $\pm 1SD$ e as sem distribuição normal pela mediana (intervalo interquartil, 25%-75%).

Para os ensaios de correlação e associação utilizando ANOVA, os polimorfismos em estudo foram codificados como 1 (homozigoto usual), 2 (heterozigoto) e 3 (homozigoto raro).

A verificação do equilíbrio de *Hardy-Weinberg*, cálculos das frequências genotípicas e alélicas, bem como o intervalo de confiança de 95% (IC95%) para os alelos de menor frequência (AMF) foram realizados com o programa *DeFinetti* (<http://ihg.gsf.de/cgi-bin/hw/hwa1.pl>).

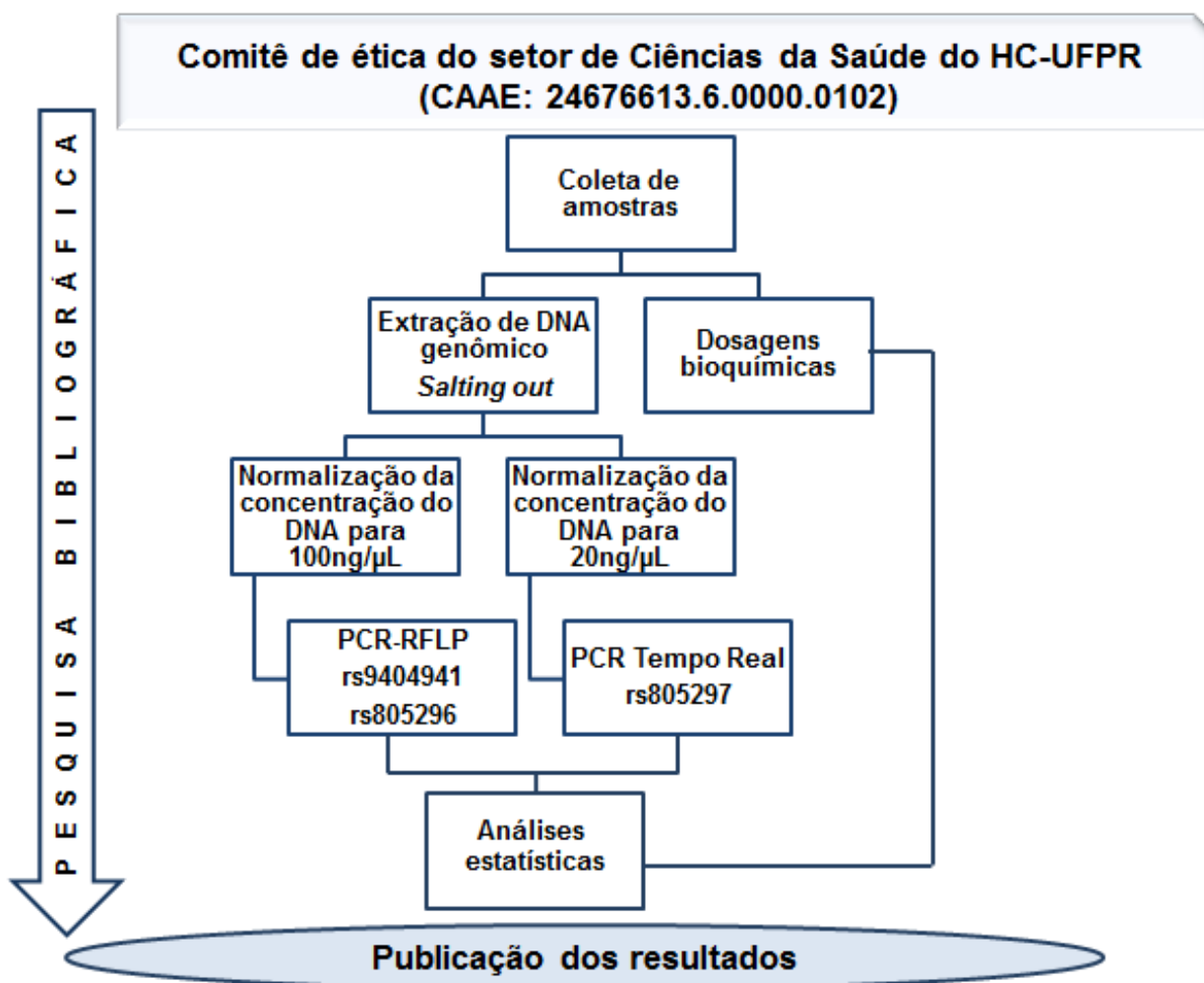
Para as comparações das frequências alélicas com outras populações, foi considerado similar quando o dentro do limite de 95% do intervalo de confiança. Frequências acima ou abaixo do 95%IC foram consideradas diferentes.

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

3.6 FLUXOGRAMA DE TRABALHO

O fluxograma de trabalho, evidenciando as principais etapas do projeto, está ilustrado na Figura 11.

FIGURA 11 – FLUXOGRAMA DE TRABALHO.



Após as coletadas, as amostras foram processadas e realizadas as dosagens bioquímicas e análises genéticas.

FONTE: O autor, 2016.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados deste estudo estão apresentados nos tópicos: caracterização da amostra, análises moleculares, análises bioquímicas e análise de correlação.

4.1 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA

Para este estudo do tipo caso-controle, dividiu-se a população amostral em dois grupos: crianças DM1 e crianças-controle saudável. As análises estatísticas descritivas estão reportadas na TABELA 6.

TABELA 6 - CARACTERIZAÇÃO ANTROPOMÉTRICA E CLÍNICA DOS GRUPOS DE CRIANÇAS DM1 E CONTROLES SAUDÁVEIS.

PARÂMETROS	CONTROLE (n=169)	DM1 (n=148)	P
Idade (anos)	10,0(10,0-11,0)	11,0(9,5-13,0)	<0,001
Meninos/meninas, n	91/78	70/78	0,244**
Peso (kg)	38,3(33,3-45,2)	38,4(30,1-50,4)	0,961
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 ⁵	0,5±1,0	0,2±0,9	0,020*
Idade ao 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 DM (%)	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 são 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.

⁵Z-score, número de desvio padrão (DP) distante da média, quando a distribuição é normal (WANG; CHEN, 2012).

FONTE: O autor, 2016.

Sexo, Idade e Etnia

Ambos os grupos foram pareados por sexo e os resultados mostram que houve diferença estatística significativa entre os grupos nos parâmetros idade e Z-score. Embora o índice de massa corporal (IMC) não diferencie os grupos, o escore Z mostra que o grupo DM1 apresenta menor massa corporal (p=0,020),

como esperado, uma vez que a patologia está frequentemente relacionada à redução de peso (ADA, 2015). Corrobora para a redução no z-score, um índice que normaliza o índice de massa corporal, por gênero e idade, no grupo DM1, a desidratação decorrente da poliúria, frequente em crianças sob terapia insulínica.

Os pacientes em estudo apresentaram mediana da idade ao diagnóstico de 6,9 anos. Esses valores estão abaixo dos encontrados em um estudo israelense de com crianças DM1, em que os pacientes estudados apresentaram idade média de 5,4 anos (NIMRI; PHILLIP; SHALITIN, 2007). O grupo DM1 em estudo, esta bem caracterizado, como representante do primeiro pico de incidência do DM1 que ocorre entre 6 e 15 anos (HEROLD *et al.*, 2013). Segundo a EURODIAB a idade do diagnóstico do DM1 está cada vez mais precoce (PATTERSON *et al.*, 2009).

O DM1 continua sendo a forma mais comum de DM em jovens e crianças nas mais variadas populações, especialmente em caucasoides (CRAIG *et al.*, 2014). A Finlândia, por exemplo, tem uma incidência anual de 64 por 100.000 crianças menores 15 anos (IDF, 2013), enquanto Porto Rico se assemelha aos Estados Unidos, com 17 casos cada 100.000 crianças, por ano. Em Cuba a incidência é de menos de três casos cada 100.000 por ano (ATKINSON, 2012).

Neste estudo, o grupo controle se apresentou para os coletadores das amostras, com características de Euro-descendentes (pela clara) em mais de 95% dos casos. O grupo DM1 foi composto por 90,5% de crianças Euro-brasileiras, sendo os demais predominantemente Afro-brasileiros. Esta distribuição étnica era esperada, pelas características da região onde foram obtidas as amostras, a cidade de Curitiba, Estado do Paraná, na região Sul do Brasil.

Histórico familiar de DM1

Entre os pacientes entrevistados, 67% relataram histórico de familiares (pais, irmãos ou familiares próximos) com DM1 ou DM2. Vários estudos epidemiológicos revelaram uma associação positiva entre a história familiar de DM e o risco de aparecimento de novos casos tanto de DM1 como de DM2 (DAHLQUIST *et al.*, 1989; LI *et al.*, 2001; SILVEIRA *et al.*, 2001; USHER-SMITH *et al.*, 2015).

A relevância do história familiar associado a detecção de pacientes recém-diagnosticados com DM1, também é reportada em vários estudos

(GOLDENBERG *et al.*, 2003; SOUZA, O. L. *et al.*, 2005; USHER-SMITH *et al.*, 2015).

Cetoacidose diabética (CAD)

No grupo DM1 em estudo, 68% das crianças apresentavam no prontuário, descrições de episódio de cetoacidose no momento do diagnóstico, sendo que 25% delas tiveram pelo menos um episódio de CAD em 2015, necessitando internamento.

A prevalência de cetoacidose diabética (CAD) ao diagnóstico foi similar à observada em outro estudo realizado no mesmo serviço, 58,8%, em pacientes diagnosticados entre 2005 e 2015 (SOUZA, L. C. *et al.*, 2016). Esta frequência é expressivamente superior à observada em países desenvolvidos, em torno de 20% (HANAS; LINDGREN; LINDBLAD, 2007). Em Israel foi observada uma incidência de 80,8% de CAD em pacientes diabéticos menores de 5 anos de idade (NIMRI; PHILLIP; SHALITIN, 2007).

A incidência de CAD na manifestação do DM1 entre os países varia de 13% a 18% (USHER-SMITH *et al.*, 2012). Estudos demonstraram diferentes fatores de risco podem predispor ao atraso no reconhecimento do DM1, conseqüentemente aumentar o risco de CAD. A prevalência de CAD cresce progressivamente em crianças com mau controle metabólico ou episódios anteriores de CAD. Outros fatores como a idade, transtornos psiquiátricos e alimentares, baixo nível socioeconômico e de escolaridade dos pais, além do estilo de vida estressante predispõem à CAD e sua recorrência após o diagnóstico (SZYPOWSKA; SKORKA, 2011; GRUBER *et al.*, 2015).

4.2 ANÁLISES BIOQUÍMICAS

Os resultados das dosagens dos parâmetros bioquímicos são apresentados na TABELA 7.

TABELA 7 – CONCENTRAÇÕES DOS PARÂMETROS BIOQUÍMICOS PARA OS GRUPOS DM1 E CRIANÇAS-CONTROLE.

PARÂMETROS	CONTROLE (n=169)	DM1 (n=148)	P
Glicemia (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 para as variáveis são apresentados como mediana (intervalo interquartil, 25-75%). Probabilidade (P) Mann-Whitney.

FONTE: O autor, 2016.

Marcadores de controle glicêmico: Glicemia, Hemoglobina Glicada e 1,5 anidroglicitol

A glicemia reportada para o grupo controle foi ao acaso e para o grupo DM1 em jejum. Independente da ausência de jejum para o grupo controle, não foram observadas concentrações de glicose superiores a 99 mg/dL (TABELA 7).

As concentrações da mediana da glicemia, acima de 180 mg/dL para crianças em idade escolar e acima de 130 mg/dL para adolescentes, a HbA1c > 7,5% e o 1,5AG (<10 µg/mL), indicam que o grupo DM1 em estudo contempla diabéticos com mau controle metabólico (TABELA 7) (CRAIG *et al.*,

2014; ADA, 2016; SBD, 2016). Nosso estudo ressalta a expressiva elevação da glicemia em crianças com DM1, 2,7 vezes maior (252/92) concentração quando comparado a crianças saudáveis.

O controle glicêmico é particularmente difícil em crianças e adolescentes, devido às alterações na sensibilidade à insulina relacionada com a maturidade sexual e o crescimento físico (FRANZESE; VALERIO; SPAGNUOLO, 2004), a capacidade para prestar o autocuidado e a supervisão na educação pelos pais e escola (GALE, 2005; AMERICAN DIABETES, 2016), acrescidos à maior dificuldade no controle glicêmico com uso de insulina usual em todos os pacientes DM1 (ROSENSTOCK, 2001). O adequado controle glicêmico é essencial para evitar ou minimizar as complicações associadas à patologia (THE-DIABETES-CONTROL-AND-COMPLICATIONS-TRIAL-RESEARCH-GROUP, 1993; WHITE *et al.*, 2001; NATHAN *et al.*, 2005).

Perfil lipídico

Crianças DM1 com baixo controle glicêmico estão propensas a anormalidades lipídicas (PETITTI *et al.*, 2007), como apresentado no grupo em estudo (TABELA 7).

Os pacientes DM1 apresentaram concentrações maiores de Colesterol total, HDL-C e LDL-C e menores de triglicerídeos quando comparado com o grupo controle, um perfil de alteração esperado em pacientes DM1 nesta faixa etária (GUY *et al.*, 2009).

As concentrações plasmáticas de colesterol total para o grupo DM1 estão dentro do valor limítrofe aceito pela ADA, ISPAD e SBD, não caracterizando esses pacientes como dislipidêmicos. Já as concentrações de HDL-C estão dentro dos valores de corte desejável para ambos os grupos. Shah e colaboradores relataram que o HDL-C em crianças diminui quando estes chegaram à idade adulta (SHAH *et al.*, 2015). Crianças com DM1 apresentaram maiores concentrações de HDL-C de forma consistente ($p < 0,001$) e paradoxalmente maiores que o grupo controle, contudo esse achado, já foi relatado em outros trabalhos (MAAHS *et al.*, 2005; GUY *et al.*, 2009; SNELL-BERGEON *et al.*, 2010; KRISHNAN *et al.*, 2011).

Embora as concentrações plasmáticas de LDL-C no grupo DM1 sejam superiores ao grupo controle (TABELA 7), encontram-se dentro dos intervalos aceitáveis de risco (< 100 mg/dL) (ADA, 2016).

As concentrações de triglicérides foram significativamente maiores no grupo controle, quando comparado ao DM1 ($P < 0,001$). Embora em ambos os grupos, as concentrações observadas não estejam associadas a hipertrigliceridemia ($TG > 150$ mg/dL). Uma explicação plausível reside na amostra do grupo controle coletada sem jejum prévio, o que pode promover um aumento, na concentração de triglicérides.

Proteínas Totais e Albumina

Os pacientes DM1 apresentaram concentrações menores de proteínas totais ($P = 0,023$) e similares de albumina ($P = 0,654$) como mostrado na Tabela 7. Tanto para a proteína total quanto para a albumina, as concentrações observadas em ambos os grupos não sugerem alterações patológicas ou metabólicas, permanecendo no intervalo de referência. Desta forma, é possível caracterizar que os grupos em estudo não apresentam no geral sinais de perda proteína (como lesão renal) ou mesmo indícios de déficit nutricional.

Creatinina e Ureia

As concentrações de ureia e creatinina foram significativamente maiores no grupo DM1 quando comparado aos controles ($P < 0,001$). O resultado é esperado, uma vez que ureia e creatinina são marcadores de filtração glomerular, conseqüentemente de lesão renal (ZURBIG *et al.*, 2012), e dentre as complicações mais frequentes associadas ao DM1 encontra-se a nefropatia, sendo esta progressiva e associada ao mau controle glicêmico (DONAGHUE *et al.*, 2014).

Embora o grupo DM1 possua maiores concentrações de creatinina e ureia em relação ao grupo controle, as concentrações de ambos os grupos encontram-se dentro do intervalo de referência (0,32-0,71 mg/dL) (CERIOTTI *et al.*, 2008), indicando que os participantes deste estudo não apresentam uma lesão renal manifesta detectada através desses biomarcadores.

Ácido úrico

A concentração sérica de ácido úrico foi significativamente menor ($P < 0,001$) em crianças com DM1 quando comparado às saudáveis. Embora as concentrações em ambos os grupos estão dentro do intervalo de referência (2,5-5,5 mg/dL), estudos descrevem hipouricemia em pacientes com DM tanto do tipo

1 quanto em tipo 2 (ESPARZA MARTIN; GARCIA NIETO, 2011). A redução das concentrações plasmáticas de urato são decorrentes do aumento do *clearance* ou depuração renal deste composto associado a poliúria (diurese osmótica) características dos pacientes com DM1 (MAGOULA *et al.*, 1991; GONZALEZ-SICILIA *et al.*, 1997; GOLEMBIEWSKA *et al.*, 2005).

Gołembiewska e colaboradores (2005) mostraram que a excreção de ácido úrico está correlacionada com a glicemia de jejum e a HbA1c, sugerindo uma relação do urato sérico com o grau de controle glicêmico.

4.3 ANÁLISES MOLECULARES

Todos os polimorfismos em estudo se encontram no equilíbrio de Hardy-Weinberg (H-W), ficando estabelecido que a variação genética em uma população permaneça constante de uma geração à outra na ausência de fatores desestabilizantes, pois quando uma população está em equilíbrio de H-W os alelos que compõe o genótipo podem ser considerados escolhidos aleatoriamente numa população. Desvios no equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE) podem indicar consanguinidade, estratificação da população e até mesmo problemas de inconsistências nas genotipagens (SHAN, 2013).

4.3.1 Polimorfismo rs805297 do gene apoM

Os resultados das genotipagens do grupo controle e DM1 referente ao polimorfismo rs805297 estão detalhados na TABELA 8.

TABELA 8 - FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS PARA O POLIMORFISMO rs805297 DO GENE *apoM* NOS GRUPOS EM ESTUDO

	GENÓTIPOS	CONTROLE	DM1	P
	ALELOS	(N=169)	(N=148)	
POLIMORFISMO rs805297 C>A	CODOMINANTE			
	C/C	94 (55,6)	92 (62,2)	0,061
	C/A	60 (35,5)	52 (35,1)	
	A/A	15 (8,9)	4 (2,7)	
	H-W (P)	0,729	0,798	
	Alelo A	26,6%	20,2%	0,060
	[95%IC]	[22-31]	[16-25]	
	DOMINANTE			
	*CC vs CA+AA	94 vs 75	92 vs 56	0,238
	RECESSIVO			
**AA vs CC+CA	15 vs 154	04 vs 144	0,021	

Genótipos descritos em n (%). Probabilidade (P), Teste Chi-quadrado

95%IC, Intervalo de Confiança de 95%

Todos os grupos estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg (P>0,05)

*Modelo dominante e **Modelo Recessivo

FONTE: O autor, 2016.

Não houve diferença estatística significativa na comparação dos genótipos e frequências alélicas (P=0,060) entre os grupos para os modelos codominante e dominante, P=0,061 e P=0,238, respectivamente (TABELA 8). O modelo recessivo mostra significância (P=0,021), sugerindo que a presença do alelo A poderia estar associado à proteção em relação ao DM1. Neste caso, a presença apenas quatro indivíduos com o genótipo AA no grupo DM1, reduz muito o poder estatístico, e novos estudos com maior devem ser realizados para substanciar os resultados encontrados. Wu e colaboradores (WU *et al.*, 2009) encontraram diferença estatisticamente significativa na frequência do alelo A entre os grupos controle e DM1 na população Chinesa Han, mas não na Sueca. Mas tanto na população Chinesa como na sueca, a frequência do alelo A foi superior nos grupos controle (32,7 % Chineses Han e 37,7% suecos) em comparação com os grupos DM1 (26,2 % Chineses Han e 29,1% suecos).

A TABELA 9 apresenta a comparação das frequências genotípicas e alélicas deste estudo para o polimorfismo rs805297 com outras populações.

TABELA 9 - COMPARAÇÕES ENTRE FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS DO POLIMORFISMO rs805297 DO GENE *apoM* COM A LITERATURA

apoM rs805297		GENÓTIPOS (%)			ALELO (%)	
GRUPO ÉTNICO	CARACTERÍSTICAS	n	CC	CA	AA	A
Euro-brasileiros (presente estudo)	Crianças controle	169	55,6	35,5	8,9	26,6
	Crianças DM1	148	62,2	35,1	2,7	20,2
Chineses (CAO <i>et al.</i> , 2013)	Controles	312	47,1	49,3	3,6	28,0
	Pacientes DAC	300	51,3	47,5	3,0	25,8
Han Chineses (WU <i>et al.</i> , 2009)	Controles	316	38,0	48,7	13,3	37,7
	Pacientes DM1	177	48,0	45,8	6,2	29,1
Caucasianos (suíços) (WU <i>et al.</i> , 2009)	Controles	101	47,5	39,6	12,9	32,7
	Pacientes DM1	124	52,4	42,7	4,8	26,2
Han chineses (ZHAO <i>et al.</i> , 2011)	Controles	389	48,1	44,2	7,7	29,8
	Pacientes AVC	314	38,9	48,4	12,7	36,9
Han chineses (NIU <i>et al.</i> , 2007)	Controles	156	39,8	46,1	14,1	37,2
	Pacientes DM2	170	41,2	48,2	10,6	34,7

Em negrito, destacados os dados das amostras em estudo. AVC: Acidente Vascular Cerebral; DAC: Doença Arterial Coronária; DM1: diabetes *mellitus* tipo 1; DM2: diabetes *mellitus* tipo 2.

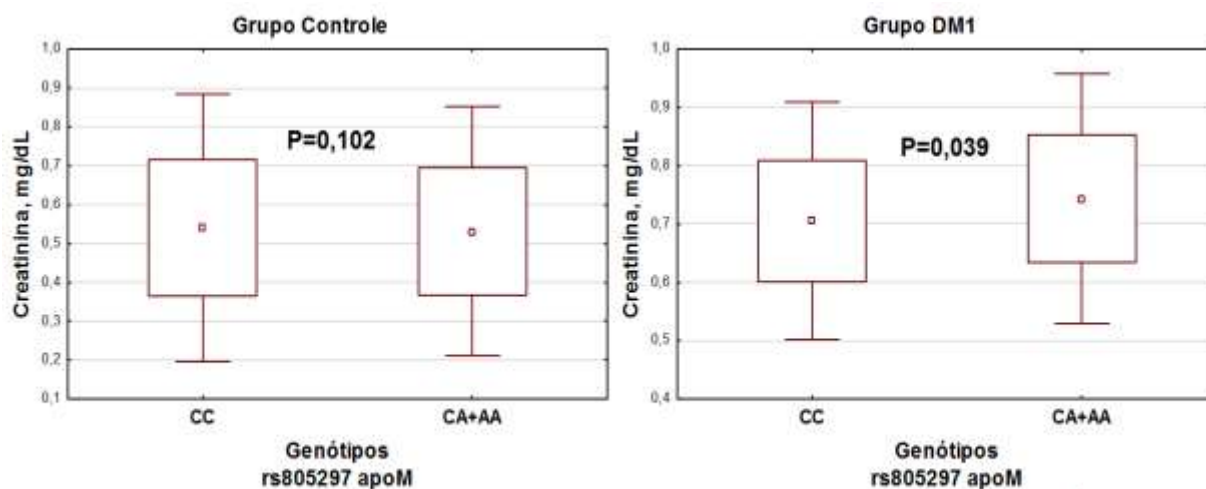
Comparações em negrito destacam a frequência do alelo menor diferente do Intervalo de confiança de 95% para o grupo controle [95%IC 22-31%]

FONTE: O autor, 2016.

A frequência do alelo A, menos comum, encontrada neste estudo para crianças saudáveis (26,6%) é inferior ao relatado para caucasoides americanos (34,0%) e similares a descendentes europeus de Utah (29,1%), porém significativamente maior que a encontrada em afrodescendentes americanos (6,0%) (HAPMAP, 2016c). Ao comparar o grupo euro-brasileiro DM1, com caucasianos suíços também portadores de DM1, os valores encontrados são similares, sendo 20,2% para a população brasileira e 26,2% para os suíços.

As análises de variância dos genótipos do rs805297 com as concentrações dos biomarcadores evidenciou associação entre esse polimorfismo e a creatinina, um marcador de função renal e filtração glomerular (FIGURA 12).

FIGURA 12 - ASSOCIAÇÃO DO POLIMORFISMO rs805297 COM AS CONCENTRAÇÕES DO BIOMARCADOR CREATININA PARA OS GRUPOS EM ESTUDO



$P < 0,05$ é significativo.
Fonte: O autor, 2016.

A presença do alelo A (CA+AA) foi associada a um aumento significativo ($P=0,039$) na concentração de creatinina somente no grupo DM1 (FIGURA 12). Este achado, pode ser um artefato, decorrente do tamanho amostral e necessita confirmação com outros estudos para comprovação.

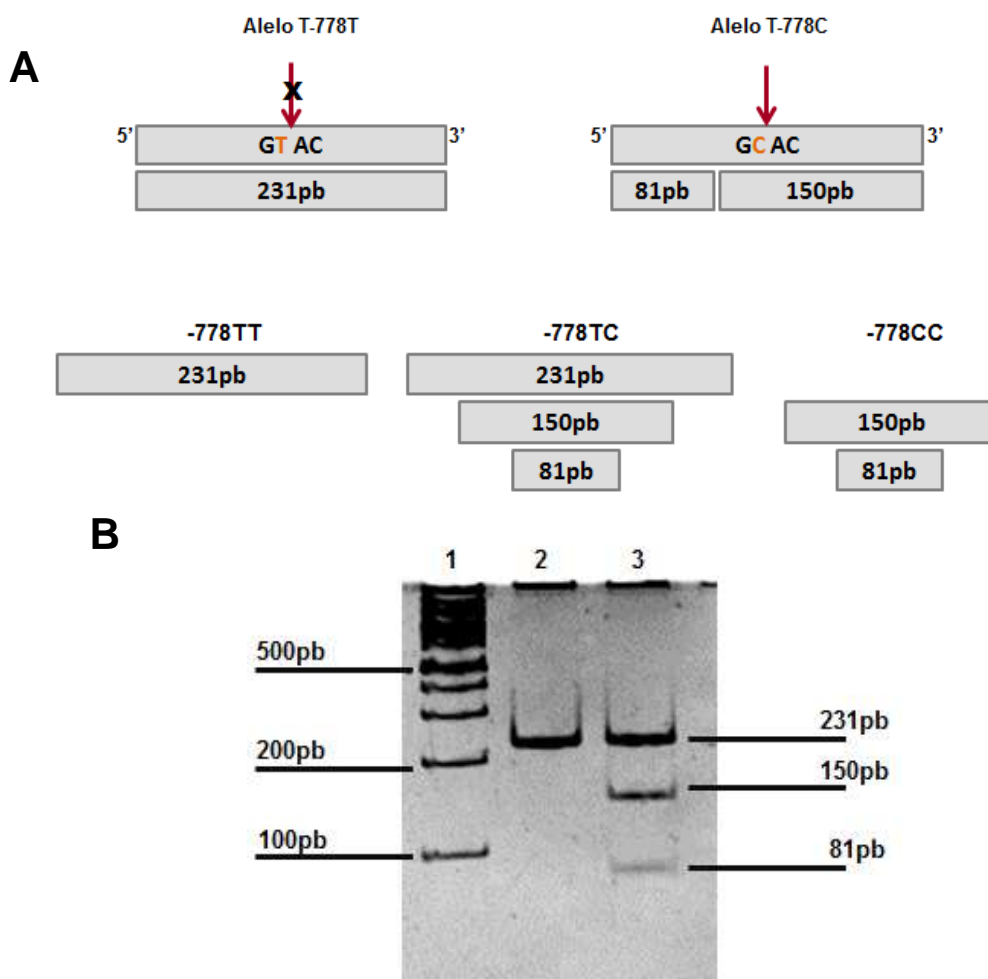
A *apoM* tem expressão relevante nas células tubulares proximais sendo secretada por elas (XU, N.; DAHLBACK, 1999; FABER *et al.*, 2006), e usualmente reabsorvida por proteínas associadas a giantina através de um processo que também é afetado por doença renal (HUANG, L. Z. *et al.*, 2015). Através de indução de dano por isquemia-reperfusão hepática (IRH) em modelo animal, foi observado após a isquemia aumento significativo das concentrações plasmáticas de apoM, similar ao dos marcadores de função renal ureia e creatinina. Este aumento das concentrações plasmáticas sugere tanto a produção patofisiologicamente aumentada ou mais apoM foi perdida pelas células tubulares durante o dano renal pela isquemia-reperfusão hepática. Neste estudo, os autores encontraram um pico de elevação de apoM no sangue e urina mais precoce do que de ureia e creatinina, sugerindo que apoM poderia ser um marcador sensível para dano por isquemia-reperfusão (XU, X. L. *et al.*, 2013). Contudo, as funções e papéis fisiológicos da apoM no rim são ainda especulativas. É possível, que os pacientes DM1 que carregam o genótipo CA+AA expostos a um ambiente pró-inflamatório e hiperglicêmico que

caracteriza o diabetes, apresentem maior risco para o desenvolvimento precoce da nefropatia diabética que os carreadores do genótipo CC. Foi sugerido por Xu e colaboradores (XU, X. *et al.*, 2006) que apoM poderia ter ação como proteína de fase inflamatória aguda e poderia servir como marcadora de dano renal agudo. Neste contexto, o observado em nosso estudo, pode ser um indicativo, que deve ser explorado, na busca de marcadores de risco para a lesão renal.

4.3.2 Polimorfismo rs805296 do gene *apoM*

A genotipagem do polimorfismo rs805296 foi realizada através da técnica de PCR-RFLP (*Polymerase Chain Reaction Restriction Fragment Length Polymorphism Read*) e os produtos de PCR foram digeridos com a enzima de restrição *Rsa I* (conforme descrito no tópico 3.3 de Materiais e Métodos) gerando os perfis de restrição detalhados na FIGURA 13.

FIGURA 13 – SÍTIOS DE RESTRIÇÃO PARA O POLIMORFISMO rs805296.



A: MAPA DE RESTRIÇÃO DO PRODUTO DE PCR. As setas indicam os sítios de restrição para a enzima *Rsa* I e os nucleotídeos na cor alaranjada encontram-se na posição 778. O “X” em negrito simula a ausência do sítio de restrição no alelo selvagem -778T. Na presença do alelo T, não há o reconhecimento da enzima pelo sítio de restrição para que ocorra a clivagem, havendo apenas fragmentos com 231 pares de base (pb); na presença do alelo C há reconhecimento da enzima pelo sítio de restrição sendo possível visualizar fragmentos de 150 e 81 pb. B: PERFIL ELETROFORÉTICO DOS GENÓTIPOS DO POLIMORFISMO T-778C DA REGIÃO PROMOTORA DO GENE APOM. Na linha 1 o marcador de massa molecular (MM) de 100 pares de base (pb); a linha 2 o perfil de restrição para o genótipo homocigoto para o alelo T (TT) e a linha 3 exibe o perfil de restrição para heterocigoto TC, não havendo a presença de indivíduos homocigotos para o alelo C. À direita do gel as massas moleculares esperadas para os fragmentos. FONTE: O autor, 2016.

A TABELA 10 mostra os resultados das genotipagens das amostras para o polimorfismo rs805296 do gene *apoM* para os grupos controle e DM1.

TABELA 10 - FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS PARA O POLIMORFISMO rs805296 DO GENE *apoM* NA AMOSTRA EM ESTUDO

	GENÓTIPOS	CONTROLE	DM1	P
	ALELOS	(N=169)	(N=148)	
POLIMORFISMO rs805296 T>C	CODOMINANTE			
	T/T	157 (92,9)	143 (96,6)	0,142
	T/C	12 (9,1)	5 (3,4)	
	C/C	0 (0)	0 (0)	
	H-W (P)	0,964	0,983	
	Alelo C [95%IC]	3,6 [2-6]	1,7 [0-3]	0,147

Genótipos descritos em n (%); Probabilidade(P) Teste Chi-quadrado; 95%IC: Intervalo de Confiança de 95%. Todos os grupos estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg ($P > 0,05$).

FONTE: O autor, 2016.

Os grupos em estudo não mostraram diferença nas frequências alélicas ($P=0,147$) e genotípicas para o modelo codominante ($P=0,0142$), determinando que o polimorfismo rs805296 do gene *apoM* não está associado ao DM1 na amostra em estudo.

A TABELA 11 apresenta a comparação das frequências genotípicas e alélicas deste estudo para o polimorfismo rs805296 com outras populações.

TABELA 11 - COMPARAÇÕES ENTRE FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS DO POLIMORFISMO rs805296 DO GENE *apoM* COM A LITERATURA.

GRUPO ÉTNICO	apoM rs805296 CARACTERÍSTICAS	n	GENÓTIPOS (%)			ALELO (%)
			TT	TC	CC	C
Euro-brasileiros (presente estudo)	Crianças controle	169	92,9	9,1	0,0	3,6
	Crianças DM1	148	96,6	3,4	0,0	1,7
Han chineses (XU, W. W. <i>et al.</i> , 2008)	Controles	372	90,9	8,6	0,5	4,8
	Pacientes DAC	418	84,4	14,1	1,5	8,5
Han chineses (ZHAO <i>et al.</i> , 2011)	Controles	389	81,7	17,3	1,0	9,6
	Pacientes AVC	314	70,4	27,4	2,2	15,9
Han chineses (JIAO <i>et al.</i> , 2007)	Controles	225	86,2	13,0	0,0	6,9
	Pacientes DAC	118	72,9	24,6	2,5	14,8
Han chineses (NIU <i>et al.</i> , 2007)	Controles	156	88,5	11,5	0,0	5,8
	Pacientes DM2	170	79,4	20,0	0,6	10,6
Han chineses (ZHANG, P. H. <i>et al.</i> , 2016)	Controles	76	73,7	26,3	0,0	13,2
	Pacientes DM2	259	81,9	17,8	0,3	9,3
Han chineses (WU <i>et al.</i> , 2009)	Controles	316	89,9	10,1	0,0	5,1
	Pacientes DM1	177	79,1	20,9	0,0	10,5
Caucasianos (suecos) (WU <i>et al.</i> , 2009)	Controles	101	94,1	5,9	0,0	3,0
	Pacientes DM1	124	83,9	16,1	0,0	8,1
Han chineses (ZHENG <i>et al.</i> , 2014)	Controles	209	81,3	16,8	1,9	10,3
	Pacientes CAD	206	80,1	18,9	1,0	10,4
Han chineses (ZHENG <i>et al.</i> , 2009)	Controles	118	84,7	15,3	0,0	7,6
	Pacientes CAD	126	78,6	19,8	1,6	11,5

Em negrito destacados os dados das amostras em estudo. AVC: Acidente Vascular Cerebral; DAC: Doença Arterial Coronária; DM1: diabetes *mellitus* tipo 1; DM2: diabetes *mellitus* tipo 2. Intervalo de confiança de 95% para o alelo menor do grupo controle [95%IC 2-6%]. FONTE: O autor, 2016.

A frequência do alelo raro (C) encontrada neste estudo para crianças saudáveis (2,7%), segundo o HapMap foi similar à encontrada em controles saudáveis suíços (3,0%), americanos (4,5%), europeus (1,8%) e na população sul

asiática (3,0%), sendo significativamente menor que a encontrada para africanos (13,1%) e para a população do leste asiático (11,9%) (HAPMAP, 2016b).

A frequência do alelo C no grupo DM1 (1,4%) foi inferior a encontrada em Caucasoídes (8,1%) e em chineses Han (10,5%) (TABELA 11). Esta pode ter sido a razão pela qual não encontramos associação com o DM1 como foi encontrado por Wu e colaboradores (2009) na população chinesa e na sueca, havendo necessidade de aumentar o número amostral do estudo. Contudo, os próprios autores acharam interessante que as populações sueca e chinesa apresentaram a mesma frequência genotípica para o rs805296, uma vez que a incidência do DM1 nestas populações é bem distinta (WU *et al.*, 2009). Outro fato que chama atenção, é que a frequência do alelo C encontrada por Wu e colaboradores (2009) no grupo saudável para a população chinesa e sueca é semelhante ao dos Euro Brasileiros, mas inferior ao reportado para Chineses em outros estudos (TABELA 11).

Não foi encontrada correlação entre os genótipos com as concentrações dos biomarcadores ou dados clínicos dos pacientes. Embora neste trabalho não foi possível correlacionar o rs805396 ao DM1 ou outras comorbidades atreladas a doenças, este polimorfismo já foi fortemente associado ao DM1, tanto na população Chinesa Han quanto na população sueca (WU *et al.*, 2009). Contudo, outro estudo com população Chinesa também não encontrou correlação entre genótipo e fenótipo para este polimorfismo (ZHANG, P. H. *et al.*, 2016).

Outras doenças como consequência do diabetes, sejam por mau controle glicêmico, lipídico ou ambos, o que é mais comum, também tiveram fortes evidências de associação com elevadas concentrações de colesterol e glicemia em jejum, conferindo maior risco de susceptibilidade ao DM2 (NIU *et al.*, 2007).

Jiao e colaboradores (2007) determinaram que os genótipos TC e CC estavam associados à doença arterial coronária (DAC) e com concentrações mais elevadas de colesterol total (CT). Wu e colaboradores (2009) também encontraram que indivíduos saudáveis Chineses que carregavam o genótipo TC apresentava concentrações significativamente maiores de colesterol total que os que carregavam o genótipo TT. Também foi reportado que concentrações plasmáticas de apoM se relacionam positivamente com as concentrações

plasmáticas de colesterol total, LDL-C e HDL-L em humanos (DULLAART *et al.*, 2009). Contudo, o mecanismo contribuinte para esse aumento ainda não foi esclarecido, sendo uma hipótese a localização do polimorfismo, que pode influenciar o metabolismo lipídico e sua expressão. De fato, Wu e colaboradores (2009) demonstraram que o alelo C do rs805296 aumenta a atividade do promotor.

Como a frequência do alelo menos frequente é muito baixa, não sendo identificado nenhum genótipo homozigoto raro (CC) as comparações com as frequências observadas em outras populações têm baixo poder estatístico. Novos estudos com aumento substancial no tamanho amostral são necessários para afirmações consistentes para este polimorfismo.

4.3.3 Polimorfismo rs9404941 do gene *apoM*

A genotipagem do polimorfismo rs9404941 foi realizada através da técnica de PCR-RFLP (*Polymerase Chain Reaction Restriction Fragment Length Polymorphism Read*) e os produtos de PCR foram digeridos com a enzima de restrição *Hae* III (conforme descrito no tópico 3.3 de Material e Métodos) gerando os perfis de restrição detalhados na FIGURA 14.

TABELA 12 - FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS PARA O POLIMORFISMO rs9404941 DO GENE *apoM* NA AMOSTRA EM ESTUDO

	GENÓTIPOS	CONTROLE	DM1	P
	ALELOS	(N=169)	(N=148)	
POLIMORFISMO rs9404941 T>C	CODOMINANTE			
	T/T	160 (94,7)	144 (97,3)	0,142
	T/C	9 (5,3)	4 (2,7)	
	C/C	0 (0)	0 (0)	
	H-W (P)	0,964	0,983	
Alelo C (95%IC)	2,7 [1-4]	1,4 [0-3]	0,245	

Genótipos descritos em n (%). Probabilidade (P), Teste Chi-quadrado. 95%IC, Intervalo de Confiança de 95%. Todos os grupos estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg ($P > 0,05$).

FONTE: O autor, 2016.

Não houve diferença estatística significativa na comparação dos genótipos ($P=0,142$) e frequências alélicas ($P=0,245$) entre os grupos, sugerindo que este polimorfismo não está associado ao DM1 na população em estudo, em concordância com os resultados encontrados por Wu e colaboradores (2009) na população Chinesa Han, embora a frequência do alelo C tenha sido muito superior a encontrada neste estudo (TABELA 12).

TABELA 13 - COMPARAÇÕES ENTRE FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS DO POLIMORFISMO rs9404941 DO GENE *apoM* COM A LITERATURA.

<i>apoM</i> rs9404941			GENÓTIPOS (%)			ALELO (%)
GRUPO ÉTNICO	CARACTERÍSTICAS	n	TT	TC	CC	C
Euro-brasileiros (presente estudo)	Crianças controle	169	94,7	5,3	0,0	2,7
	Crianças DM1	148	97,3	2,7	0,0	1,4
Han chineses (XU, W. W. <i>et al.</i> , 2008)	Controles	372	90,9	8,6	0,5	4,8
	Pacientes DAC	418	84,4	14,1	1,5	8,5
Han chineses (ZHAO <i>et al.</i> , 2011)	Controles	389	71,3	27,2	1,5	15,2
	Pacientes AVC	314	70,0	27,1	2,1	16,4
Han chineses (ZHANG, P. H. <i>et al.</i> , 2016)	Controles	76	61,8	30,3	7,9	23,0
	Pacientes DM2	259	62,5	30,9	6,6	22,0
Han chineses (NIU <i>et al.</i> , 2007)	Controles	156	68,6	30,1	1,3	16,3
	Pacientes DM2	170	77,6	20,6	1,8	12,1
Han chineses (WU <i>et al.</i> , 2009)	Controles	316	70,6	28,5	0,9	15,2
	Pacientes DM1	177	68,4	28,8	2,8	17,2
Han chineses (ZHENG <i>et al.</i> , 2014)	Controles	209	70,8	27,3	1,9	15,6
	Pacientes DAC	196	60,7	33,0	6,3	22,8

Em negrito, destacados os dados das amostras em estudo. AVC: Acidente Vascular Cerebral; DAC: Doença Arterial Coronária; DM1: diabetes *mellitus* tipo 1; DM2: diabetes *mellitus* tipo 2.

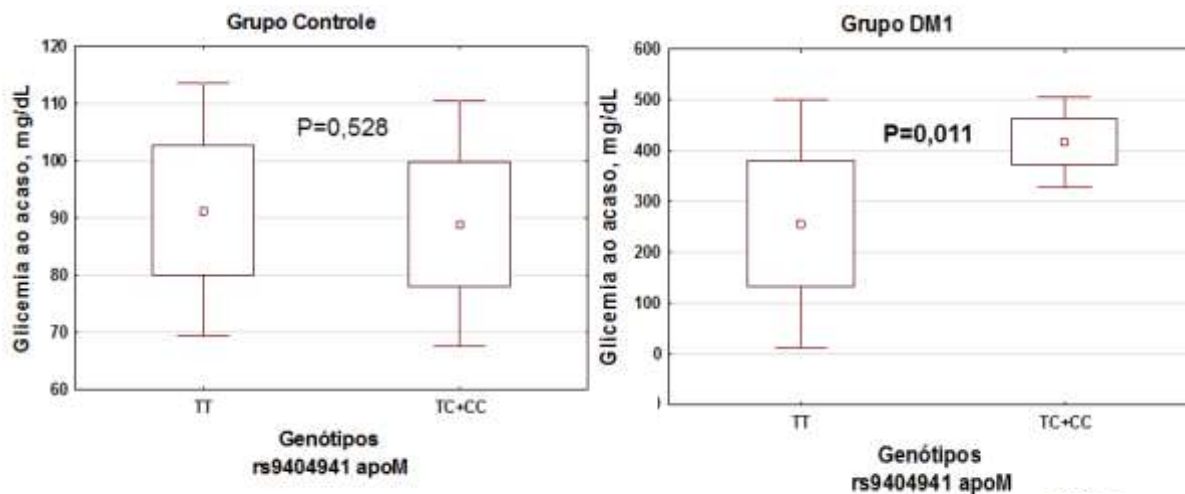
Intervalo de confiança de 95% para o grupo controle [95%IC 1-4%]

FONTE: O autor, 2016.

Não foram encontrados outros estudos para a população caucasóide que associassem este polimorfismo ao DM1. Nosso estudo, não encontrou indivíduos homocigotos para o alelo C na população Euro-brasileira (TABELA 13). A baixa frequência do alelo C observada neste estudo é similar à descrita para a população africana (0,7%). Porém, é inferior a encontrada em outras populações, como na europeia (7,0%) e americana (4,7%). Contudo, na população do leste asiático foi encontrada uma frequência de 24,4% (HAPMAP, 2016a), superando todas as outras populações descritas, inclusive Chineses Han.

Na busca por associação entre os genótipos com as concentrações de marcadores bioquímicos, foram realizadas análises de variância para a população em estudo (FIGURAS 15 e 16).

FIGURA 15 - ASSOCIAÇÃO DO POLIMORFISMO rs9404941 DO GENE *apoM* COM AS CONCENTRAÇÕES DE GLICEMIA AO ACASO PARA OS GRUPOS EM ESTUDO



A concentração da glicemia ao acaso, é apresentada como média, 1-desvio padrão (quadrado) e 2-desvios padrão (barras verticais). P, probabilidade teste t-Student bidirecional.

P<0,05 considerado significativo, destacado em negrito.

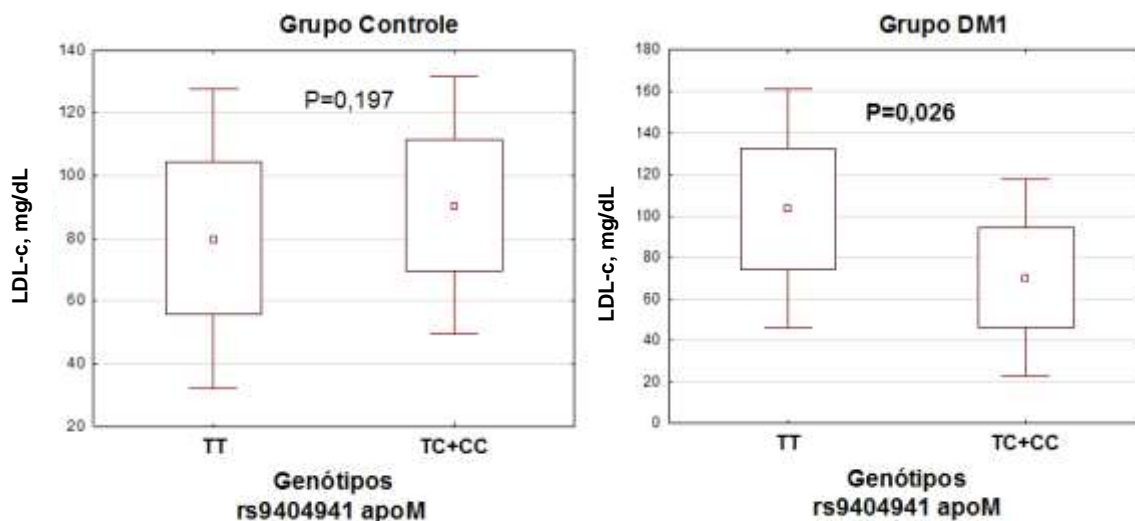
FONTE: O autor, 2016.

A presença do alelo C representado pelo heterozigoto (TC) do polimorfismo rs9404941 foi associada ao aumento da glicemia ao acaso (P=0,011) (FIGURA 15) e redução do LDL-colesterol (FIGURA 16) (P=0,026) em crianças portadoras de DM1, não sendo observada essa associação no grupo de crianças saudáveis (P=0,528).

Em alguns pacientes com diabetes, as concentrações plasmáticas de apoM se encontram diminuídas (HU, Y. W.; ZHENG; WANG, 2010; HUANG, L. Z. *et al.*, 2015), mas ainda precisa ser esclarecido se é devido a traços genéticos, deficiência de insulina, resistência à insulina ao hiperglicemia. Foi mostrado que altas concentrações de glicose podem inibir significativamente a expressão de *apoM in vitro* e *in vitro* (ZHANG, X. *et al.*, 2007). Também foi mostrado em vários estudos a correlação positiva entre as concentrações plasmáticas de apoM e LDL-C (AXLER; AHNSTROM; DAHLBACK, 2007; AHNSTROM *et al.*, 2008; DULLAART *et al.*, 2009; PLOMGAARD *et al.*, 2009). Nossos resultados sugerem que é a combinação de todos estes fatores. A associação do genótipo TC+CC do polimorfismo rs9404941 em indivíduos submetidos a um ambiente hiperglicêmico, como é o caso do grupo DM1 com mau controle glicêmico (TABELA 13), resultaria na supressão da expressão de *apoM*, levando a menores concentrações de LDL-C. Em concordância com nossa hipótese, Zhang e colaboradores (ZHANG, P. H.

et al., 2016) mostraram que indivíduos saudáveis que apresentavam o genótipo TC+CC do polimorfismo rs9404941 tinham concentrações plasmáticas menores de apoM ($21,02 \pm 9,87$ ng/ μ L vs $26,63 \pm 11,92$ ng/ μ L; $P=0.037$) e LDL-C C ($84,17 \pm 16,6$ mg/dL vs $92,7 \pm 14,4$ mg/dL; $P=0.023$).

FIGURA 16 - ASSOCIAÇÃO DO POLIMORFISMO rs9404941 DO GENE *apoM* COM AS CONCENTRAÇÕES DE LDL-COLESTEROL PARA OS GRUPOS EM ESTUDO.



A concentração do LDL-colesterol, é apresentada como média, 1-desvio padrão (quadrado) e 2-desvios padrão (barras verticais). P, probabilidade teste t-Student bidirecional. $P < 0,05$ considerado significativo, destacado em negrito. P: probabilidade. $P < 0,05$ é significativo. FONTE: O autor, 2016.

Tanto para as concentrações de glicemia como para o LDL-c, as comparações não apresentam poder estatístico, sendo demonstrada apenas para ressaltar uma observação que necessita maior investigação com desenho experimental e tamanho amostral apropriados.

4.4 ANÁLISES DE CORRELAÇÃO LINEAR DE PEARSON

Foram identificadas correlações significativas entre os polimorfismos e os parâmetros bioquímicos descritos na TABELA 14, com o grupo controle bem como com o grupo DM1.

TABELA 14 - CORRELAÇÕES SIGNIFICATIVAS ENTRE OS POLIMORFISMOS DO GENE *apoM* E PARÂMETROS LABORATORIAIS NOS GRUPOS EM ESTUDO

POLIMORFISMOS DO GENE <i>apoM</i>	PARÂMETROS BIOQUÍMICOS	GRUPO CONTROLE	GRUPO DM1
rs805296	HDL-C	-	r=0,1967 P=0,021
	Proteína	r= -0,1914 P=0,013	-
	Albumina	r=-0,1530 P=0,013	-
rs805297	Creatinina	-	r=0,1811 P=0,036
	Ureia	-	r=0,1760 P=0,040
rs9404941	Glicose	-	r=0,2116 P=0,040
	LDL-C	-	r=-0,1856 P=0,030

Na análise os polimorfismos no gene *apoM* tiveram os seguintes códigos: 1=TT; 2=TC e 3=CC para o rs805296; 1=CC, 2=CA e 3=AA para o rs805297, 1=TT; 2=TC e 3=CC para o rs9404941. r: coeficiente de correção de Pearson; P: probabilidade da correlação; P<0,05.

FONTE: O autor, 2016.

Na busca por associações entre os polimorfismos e os biomarcadores bioquímicos, realizou-se a análise de correlação linear de Pearson, onde os valores de coeficiente de correlação (r) encontrados no grupo DM1 indicam correlações positivas e fracas ($0,1 \leq r \leq 0,5$) (LESAFFRE *et al.*, 2009). Com exceção do parâmetro LDL-C que apresentou com o rs9404941 correlação negativa e fraca; assim como no grupo controle, que a correlação entre o polimorfismo rs805296 e os biomarcadores proteína total (PT) e albumina (ALB), foram considerados negativamente fracos, sugerindo um pequeno efeito dos polimorfismos sobre os biomarcadores detalhados na TABELA 14.

A correlação positiva entre o polimorfismo rs805296 e as concentrações plasmáticas de HDL-C, embora seja fraca ($r=0,1967$, $P=0,021$), está em concordância com dados da literatura que mostram que a expressão do gene *apoM* está ligada as concentrações de HDL-c. A expressão de ApoM e as concentrações de HDL-C são reguladas pelo HNF-1 (RICHTER *et al.*, 2003). Além disso, Wolfrum e colaboradores (WOLFRUM; POY; STOFFEL, 2005) demonstraram que a superexpressão em 3 vezes de *apoM* resulta no aumento da concentração de HDL, colesterol total e pré β -HDL em aproximadamente o dobro. Embora experimentos biológicos indiquem que a *apoM* regule o

metabolismo da lipoproteína HDL, não há evidências em humanos que variações genéticas no gene da *apoM* influenciariam as concentrações plasmáticas de HDL-c (JIAO *et al.*, 2007).

O polimorfismo rs805396 (T-778C) pode aumentar a expressão de ApoM (WU *et al.*, 2009). Além disso, várias citocinas, incluindo fator ativador plaquetário (*platelet activating fator* – PAF), fator de crescimento transformador β (*transforming growth factor- β* - TGF- β), fator de crescimento epidermal (*epidermal growth factor* – EGF), fator de crescimento hepático (*hepatocyte growth factor* – HGE), e leptina, regulam a expressão de *apoM* *in vivo* e *in vitro* (XU, N. *et al.*, 2002; LUO *et al.*, 2004; XU, N.; HURTIG; *et al.*, 2004; XU, N.; NILSSON-EHLE; *et al.*, 2004; LUO *et al.*, 2005). Também foi sugerido que a apoM poderia ter alguma característica de proteína de fase aguda por apresentar padrão de expressão similar à HSP70 (*heat-shock proteins family*) (XU, X. *et al.*, 2006). Pacientes com DM1 estão sujeitos a processos inflamatórios, condição que reduzem as concentrações plasmáticas de albumina (GOMES *et al.*, 2003). Estas características podem explicar a correlação negativa entre apoM e proteínas totais e albumina.

Como a *apoM* é altamente expressa nas células tubulares proximais (XU, N.; DAHLBACK, 1999; FABER *et al.*, 2006), e tem sido sugerido que apoM poderia funcionar como proteína de fase inflamatória aguda e poderia servir como marcadora de dano renal agudo (XU, X. *et al.*, 2006), era de se esperar correlação entre polimorfismos presente em sua região promotora, os quais possam alterar sua expressão, tivessem correlação com marcadores de função renal (TABELA 14). Contudo, para entendermos as especificidades destas correlações precisaríamos saber o quanto e como os polimorfismos rs805297 e rs9404941 afetam a expressão de *apoM*, bem como seu papel fisiológico no rim.

A correlação do polimorfismo rs9404941 positiva com a glicemia ao acaso e negativa com o LDL-C, reforça nossa hipótese (discutida no item 4.3.3) que pacientes com DM1 com *background* genético (genótipo TC+CC) sujeitos a hiperglicemia poderia levar a menor expressão de *apoM*, resultando em menores concentrações de apoM e LDL-C (FIGURAS 15 e 16).

Através dos resultados de correlação e associação obtidos neste estudo torna-se claro a complexidade do DM1. Os achados no corrente estudo e de

prévios estudos reportados na literatura variam entre diferentes *coortes*. Parte das diferenças encontradas podem ser explicadas pelo grande número de polimorfismos testados em pequenas séries de amostras causando associações por chance bem como falta de detecção por baixo poder estatístico do estudo. Ainda, diferenças nas fases da doença quando feito a amostragem. Diferenças também podem ser relacionadas à variação de incidência da doença em diferentes países. A maioria destas diferenças não pode ser facilmente explicada pelas frequências alélicas dos polimorfismos estudados, tanto nos genes HLA de classe II como não-HLA. Contudo, fatores ambientais e interações gene-ambiente provavelmente explicam estas diferenças e podem também definir qual efeito genético são detectados em cada área geográfica. Ainda, foi mostrado por Lempainen e colaboradores (2015) que associações genéticas de várias vias incluem fases distintas do DM1, alguns afetam a taxa de progressão de uma autoimunidade pancreática pré-estabelecida ou ainda no início. E ainda, realizar estudos de associação genética em indivíduos que apresentam DM1, mas se encontram com progressão natural diferente, ou seja, rápida ou lenta, constitui causa de confusão devido à distribuição aleatória de indivíduos.

A presente dissertação aborda polimorfismos da região promotora do gene da *apoM*. Este é o primeiro estudo com uma população brasileira. Os estudos sobre a apoM, são recentes, e apontam que esta proteína pode ser um elemento capaz de ligar alterações no perfil lipídico, processos inflamatórios e alterações no sistema renal. Portanto, nosso estudo sobre a apoM e seu gene esta apenas começando.

5 CONCLUSÕES

- Os polimorfismos rs805296, rs805297 e rs9404941 do gene *apoM* não foram associados ao DM1 na amostra em estudo no modelo codominante;
- O polimorfismo rs805297 do gene *apoM* foi associado ao DM1 quando analisado no modelo recessivo sugerindo que a presença do alelo A confere menor risco à doença;
- As frequências para os alelos raros dos polimorfismos em estudo foram, no geral, similares aos descritos para outras populações europeias ou Caucasoídes e menores quando comparados a Orientais.
- A presença do alelo A do rs805297 foi associada a um aumento significativo ($P=0,039$) creatinina sérica em pacientes com DM1;
- A presença do alelo C do polimorfismo rs9404941 foi associada ao aumento da glicemia ao acaso ($P=0,011$) e a redução na concentração do LDL-colesterol ($P=0,026$); em crianças portadoras de DM1.

REFERÊNCIAS

- ABI KHALIL, C. *et al.* Cause-specific mortality in diabetes: recent changes in trend mortality. **Eur J Prev Cardiol**. v. 19, n. 3, p. 374-81. 2012.
- ADA. Economic costs of diabetes in the US in 2002. **Diabetes Care**. v. 26, n. p. 917-932. 2003.
- ADA. Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. **Diabetes Care**. v. 37, n. 1, p. 2014a.
- ADA. Standards of medical care in diabetes--2014. **Diabetes Care**. v. 37 n. Supp 1, p. S14-80. 2014b.
- ADA. Classification and diagnosis of diabetes. Sec. 2.
In Standards of Medical Care in Diabetes. **Diabetes Care**. v. 38(Suppl. 1);, n. p. S8–S16
2015.
- ADA. Standards of Medical Care in Diabetes 2016. **The Journal of clinical and applied research and education**. v. 39, n. p. 2016.
- AHNSTROM, J. *et al.* Levels of apolipoprotein M are not associated with the risk of coronary heart disease in two independent case-control studies. **J Lipid Res**. v. 49, n. 9, p. 1912-7. 2008.
- 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.
- AMERICAN DIABETES, A. Standards of Medical Care in Diabetes-2016 Abridged for Primary Care Providers. **Clin Diabetes**. v. 34, n. 1, p. 3-21. 2016.
- ANDERSON, M. S.; BLUESTONE, J. A. The NOD mouse: a model of immune dysregulation. **Annu Rev Immunol**. v. 23, n. p. 447-85. 2005.
- ATKINSON, M. A. The pathogenesis and natural history of type 1 diabetes. **Cold Spring Harb Perspect Med**. v. 2, n. 11, p. 2012.
- 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.
- AXLER, O.; AHNSTROM, J.; DAHLBACK, B. An ELISA for apolipoprotein M reveals a strong correlation to total cholesterol in human plasma. **J Lipid Res**. v. 48, n. 8, p. 1772-80. 2007.

BARCELO, A. *et al.* The cost of diabetes in Latin America and the Caribbean. **Bull World Health Organ.** v. 81, n. 1, p. 19-27. 2003.

BEGOVICH, A. B. *et al.* A missense single-nucleotide polymorphism in a gene encoding a protein tyrosine phosphatase (PTPN22) is associated with rheumatoid arthritis. **Am J Hum Genet.** v. 75, n. 2, p. 330-7. 2004.

BLOOM, A.; HAYES, T. M.; GAMBLE, D. R. Register of newly diagnosed diabetic children. **Br Med J.** v. 3, n. 5983, p. 580-3. 1975.

BLUESTONE, J. A.; HEROLD, K.; EISENBARTH, G. Genetics, pathogenesis and clinical interventions in type 1 diabetes. **Nature.** v. 464, n. 7293, p. 1293-300. 2010.

BONIFACIO, E. *et al.* Early autoantibody responses in prediabetes are IgG1 dominated and suggest antigen-specific regulation. **J Immunol.** v. 163, n. 1, p. 525-32. 1999.

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.

BRINK, S. *et al.* ISPAD Clinical Practice Consensus Guidelines 2014. Sick day management in children and adolescents with diabetes. **Pediatr Diabetes.** v. 15 Suppl 20, n. p. 193-202. 2014.

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

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

BUSE, J. B. *et al.* Serum 1,5-anhydroglucitol (GlycoMark): a short-term glycemic marker. **Diabetes Technol Ther.** v. 5, n. 3, p. 355-63. 2003.

CABRERA, S. M. *et al.* Blood-based signatures in type 1 diabetes. **Diabetologia.** v. 59, n. 3, p. 414-25. 2016.

CAO, B. *et al.* A single-nucleotide polymorphism in the proximal promoter region of the apolipoprotein M gene is associated with dyslipidaemia but not increased coronary artery diseases in Chinese populations. **Lipids Health Dis.** v. 12, n. p. 184. 2013.

CERIOTTI, F. *et al.* Reference intervals for serum creatinine concentrations: assessment of available data for global application. **Clin Chem.** v. 54, n. 3, p. 559-66. 2008.

CHASE, H. P. *et al.* Redefining the clinical remission period in children with type 1 diabetes. **Pediatr Diabetes.** v. 5, n. 1, p. 16-9. 2004.

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.

CHRISTOFFERSEN, C. *et al.* The plasma concentration of HDL-associated apoM is influenced by LDL receptor-mediated clearance of apoB-containing particles. **J Lipid Res.** v. 53, n. 10, p. 2198-204. 2012.

CHRISTOFFERSEN, C. *et al.* Isolation and characterization of human apolipoprotein M-containing lipoproteins. **J Lipid Res.** v. 47, n. 8, p. 1833-43. 2006.

CHRISTOFFERSEN, C. *et al.* Endothelium-protective sphingosine-1-phosphate provided by HDL-associated apolipoprotein M. **Proc Natl Acad Sci U S A.** v. 108, n. 23, p. 9613-8. 2011.

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.

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, n. p. 4-17. 2014.

CUDWORTH, A. G.; WOODROW, J. C. HL-A system and diabetes mellitus. **Diabetes.** v. 24, n. 4, p. 345-9. 1975.

DAHLBACK, B.; NIELSEN, L. B. Apolipoprotein M--a novel player in high-density lipoprotein metabolism and atherosclerosis. **Curr Opin Lipidol.** v. 17, n. 3, p. 291-5. 2006.

DAHLQUIST, G. *et al.* The Swedish childhood diabetes study--results from a nine year case register and a one year case-referent study indicating that type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus is associated with both type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus and autoimmune disorders. **Diabetologia.** v. 32, n. 1, p. 2-6. 1989.

DANNE, T. *et al.* ISPAD Clinical Practice Consensus Guidelines 2014. Insulin treatment in children and adolescents with diabetes. **Pediatr Diabetes.** v. 15 Suppl 20, n. p. 115-34. 2014.

DATASUS. **Número de diabéticos, hipertensos e diabéticos com hipertensão por sexo, tipo e risco.** Disponível em: <<http://hiperdia.datasus.gov.br/hiperelhhiperrisco.asp>>. Acesso em: 09/07/2015.

DAVIES, J. L. *et al.* A genome-wide search for human type 1 diabetes susceptibility genes. **Nature.** v. 371, n. 6493, p. 130-6. 1994.

DIABETES, C. *et al.* Modern-day clinical course of type 1 diabetes mellitus after 30 years' duration: the diabetes control and complications trial/epidemiology of diabetes interventions and complications and Pittsburgh epidemiology of diabetes complications experience (1983-2005). **Arch Intern Med.** v. 169, n. 14, p. 1307-16. 2009.

DONAGHUE, K. C. *et al.* ISPAD Clinical Practice Consensus Guidelines 2014. Microvascular and macrovascular complications in children and adolescents. **Pediatr Diabetes.** v. 15 Suppl 20, n. p. 257-69. 2014.

DUAN, J.; DAHLBACK, B.; VILLOUTREIX, B. O. Proposed lipocalin fold for apolipoprotein M based on bioinformatics and site-directed mutagenesis. **FEBS Lett.** v. 499, n. 1-2, p. 127-32. 2001.

DULLAART, R. P. *et al.* Plasma apolipoprotein M is reduced in metabolic syndrome but does not predict intima media thickness. **Clin Chim Acta.** v. 406, n. 1-2, p. 129-33. 2009.

DUNGER, D. B. *et al.* ESPE/LWPES consensus statement on diabetic ketoacidosis in children and adolescents. **Arch Dis Child.** v. 89, n. 2, p. 188-94. 2004.

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.

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.

EDIC. Sustained effect of intensive treatment of type 1 diabetes mellitus on development and progression of diabetic nephropathy: the Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications (EDIC) study. **JAMA.** v. 290, n. 16, p. 2159-67. 2003.

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

FABER, K. *et al.* Characterization of apoM in normal and genetically modified mice. **J Lipid Res.** v. 45, n. 7, p. 1272-8. 2004.

FABER, K. *et al.* Megalin is a receptor for apolipoprotein M, and kidney-specific megalin-deficiency confers urinary excretion of apolipoprotein M. **Mol Endocrinol.** v. 20, n. 1, p. 212-8. 2006.

FRANZESE, A.; VALERIO, G.; SPAGNUOLO, M. I. Management of diabetes in childhood: are children small adults? **Clin Nutr.** v. 23, n. 3, p. 293-305. 2004.

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

GAVIN, J. R. *et al.* Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. **Diabetes Care.** v. 25, n. p. 2002.

GLASER, N. *et al.* Risk factors for cerebral edema in children with diabetic ketoacidosis. The Pediatric Emergency Medicine Collaborative Research Committee of the American Academy of Pediatrics. **N Engl J Med.** v. 344, n. 4, p. 264-9. 2001.

GLASTRAS, S. J.; MOHSIN, F.; DONAGHUE, K. C. Complications of diabetes mellitus in childhood. **Pediatr Clin North Am.** v. 52, n. 6, p. 1735-53. 2005.

GOLDENBERG, P. *et al.* Prevalence of diabetes mellitus: gender differences and sex equalities. **Rev. bras. epidemiol.** v. 6, n. 1, p. 18-28. 2003.

GOLEMBIEWSKA, E. *et al.* Renal handling of uric acid in patients with type 1 diabetes in relation to glycemic control. **Arch Med Res.** v. 36, n. 1, p. 32-5. 2005.

GOMES, M. B. *et al.* Acute-phase proteins among patients with type 1 diabetes. **Diabetes Metab.** v. 29, n. 4 Pt 1, p. 405-11. 2003.

GONZALEZ-SICILIA, L. *et al.* Renal metabolism of uric acid in type I insulin-dependent diabetic patients: relation to metabolic compensation. **Horm Metab Res.** v. 29, n. 10, p. 520-3. 1997.

GROOP, L.; POCIOT, F. Genetics of diabetes--are we missing the genes or the disease? **Mol Cell Endocrinol.** v. 382, n. 1, p. 726-39. 2014.

GRUBER, N. *et al.* Increased risk of severe diabetic ketoacidosis among Jewish ultra-orthodox children. **Acta Diabetol.** v. 52, n. 2, p. 365-71. 2015.

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.

HANAS, R.; LINDGREN, F.; LINDBLAD, B. Diabetic ketoacidosis and cerebral oedema in Sweden--a 2-year paediatric population study. **Diabet Med.** v. 24, n. 10, p. 1080-5. 2007.

HAPMAP. **International HapMap Project.** Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=9404941>. Acesso em: 03/10/2016.

HAPMAP. **International HapMap Project.** Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=805296>. Acesso em:

HAPMAP. **International HapMap Project.** Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=805297#map>. Acesso em: 29/09/2016.

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.

HU, H. J. *et al.* Common variants at the promoter region of the APOM confer a risk of rheumatoid arthritis. **Exp Mol Med.** v. 43, n. 11, p. 613-21. 2011.

HU, Y. W.; ZHENG, L.; WANG, Q. Characteristics of apolipoprotein M and its relation to atherosclerosis and diabetes. **Biochim Biophys Acta.** v. 1801, n. 2, p. 100-5. 2010.

HUANG, L. Z. *et al.* Apolipoprotein M: Research progress, regulation and metabolic functions (Review). **Mol Med Rep.** v. 12, n. 2, p. 1617-24. 2015.

HUANG, X. S. *et al.* Apolipoprotein M likely extends its anti-atherogenesis via anti-inflammation. **Med Hypotheses**. v. 69, n. 1, p. 136-40. 2007.

IDF. Pocketbook for management of diabetes in childhood and adolescence in under-resourced countries. v. n. p. 2013.

IDF. Diabetes Atlas. v. 7 ed, n. p. 2015a.

IDF. Diabetes Atlas v. n. p. 2015b.

JACOBSEN, L.; SCHATZ, D. Current and future efforts toward the prevention of type 1 diabetes. **Pediatr Diabetes**. v. 17 Suppl 22, n. p. 78-86. 2016.

JIAO, G. Q. *et al.* A prospective evaluation of apolipoprotein M gene T-778C polymorphism in relation to coronary artery disease in Han Chinese. **Clin Biochem**. v. 40, n. 15, p. 1108-12. 2007.

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

KITABCHI, A. E. *et al.* Management of hyperglycemic crises in patients with diabetes. **Diabetes Care**. v. 24, n. 1, p. 131-53. 2001.

KLATZO, I. Presidential address. Neuropathological aspects of brain edema. **J Neuropathol Exp Neurol**. v. 26, n. 1, p. 1-14. 1967.

KNIP, M. *et al.* Humoral beta-cell autoimmunity in relation to HLA-defined disease susceptibility in preclinical and clinical type 1 diabetes. **Am J Med Genet**. v. 115, n. 1, p. 48-54. 2002.

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.

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.

LANDER, E. S.; SCHORK, N. J. Genetic dissection of complex traits. **Science**. v. 265, n. 5181, p. 2037-48. 1994.

LEMPAINEN, J. *et al.* Non-HLA gene effects on the disease process of type 1 diabetes: From HLA susceptibility to overt disease. **J Autoimmun**. v. 61, n. p. 45-53. 2015.

LESAFFRE, E. *et al.* Association Between Variables. In. **Statistical Methods for Studying Associations Between Variables, in Statistical and Methodological Aspects of Oral Health Research**, 2009. p.795-835.

LI, H. *et al.* Possible human leukocyte antigen-mediated genetic interaction between type 1 and type 2 Diabetes. **J Clin Endocrinol Metab.** v. 86, n. 2, p. 574-82. 2001.

LIU, X. *et al.* Bioengineering Strategies for the Treatment of Type I Diabetes. **J Biomed Nanotechnol.** v. 12, n. 4, p. 581-601. 2016.

LUO, G. *et al.* Leptin inhibits apolipoprotein M transcription and secretion in human hepatoma cell line, HepG2 cells. **Biochim Biophys Acta.** v. 1734, n. 2, p. 198-202. 2005.

LUO, G. *et al.* Apolipoprotein M. **Lipids Health Dis.** v. 3, n. p. 21. 2004.

MAAHS, D. M. *et al.* Total cholesterol and high-density lipoprotein levels in pediatric subjects with type 1 diabetes mellitus. **J Pediatr.** v. 147, n. 4, p. 544-6. 2005.

MAAHS, D. M.; REWERS, M. Editorial: Mortality and renal disease in type 1 diabetes mellitus--progress made, more to be done. **J Clin Endocrinol Metab.** v. 91, n. 10, p. 3757-9. 2006.

MAGOULA, I. *et al.* Insulin-dependent diabetes and renal hypouricemia. **Nephron.** v. 59, n. 1, p. 21-6. 1991.

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.

MARGEIRSDOTTIR, H. D. *et al.* High prevalence of cardiovascular risk factors in children and adolescents with type 1 diabetes: a population-based study. **Diabetologia.** v. 51, n. 4, p. 554-61. 2008.

MAYO, P. *et al.* CNV analysis using TaqMan copy number assays. **Curr Protoc Hum Genet.** v. Chapter 2, n. p. Unit2 13. 2010.

MEIJERMAN, I. *et al.* Pharmacogenetic screening of the gene deletion and duplications of CYP2D6. **Drug Metab Rev.** v. 39, n. 1, p. 45-60. 2007.

MELENDEZ-RAMIREZ, L. Y.; RICHARDS, R. J.; CEFALU, W. T. Complications of type 1 diabetes. **Endocrinol Metab Clin North Am.** v. 39, n. 3, p. 625-40. 2010.

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.

NERBY, C. L.; STICKLE, D. F. 1,5-anhydroglucitol monitoring in diabetes: a mass balance perspective. **Clin Biochem.** v. 42, n. 3, p. 158-67. 2009.

NERUP, J. *et al.* HL-A antigens and diabetes mellitus. **Lancet.** v. 2, n. 7885, p. 864-6. 1974.

NGUYEN, T. M. *et al.* Serum 1,5-anhydroglucitol (Glycomark) levels in children with and without type 1 diabetes mellitus. **Pediatr Diabetes.** v. 8, n. 4, p. 214-9. 2007.

NIELSEN, L. B. *et al.* ApoM: gene regulation and effects on HDL metabolism. **Trends Endocrinol Metab.** v. 20, n. 2, p. 66-71. 2009.

NIERRAS, C. R.; ATKINSON, M. A.; GOLDSTEIN, R. A. The Juvenile Diabetes Research Foundation at forty: updates of research in type 1 diabetes. **Diabetes.** v. 59, n. 7, p. 1575-7. 2010.

NIMRI, R.; PHILLIP, M.; SHALITIN, S. Children diagnosed with diabetes during infancy have unique clinical characteristics. **Horm Res.** v. 67, n. 6, p. 263-7. 2007.

NISTICO, L. *et al.* The CTLA-4 gene region of chromosome 2q33 is linked to, and associated with, type 1 diabetes. Belgian Diabetes Registry. **Hum Mol Genet.** v. 5, n. 7, p. 1075-80. 1996.

NIU, N. *et al.* Single nucleotide polymorphisms in the proximal promoter region of apolipoprotein M gene (apoM) confer the susceptibility to development of type 2 diabetes in Han Chinese. **Diabetes Metab Res Rev.** v. 23, n. 1, p. 21-5. 2007.

NOBLE, J. A.; ERLICH, H. A. Genetics of type 1 diabetes. **Cold Spring Harb Perspect Med.** v. 2, n. 1, p. a007732. 2012.

NOJIRI, T. *et al.* Modulation of sphingosine-1-phosphate and apolipoprotein M levels in the plasma, liver and kidneys in streptozotocin-induced diabetic mice. **J Diabetes Investig.** v. 5, n. 6, p. 639-48. 2014.

PATTERSON, C. C. *et al.* Incidence trends for childhood type 1 diabetes in Europe during 1989-2003 and predicted new cases 2005-20: a multicentre prospective registration study. **Lancet.** v. 373, n. 9680, p. 2027-33. 2009.

PERAKAKIS, N.; MANTZOROS, C. S. Immune therapy in type 1 diabetes mellitus - Attempts to untie the Gordian knot? **Metabolism.** v. 65, n. 9, p. 1278-85. 2016.

PETITTI, D. B. *et al.* Serum lipids and glucose control: the SEARCH for Diabetes in Youth study. **Arch Pediatr Adolesc Med.** v. 161, n. 2, p. 159-65. 2007.

PLOMGAARD, P. *et al.* Apolipoprotein M predicts pre-beta-HDL formation: studies in type 2 diabetic and nondiabetic subjects. **J Intern Med.** v. 266, n. 3, p. 258-67. 2009.

POCIOT, F.; MCDERMOTT, M. F. Genetics of type 1 diabetes mellitus. **Genes Immun.** v. 3, n. 5, p. 235-49. 2002.

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

RABINOWE, S. L.; EISENBARTH, G. S. Type I diabetes mellitus: a chronic autoimmune disease? **Pediatr Clin North Am.** v. 31, n. 3, p. 531-43. 1984.

RAMESAN, R. M.; SHARMA, C. P. Challenges and advances in nanoparticle-based oral insulin delivery. **Expert Rev Med Devices.** v. 6, n. 6, p. 665-76. 2009.

RAPOPORT, S. I. A mathematical model for vasogenic brain edema. **J Theor Biol.** v. 74, n. 3, p. 439-67. 1978.

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

REDONDO, M. J. *et al.* Dissecting heterogeneity in paediatric Type 1 diabetes: association of TCF7L2 rs7903146 TT and low-risk human leukocyte antigen (HLA) genotypes. **Diabet Med.** v. n. p. 2016.

REN, K. *et al.* Apolipoprotein M. **Clin Chim Acta.** v. 446, n. p. 21-29. 2015.

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

RICHTER, S. *et al.* Regulation of apolipoprotein M gene expression by MODY3 gene hepatocyte nuclear factor-1alpha: haploinsufficiency is associated with reduced serum apolipoprotein M levels. **Diabetes.** v. 52, n. 12, p. 2989-95. 2003.

RIDKER, P. M. *et al.* Plasma concentration of interleukin-6 and the risk of future myocardial infarction among apparently healthy men. **Circulation.** v. 101, n. 15, p. 1767-72. 2000.

RODRIGUEZ, B. L. *et al.* Prevalence of cardiovascular disease risk factors in U.S. children and adolescents with diabetes: the SEARCH for diabetes in youth study. **Diabetes Care.** v. 29, n. 8, p. 1891-6. 2006.

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

ROSENSTOCK, J. Insulin therapy: optimizing control in type 1 and type 2 diabetes. **Clin Cornerstone.** v. 4, n. 2, p. 50-64. 2001.

SBD. Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes. **Sociedade Brasileira de Diabetes.** v. n. p. p.5. 2014.

SBD. Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes **Sociedade Brasileira de Diabetes.** v. n. p. 348. 2016.

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

SCHWAB, K. O. *et al.* Spectrum and prevalence of atherogenic risk factors in 27,358 children, adolescents, and young adults with type 1 diabetes: cross-sectional data from the German diabetes documentation and quality management system (DPV). **Diabetes Care.** v. 29, n. 2, p. 218-25. 2006.

SHAH, A. S. *et al.* Change in adiposity minimally affects the lipid profile in youth with recent onset type 1 diabetes. **Pediatr Diabetes.** v. 16, n. 4, p. 280-6. 2015.

SHAN, G. A note on exact conditional and unconditional tests for Hardy-Weinberg equilibrium. **Hum Hered.** v. 76, n. 1, p. 10-7. 2013.

SHIH, D. Q. *et al.* Hepatocyte nuclear factor-1alpha is an essential regulator of bile acid and plasma cholesterol metabolism. **Nat Genet.** v. 27, n. 4, p. 375-82. 2001.

SILVEIRA, V. *et al.* Uma Amostra de Pacientes com Diabetes Tipo 1 no Sul do Brasil **Arq Bras Endocrinol Metab.** v. 45, n. 5, p. 8. 2001.

SIMELL, O.; WINTER, W. E.; SCHATZ, D. Enhancing the understanding of pre-type 1 diabetes in the general population. **Diabetes Care.** v. 33, n. 6, p. 1403-5. 2010.

SKUPIEN, J. *et al.* Evaluation of Apolipoprotein M Serum Concentration as a Biomarker of HNF-1alpha MODY. **Rev Diabet Stud.** v. 4, n. 4, p. 231-5. 2007.

SMYTH, D. J. *et al.* Shared and distinct genetic variants in type 1 diabetes and celiac disease. **N Engl J Med.** v. 359, n. 26, p. 2767-77. 2008.

SNELL-BERGEON, J. K. *et al.* Inflammatory markers are increased in youth with type 1 diabetes: the SEARCH Case-Control study. **J Clin Endocrinol Metab.** v. 95, n. 6, p. 2868-76. 2010.

SOBRINO, B.; BRION, M.; CARRACEDO, A. SNPs in forensic genetics: a review on SNP typing methodologies. **Forensic Sci Int.** v. 154, n. 2-3, p. 181-94. 2005.

SOUZA, L. C. *et al.* Diabetic ketoacidosis as initial presentation of type 1 diabetes in children: epidemiological study in South of Brazil. In. **Management of Diabetes (posters)**. Abstract presented at Endocrine Society's 98th Annual Meeting and Expo, April 1-4, 2016 - Boston, 2016. p.SAT-724-SAT-724.

SOUZA, O. L. *et al.* [Prevalence of thyroid autoimmunity in a group of patients with type 1 diabetes mellitus in Londrina, PR]. **Arq Bras Endocrinol Metabol.** v. 49, n. 2, p. 228-33. 2005.

STECK, A. K. *et al.* Predictors of Progression From the Appearance of Islet Autoantibodies to Early Childhood Diabetes: The Environmental Determinants of Diabetes in the Young (TEDDY). **Diabetes Care.** v. n. p. 2015.

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.

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

SZYPOWSKA, A.; SKORKA, A. The risk factors of ketoacidosis in children with newly diagnosed type 1 diabetes mellitus. **Pediatr Diabetes.** v. 12, n. 4 Pt 1, p. 302-6. 2011.

TABATABAEI-MALAZY, O. *et al.* Prevalence of dyslipidemia in iran: a systematic review and meta-analysis study. **Int J Prev Med**. v. 5, n. 4, p. 373-93. 2014.

TANG, S. *et al.* Association of the PTPN22 gene (+1858C/T, -1123G/C) polymorphisms with type 1 diabetes mellitus: a systematic review and meta-analysis. **Diabetes Res Clin Pract**. v. 97, n. 3, p. 446-52. 2012.

TARGHER, G. *et al.* Elevated levels of interleukin-6 in young adults with type 1 diabetes without clinical evidence of microvascular and macrovascular complications. **Diabetes Care**. v. 24, n. 5, p. 956-7. 2001.

TASKER, R. C.; ACERINI, C. L. Cerebral edema in children with diabetic ketoacidosis: vasogenic rather than cellular? **Pediatr Diabetes**. v. 15, n. 4, p. 261-70. 2014.

THABIT, H.; HOVORKA, R. Coming of age: the artificial pancreas for type 1 diabetes. **Diabetologia**. v. 59, n. 9, p. 1795-805. 2016.

THE-DIABETES-CONTROL-AND-COMPLICATIONS-TRIAL-RESEARCH-GROUP. The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. The Diabetes Control and Complications Trial Research Group. **N Engl J Med**. v. 329, n. 14, p. 977-86. 1993.

TILLIL, H.; KOBBERLING, J. Age-corrected empirical genetic risk estimates for first-degree relatives of IDDM patients. **Diabetes**. v. 36, n. 1, p. 93-9. 1987.

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

USHER-SMITH, J. A. *et al.* Variation between countries in the frequency of diabetic ketoacidosis at first presentation of type 1 diabetes in children: a systematic review. **Diabetologia**. v. 55, n. 11, p. 2878-94. 2012.

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.

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.

VANBUECKEN, D.; LORD, S.; GREENBAUM, C. J. Changing the Course of Disease in Type 1 Diabetes. 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

VANIKAR, A. V.; TRIVEDI, H. L.; THAKKAR, U. G. Stem cell therapy emerging as the key player in treating type 1 diabetes mellitus. **Cytotherapy**. v. 18, n. 9, p. 1077-86. 2016.

VAREWIJCK, A. J.; JANSSEN, J. A. Insulin and its analogues and their affinities for the IGF1 receptor. **Endocr Relat Cancer**. v. 19, n. 5, p. F63-75. 2012.

VELLA, A. *et al.* Localization of a type 1 diabetes locus in the IL2RA/CD25 region by use of tag single-nucleotide polymorphisms. **Am J Hum Genet**. v. 76, n. 5, p. 773-9. 2005.

VENTECLEF, N. *et al.* Regulation of anti-atherogenic apolipoprotein M gene expression by the orphan nuclear receptor LRH-1. **J Biol Chem**. v. 283, n. 7, p. 3694-701. 2008.

VENTECLEF, N. *et al.* Liver receptor homolog 1 is a negative regulator of the hepatic acute-phase response. **Mol Cell Biol**. v. 26, n. 18, p. 6799-807. 2006.

VLAD, A.; TIMAR, R. Pathogenesis of type 1 diabetes mellitus: a brief overview. **Rom J Diabetes Nutr Metab Dis**. v. 19, n. 1, p. 67-72. 2012.

WANG, Y.; CHEN, H. Use of Percentiles and Z -Scores in Anthropometry. In: PREEDY, V. R. **Handbook of Anthropometry: Physical Measures of Human Form in Health and Disease**, 2012. p.3107.

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.

WHITE, N. H. Diabetic ketoacidosis in children. **Endocrinol Metab Clin North Am**. v. 29, n. 4, p. 657-82. 2000.

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.

WHITE, N. H. *et al.* Prolonged effect of intensive therapy on the risk of retinopathy complications in patients with type 1 diabetes mellitus: 10 years after the Diabetes Control and Complications Trial. **Arch Ophthalmol**. v. 126, n. 12, p. 1707-15. 2008.

WHO. Definition and diagnosis of diabetes mellitus and intermediate hyperglycemia. v. n. p. 50. 2006.

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.

WOLFRUM, C. *et al.* Foxa2 regulates lipid metabolism and ketogenesis in the liver during fasting and in diabetes. **Nature**. v. 432, n. 7020, p. 1027-32. 2004.

WOLFRUM, C. *et al.* Insulin regulates the activity of forkhead transcription factor Hnf-3beta/Foxa-2 by Akt-mediated phosphorylation and nuclear/cytosolic localization. **Proc Natl Acad Sci U S A**. v. 100, n. 20, p. 11624-9. 2003.

WOLFRUM, C. *et al.* Foxa2 activity increases plasma high density lipoprotein levels by regulating apolipoprotein M. **J Biol Chem**. v. 283, n. 24, p. 16940-9. 2008.

WOLFRUM, C.; POY, M. N.; STOFFEL, M. Apolipoprotein M is required for prebeta-HDL formation and cholesterol efflux to HDL and protects against atherosclerosis. **Nat Med**. v. 11, n. 4, p. 418-22. 2005.

WOLFSDORF, J. *et al.* Diabetic ketoacidosis in children and adolescents with diabetes. **Pediatr Diabetes**. v. 10 Suppl 12, n. p. 118-33. 2009.

WOLFSDORF, J. *et al.* 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.

WRITING TEAM FOR THE DIABETES, C.; COMPLICATIONS TRIAL/EPIDEMIOLOGY OF DIABETES, I.; COMPLICATIONS RESEARCH, G. Effect of intensive therapy on the microvascular complications of type 1 diabetes mellitus. **JAMA**. v. 287, n. 19, p. 2563-9. 2002.

WU, X. *et al.* Apolipoprotein M promoter polymorphisms alter promoter activity and confer the susceptibility to the development of type 1 diabetes. **Clin Biochem**. v. 42, n. 1-2, p. 17-21. 2009.

XU, N.; DAHLBACK, B. A novel human apolipoprotein (apoM). **J Biol Chem**. v. 274, n. 44, p. 31286-90. 1999.

XU, N. *et al.* Transforming growth factor-beta down-regulates apolipoprotein M in HepG2 cells. **Biochim Biophys Acta**. v. 1683, n. 1-3, p. 33-7. 2004.

XU, N. *et al.* Both leptin and leptin-receptor are essential for apolipoprotein M expression in vivo. **Biochem Biophys Res Commun**. v. 321, n. 4, p. 916-21. 2004.

XU, N. *et al.* Effects of platelet-activating factor, tumor necrosis factor, and interleukin-1alpha on the expression of apolipoprotein M in HepG2 cells. **Biochem Biophys Res Commun**. v. 292, n. 4, p. 944-50. 2002.

XU, W. W. *et al.* A genetic variant of apolipoprotein M increases susceptibility to coronary artery disease in a Chinese population. **Clin Exp Pharmacol Physiol**. v. 35, n. 5-6, p. 546-51. 2008.

XU, X. *et al.* Effects of ischemia-reperfusion injury on apolipoprotein M expression in the liver. **Transplant Proc**. v. 38, n. 9, p. 2769-73. 2006.

XU, X. L. *et al.* Urinary apolipoprotein M could be used as a biomarker of acute renal injury: an ischemia-reperfusion injury model of kidney in rat. **Transplant Proc**. v. 45, n. 6, p. 2476-9. 2013.

YANG, J. H. *et al.* Evidence of association with type 1 diabetes in the SLC11A1 gene region. **BMC Med Genet.** v. 12, n. p. 59. 2011.

YUDKIN, J. S. *et al.* Inflammation, obesity, stress and coronary heart disease: is interleukin-6 the link? **Atherosclerosis.** v. 148, n. 2, p. 209-14. 2000.

ZHANG, P. H. *et al.* A single-nucleotide polymorphism C-724 /del in the proter region of the apolipoprotein M gene is associated with type 2 diabetes mellitus. **Lipids Health Dis.** v. 15, n. p. 142. 2016.

ZHANG, X. *et al.* Hyperglycemia down-regulates apolipoprotein M expression in vivo and in vitro. **Biochim Biophys Acta.** v. 1771, n. 7, p. 879-82. 2007.

ZHANG, X. Y. *et al.* Expression pattern of apolipoprotein M during mouse and human embryogenesis. **Acta Histochem.** v. 106, n. 2, p. 123-8. 2004.

ZHAO, D. *et al.* Association of apolipoprotein M gene polymorphisms with ischemic stroke in a Han Chinese population. **J Mol Neurosci.** v. 43, n. 3, p. 370-5. 2011.

ZHENG, L. *et al.* Decreased activities of apolipoprotein m promoter are associated with the susceptibility to coronary artery diseases. **Int J Med Sci.** v. 11, n. 4, p. 365-72. 2014.


ZHENG, L. *et al.* Determination of single-nucleotide polymorphism in the proximal promoter region of apolipoprotein M gene in coronary artery diseases. **Int J Gen Med.** v. 2, n. p. 177-82. 2009.

ZHOU, J. W. *et al.* Apolipoprotein M gene (APOM) polymorphism modifies metabolic and disease traits in type 2 diabetes. **PLoS One.** v. 6, n. 2, p. e17324. 2011.

ZURBIG, P. *et al.* Urinary proteomics for early diagnosis in diabetic nephropathy. **Diabetes.** v. 61, n. 12, p. 3304-13. 2012.

ANEXO 1

Termo de aprovação do comitê de ética.

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: 24678613.6.0000.0102									
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, Letícia Carneiro Gomes, Railson Henneberg, SUZANA NESI FRANÇA.									
Objetivo da Pesquisa:									
<p>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.</p> <p>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.</p>									
<table border="0"> <tr> <td>Endereço: Rua Padre Camargo, 280</td> <td>CEP: 80.060-240</td> </tr> <tr> <td>Bairro: 2º andar</td> <td></td> </tr> <tr> <td>UF: PR</td> <td>Município: CURITIBA</td> </tr> <tr> <td>Telefone: (41)3360-7259</td> <td>E-mail: cometica.saude@ufpr.br</td> </tr> </table>		Endereço: Rua Padre Camargo, 280	CEP: 80.060-240	Bairro: 2º andar		UF: PR	Município: CURITIBA	Telefone: (41)3360-7259	E-mail: cometica.saude@ufpr.br
Endereço: Rua Padre Camargo, 280	CEP: 80.060-240								
Bairro: 2º andar									
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
UF: PR Município: CURITIBA CEP: 80.060-240
Telefone: (41)3360-7259 E-mail: cometica.saude@ufpr.br

ANEXO 2

Termo de consentimento livre e esclarecido para participantes menores (A), os quais eram assinados pelos pais ou responsáveis legais, e para participantes acima de 12 anos (B), respectivamente.

A

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.

Rubricas:	
Sujeito da Pesquisa e /ou responsável legal _____	
Pesquisador Responsável _____	
Orientador _____	Orientado _____

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

- 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>
--

B**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 6.554/77
na data de 23/05/2014

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

Questionário aplicado aos indivíduos participantes da pesquisa.

COLETA DE DADOS

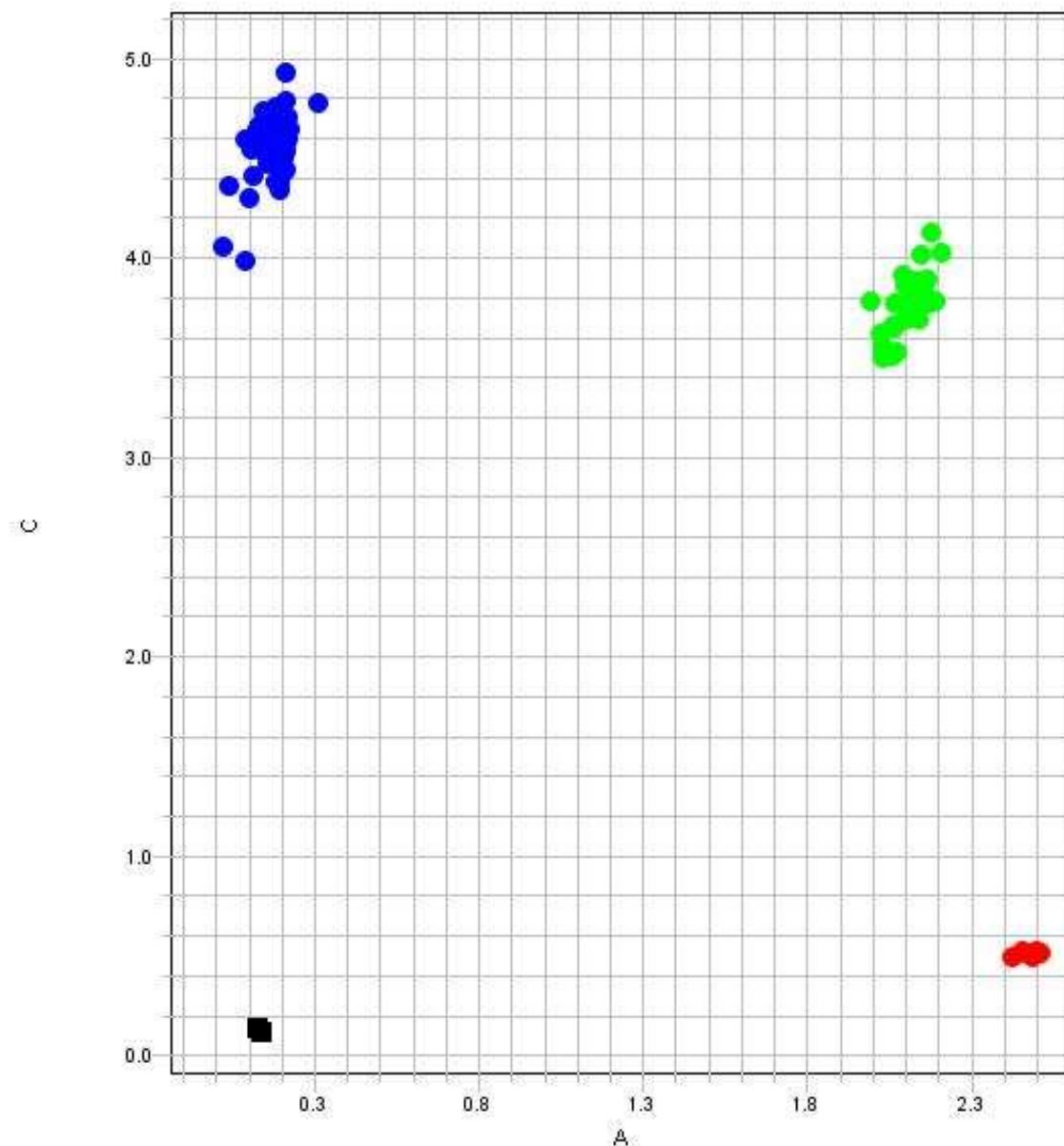
Paciente nº _____

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 4

PCR EM TEMPO REAL PARA O GENE *apoM*. Gráfico de discriminação alélica do SNP rs805297. Em azul estão amostras homocigotas para o alelo C (CC); em verde, amostras heterocigotas com genótipo CA e em vermelho, amostras homocigotas para o alelo A (AA).

Allelic Discrimination Plot**Legend**

● A/A
● A/C

● C/C
X Undetermined