

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

DANIELLY ROESLER



ASSOCIAÇÃO DOS POLIMORFISMOS DE NUCLEOTÍDEO ÚNICO NOS GENES
DA FRUTOSAMINA-3-QUINASE E DA HEXOQUINASE-1 NO
DIABETES MELLITUS TIPO 1

CURITIBA

2018

DANIELLY ROESLER

ASSOCIAÇÃO DOS POLIMORFISMOS DE NUCLEOTÍDEO ÚNICO NOS GENES
DA FRUTOSAMINA-3-QUINASE E DA HEXOQUINASE-1 NO
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 Ciências da Saúde, da Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof^ª. Dra. Dayane Alberton
Coorientador: Prof. Dr. Geraldo Picheth

CURITIBA

2018

Roesler, Danielly

Associação dos polimorfismos de nucleotídeo único nos genes FN3K e HK1 no *Diabetes Mellitus* tipo 1 / Danielly Roesler – Curitiba, 2018.

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

Orientadora: Professora Dra. Dayane Alberton

Coorientador: Professor 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 1. 2. Frutosamina. 3. Hexoquinase. 4. Polimorfismo de nucleotídeo único. Alberton, Dayane. II. Picheth, Geraldo. III. Universidade Federal do Paraná. IV. Título.

CDD 616.462



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR CIÊNCIAS DA SAÚDE
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **DANIELLY ROESLER** intitulada: **ASSOCIAÇÃO DOS POLIMORFISMOS DE NUCLEOTÍDEO ÚNICO NOS GENES DA FRUTOSAMINA-3-QUINASE E DA HEXOQUINASE-1 NO DIABETES MELLITUS TIPO 1**, após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

Curitiba, 12 de Abril de 2018.

DAYANE ALBERTON

Presidente da Banca Examinadora (UFPR)

GERALDO PICHETH

Avaliador Interno (UFPR)

MAUREN ISFER ANGHEBEM OLIVEIRA

Avaliador Externo (UFPR)

FABIANE GOMES DE MORAES REGO

Avaliador Interno (UFPR)

Dedico este trabalho Àquele que
nunca me deixou, nem na tempestade,
nem na paz. Meu Deus, meu pai.

AGRADECIMENTOS

À Deus pelo dom da vida, pela saúde, sustento e todas as grandes oportunidades que me deu.

Dedico este trabalho aos meus pais Carlos Alberto Roesler e Marli Aparecida Pedroso Roesler que não pouparam esforços para levantar meus olhos e perseverar pelos meus objetivos. Sem o apoio, incentivo e encorajamento, a caminhada teria sido muito mais dura. Vocês são meu exemplo de vida e meu alicerce.

Aos meus professores de graduação, Dra. Cristiane Silva Paula e Msc. Javier Gamarra Junior, que muito me incentivaram a buscar mais conhecimento e carinhosamente não pouparam tempo para longas conversas e palavras de apoio.

Aos amigos e colegas do grupo de pesquisas pela colaboração e execução deste projeto, que muito me ajudaram: Ana Karla Bittencourt Mendes, Catiane Pompilio Brescansin, Liliane de Paula Silva, Luiza Gobor, Adriana Teleginski, Bruna Rodrigues Martins, Susan Webber, Yusra Al Lahham e Marciane Welter. Certamente todas vocês levam uma parcela desta vitória.

Aos amigos que a Universidade me apresentou, principalmente: Juliana Hernandes Girardi. Sua amizade para mim é muito preciosa! Agradeço por me ensinar a levar a vida mais leve e divertida.

À minha orientadora, professora Dra. Dayane Alberton, pela atenção, paciência e acreditar em mim para desenvolver este trabalho. Agradeço por sempre ser prestativa, me auxiliando para meu crescimento e amadurecimento. Você é uma profissional admirável, que me espelharei para o resto da minha vida.

Ao meu coorientador e coordenador do curso de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, professor Dr. Geraldo Picheth, que me guiou neste período e, também por todo conhecimento transmitido, principalmente nos esforços prestados nas análises estatísticas. Muito obrigado pela oportunidade dada a mim e por viabilizar a realização deste estudo para meu Mestrado.

A professora Dra. Fabiane Gomes de Moraes Rego, que sempre incentivou a todos a buscar a fundo os ensinamentos e, sendo de grande contribuição para esta pesquisa. Mesmo em sua atarefada rotina, sempre muito atenciosa e prestativa.

À Fundação Pró-Renal, por me apoiar e incentivar neste projeto e atender sempre as minhas solicitações e necessidades. Minha gratidão.

À minha coordenadora de trabalho e amiga, Ana Paula Piccoli, que mesmo com todos os seus deveres e responsabilidades, me ajudou e continua a me ajudar a cada dia a conquistar meus objetivos. Você sem dúvida merece toda minha gratidão.

A todos os professores e equipe deste curso de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, por sua excelência. Ministrando suas disciplinas no Mestrado contribuíram profundamente para meu crescimento acadêmico.

A todos os meus familiares, que nunca mediram esforços para me dar apoio e, que além de torcer, vibram a cada conquista alcançada por mim. Vocês merecem todo meu amor e são muito importantes na minha vida.

Ao meu namorado e amigo Fernando Henrique de Amorim Castoldi, sempre ao meu lado nos momentos mais difíceis desta caminhada. Obrigada por todo companheirismo, paciência e afeto.

Ao Dr. Daltro Zunino, pela partilha de conhecimento, pelos ensinamentos para a vida e por toda preocupação que tem comigo. Obrigada pela motivação e por me apadrinhar. Sou grata e honrada pela sua vida.

E a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho, o meu muito obrigada!

“Um passo a frente e você não está mais
no mesmo lugar.”

FRANCISCO DE ASSIS FRANÇA - Chico Science

RESUMO

Diabetes mellitus tipo 1 (DM1) é uma patologia caracterizada pela deficiência absoluta da insulina devido à destruição autoimune das células beta pancreáticas, tendo como consequência a hiperglicemia crônica. Além da resposta imunológica, os fatores genéticos e ambientais também estão envolvidos na fisiopatologia e complicações do DM1. Na presente pesquisa, o fator genético foi abordado através da análise de polimorfismos de único nucleotídeo (SNP) associados ao gene da frutossamina-3-quinase (*FN3K*) e da hexoquinase-1 (*HK1*) em um estudo caso-controle com pacientes DM1. A enzima frutossamina-3-quinase participa da reação de deglicação de frutossaminas e o polimorfismo rs1056534 (G>C), cujo alelo raro ou de menor frequência é o “C”, está associado com concentrações diminuídas de hemoglobina glicada (HbA1c). Já a enzima hexoquinase-1 catalisa a reação de fosforilação da glicose intracelular e o polimorfismo rs7072268 (C>T) possui o nucleotídeo “T” como alelo de menor frequência, o qual está associado com valores aumentados de HbA1c. O projeto teve a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da UFPR (CAAE: 24676613.6.0000.0102). Do total de 317 crianças e adolescentes com idade inferior a 14 anos, predominantemente euro-brasileiras, 149 eram portadores de DM1, enquanto 168 não tinham a patologia (grupo controle). As genotipagens dos polimorfismos nos genes *FN3K* (rs1056534) e *HK1*(rs7072268) foram realizadas com metodologia de sondas fluorescentes (Taqman®). Os polimorfismos encontraram-se no equilíbrio de Hardy-Weinberg. As frequências genotípicas e alélicas de ambos os polimorfismos não apresentaram associação estatisticamente significativa com o DM1 e as frequências para os alelos raros dos polimorfismos em estudo foram, em geral, similares aos descritos para populações europeias e caucasoides. Os valores de glicemia em jejum, HbA1c, 1,5-AG, ureia e creatinina foram significativamente maiores no grupo DM1 em relação ao controle. Na análise de associação desses parâmetros bioquímicos com os genótipos de ambos os grupos, somente os portadores do genótipo CC (menos frequente) do *FN3K* comparados àquele com genótipos GC, apresentaram uma redução estatística significativa na glicemia em cerca de 7% (86,7 mg/dL vs 93,3 mg/dL).

Palavras chave: *Diabetes mellitus* tipo 1; *FN3K*; *HK1*; Polimorfismo.

ABSTRACT

Type 1 Diabetes *mellitus* (T1DM) is a pathology characterized by absolute insulin deficiency due to autoimmune destruction of pancreatic beta cells, resulting in chronic hyperglycemia. In addition to the immune response, genetic and environmental factors are also involved in the pathophysiology and complications of DM1. In the present study, the genetic factor was approached through the analysis of single nucleotide polymorphisms (SNP) associated with fructosamine-3-kinase (*FN3K*) and hexokinase-1 (*HK1*) genes in a case control study with T1DM patients. The fructosamine-3-kinase enzyme participates in the fructosamine deglycation reaction and the rs1056534 (G>C) polymorphism, whose rare or minor frequency allele is the "C", is associated with decreased levels of glycosylated hemoglobin (HbA1c). The enzyme hexokinase-1 catalyzes the phosphorylation reaction of intracellular glucose and the polymorphism rs7072268 (C> T) has the nucleotide "T" as a minor frequency allele, which is associated with increased HbA1c values. The project was approved by the Research Ethics Committee of UFPR (CAAE: 24676613.6.0000.0102). Of the 317 children and adolescents less than 14 years of age, predominantly Euro-Brazilian, 149 had DM1, while 168 did not have the disease (control group). Genotyping of rs1056534 polymorphisms associated with the *FN3K* gene and rs7072268 associated with the *HK1* gene were performed using fluorescence probe methodology (Taqman®). Polymorphisms were found on the Hardy-Weinberg equilibrium. The genotypic and allelic frequencies of both polymorphisms did not present a statistically significant association with DM1 and the frequencies for the rare alleles of the polymorphisms under study were generally similar to those described for European and Caucasoid populations. The values of fasting glycemia, HbA1c, 1.5AG, urea and creatinine were significantly higher in the DM1 group than in the control group. In the analysis of the association of these biochemical parameters with the genotypes of both groups, only those with the CC (less frequent) genotype of *FN3K* compared to that with GC genotypes presented a statistically significant reduction in glycemia in about 7% (86.7 mg/dL vs. 93.3 mg/dL). The frequencies for the rare alleles of the polymorphisms under study were generally like those described for European and Caucasoid populations.

Key-words: Type 1 Diabetes; *FN3K*; *HK1*; Polymorphisms.

LISTA DE FIGURAS

| | | |
|------------|--|----|
| FIGURA 1- | DISTRIBUIÇÃO MUNDIAL DE ACORDO COM A FAIXA ETÁRIA E PROJEÇÃO DA EXPANSÃO DO DIABETES <i>MELLITUS</i> NO ANO DE 2017. | 21 |
| FIGURA 2- | CLASSIFICAÇÃO DOS DEZ PAÍSES COM MAIOR NÚMERO DE CRIANÇAS E ADOLESCENTES ATÉ 20 ANOS COM DM1 | 22 |
| FIGURA 3- | PRINCIPAIS EVENTOS IMUNOLÓGICOS NO DM1A. | 26 |
| FIGURA 4- | REABSORÇÃO TUBULAR DO 1,5-AG E GLICOSE EM CONDIÇÕES DE NORMO E HIPERGLICEMIA. | 31 |
| FIGURA 5- | REPRESENTAÇÃO FARMACOCINÉTICA DAS INSULINAS E SEUS ANÁLOGOS. | 34 |
| FIGURA 6- | LOCALIZAÇÃO DO GENE FN3K NO CROMOSSOMO 17 | 36 |
| FIGURA 7- | ESQUEMA DA VIA DE DEGLICAÇÃO INICIADA PELA FRUTOSAMINA-3-QUINASE. | 37 |
| FIGURA 8- | LOCALIZAÇÃO DO GENE HK1 NO CROMOSSOMO 10 | 39 |
| FIGURA 9- | ETAPA INICIAL DA CATÁLISE DA GLICOSE: FOSFORILAÇÃO E APRISIONAMENTO DA GLICOSE | 40 |
| FIGURA 10- | FLUXOGRAMA DE TRABALHO | 48 |
| FIGURA 11- | ASSOCIAÇÃO DOS GENÓTIPOS rs1056534 <i>FN3K</i> COM A GLICEMIA | 57 |

LISTA DE QUADROS

| | | |
|-----------|---|----|
| QUADRO 1- | CRITÉRIOS PARA O DIAGNÓSTICO DO DIABETES <i>MELLITUS</i> | 17 |
| QUADRO 2- | CLASSIFICAÇÃO DA CETOACIDOSE DIABÉTICA | 19 |
| QUADRO 3- | RECOMENDAÇÕES DE CONTROLE GLICÊMICO PARA ADULTOS, DE ACORDO COM AS DIVERSAS SOCIEDADES MÉDICAS. | 29 |
| QUADRO 4- | RECOMENDAÇÕES DA ISPAD E ADA PARA O CONTROLE GLICÊMICO DE CRIANÇAS E ADOLESCENTES. | 29 |
| QUADRO 5- | CARACTERIZAÇÃO DOS POLIMORFISMOS NO ESTUDO | 44 |
| QUADRO 6- | PROTOCOLO UTILIZADO NAS GENOTIPAGENS COM SONDAS FLUORESCENTES POR PCR EM TEMPO REAL | 45 |
| QUADRO 7- | PARÂMETROS BIOQUÍMICOS, METODOLOGIAS, E INTERVALO DE REFERÊNCIA AJUSTADO PARA CRIANÇAS E ADOLESCENTES | 46 |

LISTA DE TABELAS

| | | |
|-----------|--|----|
| TABELA 1- | CARACTERÍSTICAS ANTROPOMÉTRICAS DOS GRUPOS CONTROLE E DM1 | 49 |
| TABELA 2- | PARÂMETROS BIOQUÍMICOS DOS GRUPOS DM1 E CONTROLE | 52 |
| TABELA 3- | FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS DO POLIMORFISMO rs1056534 DO GENE FN3K NA AMOSTRA DO ESTUDO | 54 |
| TABELA 4- | FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS DO POLIMORFISMO rs1056534 DO GENE FN3K COM DADOS DA LITERATURA | 56 |
| TABELA 5- | FREQUÊNCIAS GENOTÍPICA E ALÉLICA DO POLIMORFISMO rs7072268 DO GENE <i>HK1</i> NA AMOSTRA DO ESTUDO | 58 |
| TABELA 6- | FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS DO POLIMORFISMO rs7072268 DO GENE HK1 COM DADOS DA LITERATURA | 59 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|------------------|--|
| 1,5 AG | - 1,5 anidroglucitol |
| AG | - Albumina glicada |
| A1c | - Fração A1c |
| AAEC | - Associação Americana de Endocrinologistas Clínicos |
| ADA | - <i>American Diabetes Association</i> |
| AFR | - África |
| AGEs | - <i>Advanced Glycation End Products</i> |
| AMGC | - Automonitoramento de glicemia capilar |
| Anti- ZnT | - Antitransportador de Zinco |
| APC | - Células apresentadoras de antígenos |
| ATP | - Trifosfato de adenosina |
| CAD | - Cetoacidose diabética |
| CAEE | - Certificado de apresentação para apreciação ética |
| CD4 ⁺ | - Linfócitos T auxiliares |
| CD8 ⁺ | - Linfócitos T citotóxicos |
| CGMS | - Sistema de monitoramento contínuo da glicose em líquido intersticial |
| CTRL | - Controle |
| CVa | - Coeficiente de variação analítico inter-ensaio |
| DCCT | - <i>Diabetes Control and Complications Trial</i> |
| DM | - <i>Diabetes mellitus</i> |
| DM1/T1D | - <i>Diabetes mellitus</i> tipo 1 |
| DM1A | - <i>Diabetes mellitus</i> tipo 1 autoimune |
| DM1B | - <i>Diabetes mellitus</i> tipo 1 idiopático |
| DM2 | - <i>Diabetes mellitus</i> tipo 2 |
| DMF | - 1-deoxi-1-morfolinofrutose |
| DMG | - <i>Diabetes mellitus</i> gestacional |
| DNA | - <i>Deoxyribonucleic acid</i> |
| DRC | - Doença renal crônica |
| EUR | - Europa |
| FL | - Frutoselina |
| FN3K | - Frutosamina-3-quinase |
| GAD 65 | - Anticorpo antidescarboxilase do ácido glutâmico |

| | |
|------------------|---|
| GLUT-4 | - Transportadores de glicose tipo 4 |
| GME | - Glicemia média estimada |
| HbA1c | - Hemoglobina glicada |
| HC-UFPR | - Laboratório do Hospital de Clínicas |
| HK1 | - Hexoquinase-1 |
| HIV | - Vírus da imunodeficiência humana |
| HLA | - Antígeno leucocitário Humano |
| HPLC | - <i>High performance liquid chromatography</i> |
| H-W | - Equilíbrio de Hardy-Weinberg |
| IA-2A | - Anticorpo antiproteína de membrana com homologia às tirosinofosfatases ou anti-antígeno 2 do insulinoma |
| IAA | - Anticorpo anti-insulina |
| IC | - Intervalo de confiança |
| ICA | - Anticorpo citoplasmático anti-ilhotas |
| IDF | - <i>International Diabetes Federation</i> |
| IFN- γ | - Interferon gama |
| IL-18 | Interleucina-18 (<i>IL-18</i>) |
| IL-1 β | - Interleucina-1 β |
| IMC | - Índice de massa corpórea |
| ISPAD | - Sociedade Internacional de Diabetes para pediatria e adolescência |
| MENA | - África do Leste e Norte |
| MHC | - Complexo principal de histocompatibilidade |
| MODY | - <i>Maturity onset Diabetes of the Young</i> |
| NAC | - América do Norte e Caribe |
| NADH | - Dinucleótido de nicotinamida e adenina reduzida |
| NGSP | - <i>National Glycohemoglobin Standardization Program</i> |
| NH ₂ | - Radical amino |
| OMIM | - <i>Online Mendelian Inheritance in Man</i> |
| PCR | - Reação em cadeia da polimerase |
| pH | - Potencial hidrogeniônico |
| RNA _m | - RNA mensageiro |
| rs | - <i>Reference Sequence</i> |
| SACA | - América do Sul |

| | |
|---------------|--|
| SBD | - Sociedade Brasileira de Diabetes |
| SEA | - Sudeste Asiático |
| SNP | - <i>Single Nucleotide Polymorphism</i> |
| TCLE | - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido |
| TNF- α | - Fator de necrose tumoral alfa |
| UFPR | - Universidade Federal do Paraná |
| UKPDS | - <i>United Kingdom Prospective Diabetes Study</i> |
| USA | - Estados Unidos da América |
| WHO | - <i>World Health Organization</i> |
| WP | - Pacífico ocidental |

LISTA DE SÍMBOLOS

α - Alfa

β - Beta

γ - Gama

β - Eszett

ε - Épsilon

@ - arroba

® - marca registrada

\geq - Maior ou igual

$>$ - Maior

\leq - Menor ou igual

$<$ - Menor

SUMÁRIO

| | | |
|----------|--|-----------|
| 1 | INTRODUÇÃO | 13 |
| 2 | OBJETIVOS | 15 |
| 2.1 | OBJETIVO GERAL..... | 15 |
| 2.2 | OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... | 15 |
| 3 | REVISÃO DE LITERATURA | 16 |
| 3.1 | DIABETES <i>MELLITUS</i> : ASPECTOS GERAIS, DIAGNÓSTICO E SINTOMAS..... | 16 |
| 3.2 | EPIDEMIOLOGIA DO DIABETES <i>MELLITUS</i> | 20 |
| 3.3 | DIABETES <i>MELLITUS</i> TIPO 1 IMUNOMEDIADO (DM1A) | 24 |
| 3.4 | BIOMARCADORES DO CONTROLE GLICÊMICO..... | 27 |
| 3.4.1 | Hemoglobina Glicada (HbA1c)..... | 30 |
| 3.4.2 | 1,5 Anidroglicitol (1,5-AG)..... | 31 |
| 3.4.3 | Frutosamina..... | 32 |
| 3.4.4 | Albumina glicada (AG) | 32 |
| 3.4.5 | Tratamento para o Diabetes <i>mellitus</i> tipo 1..... | 33 |
| 3.5 | ASPECTOS GENÉTICOS ASSOCIADOS AO DM1A..... | 35 |
| 3.5.1 | Gene da frutosamina-3-quinase (<i>FN3K</i>): controle de glicação não enzimática intracelular..... | 36 |
| 3.5.2 | Gene da hexoquinase-1 (<i>HK1</i>): fator limitante da glicólise..... | 39 |
| 4 | MATERIAL E MÉTODOS | 42 |
| 4.1 | AMOSTRAS..... | 42 |
| 4.2 | EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DO DNA GENÔMICO..... | 43 |
| 4.3 | GENOTIPAGEM DOS POLIMORFISMOS POR PCR EM TEMPO REAL..... | 43 |
| 4.4 | QUANTIFICAÇÃO DE PARÂMETROS BIOQUÍMICOS E DADOS ANTROPOMÉTRICOS..... | 45 |
| 4.5 | ANÁLISES ESTATÍSTICAS..... | 46 |
| 4.6 | FLUXOGRAMA DE TRABALHO..... | 47 |
| 5 | RESULTADOS E DISCUSSÃO | 49 |
| 5.1 | DADOS ANTROPOMÉTRICOS, CLÍNICOS E LABORATORIAIS DOS GRUPOS DM1 E CONTROLE..... | 49 |
| 5.1.1 | Idade e etnia..... | 49 |

| | | |
|----------|--|-----------|
| 5.1.2 | Peso, Altura, IMC e Z-score..... | 51 |
| 5.2 | PARÂMETROS BIOQUÍMICOS DOS GRUPOS EM ESTUDO..... | 51 |
| 5.2.1 | Marcadores para controle glicêmico..... | 52 |
| 5.2.2 | Albumina..... | 53 |
| 5.2.3 | Ureia, Creatinina e Microalbuminuria..... | 53 |
| 5.3 | GENOTIPAGEM DOS POLIMORFISMOS COM SONDAS FLUORESCENTES..... | 54 |
| 5.3.1 | Polimorfismo rs1056534 do gene <i>FN3K</i> | 54 |
| 5.3.2 | Polimorfismo rs7072268 do gene <i>HK1</i> | 58 |
| 6 | CONCLUSÕES..... | 61 |
| 7 | REFERÊNCIAS..... | 62 |
| 8 | ANEXOS..... | 72 |

1 INTRODUÇÃO

O Diabetes *mellitus* tipo 1 (DM1) é uma doença crônica autoimune, complexa e caracterizada pela deficiência absoluta de insulina após a destruição autoimune de células beta das ilhotas pancreáticas de Langerhans, tendo como consequência a hiperglicemia crônica (ADA, 2017; CRAIG, HATTERSELEY e DONAGHUE, 2009). Portanto, o paciente com DM1 requer terapia com insulina aliada ao controle e equilíbrio dietético ao longo de sua vida (ADA, 2017).

Apesar de ser frequentemente identificada na infância, com maior incidência entre o nascimento e o início da puberdade, cerca de um quarto dos casos de DM1 são diagnosticados na idade adulta (MAAHS et al., 2010). Além disso, a incidência do DM1 é estimada em torno 5 a 10% em relação a todos os casos de Diabetes *mellitus* (DM), mas cabe ressaltar que muitos diagnósticos são subnotificados, fragilizando os dados reais da população atingida (CRAIG, HATTERSLEY e DONAGHUE, 2009).

Frequentemente, a incidência do DM1 se associa com idade, gênero, histórico familiar, etnia, distribuição geográfica, obesidade e mudanças sazonais (MOLTCHANOVA et al., 2009; ATKINSON, 2014). Evidências confirmam que indivíduos com predisposição genética podem desencadear a autoimunidade sob influência de fatores ambientais e fisiológicos, tais como, exposição a químicos, deficiência de vitamina D, modificação da microbiota intestinal, aumento da idade maternal, entre outros (ILONEN et al., 2009; ROSE et al., 2013; GULDEN, WONG e WEN, 2015).

Neste sentido, marcadores moleculares do tipo “*Single Nucleotide Polymorphism*” (SNP) representam uma importante ferramenta prospectiva para o diagnóstico de doenças geneticamente complexas, como o DM. Seu estudo identifica alterações básicas e frequentes nas bases nitrogenadas da sequência do DNA do genoma humano e podem ser variáveis em determinadas populações (TAILON-MILLER, PIERNOT e KWOK, 1999).

Fatores como predisposição e variações genéticas podem contribuir para que se acelere o processo autoimune, característico desta patologia. Contudo, atualmente, muitos mecanismos e alterações metabólicas não estão totalmente esclarecidos. Diante disto, estudar os genes e as variabilidades genéticas nos

mesmos (polimorfismos) tem permitido encontrar associações significativas entre os polimorfismos e o DM (MOSCA et al., 2011).

No presente trabalho, as frequências dos polimorfismos de único nucleotídeo nos genes frutosamina-3-quinase (*FN3K*) e hexoquinase-1 (*HK1*) foram determinadas em um estudo tipo caso-controle. A frutosamina-3-quinase (*FN3K*) catalisa a reação de fosforilação de frutosaminas promovendo a deglicação de proteínas, ou seja, essa enzima reverte o processo que leva a formação de produtos de glicação avançada, conhecidos como AGES, os quais participam na patogênese das complicações diabéticas de longo prazo (SZWERGOLD, HOWELL e BEISSWENGER, 2001).

Já o gene *HK1* codifica a enzima hexoquinase-1, a qual é responsável pelo primeiro passo na utilização da glicose na via glicolítica. Estudos de variações genéticas do gene da hexoquinase-1 (*HK1*) demonstraram associação do polimorfismo com maiores concentrações de HbA1c em paciente não diabéticos e, conseqüentemente, aumento no risco de desenvolver DM (PARE et al., 2008; BONNEFOND et al., 2009). Diante disto, o presente trabalho buscou avaliar a variabilidade dos genes *HK1* e *FN3K*, bem como sua relação com outros biomarcadores, com intuito de ampliar a compreensão dos processos fisiopatológicos associados ao DM1.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Estudar variações genéticas nos genes da frutossamina-3-quinase (*FN3K*) e hexoquinase-1 (*HK1*) em pacientes portadores do Diabetes *mellitus* tipo 1.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar a triagem de indivíduos com DM1 e saudáveis (grupo controle);
- Determinar as frequências genotípicas e alélicas de polimorfismos nos genes *FN3K* (rs1056534) e *HK1* (rs7072268) na busca de associação com o DM1;
- Identificar as frequências genotípicas e alélicas das variações genéticas associadas ao DM1 em uma amostra da população brasileira e comparar com outras populações;
- Correlacionar as variações genéticas identificadas nos grupos estudados com biomarcadores séricos de controle glicêmico e função renal.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 DIABETES *MELLITUS*: ASPECTOS GERAIS, DIAGNÓSTICO E SINTOMAS

O DM tem sido descrito como uma patologia de caráter metabólico crônico, complexa e progressiva, resultante da ineficiência na ação e da secreção de insulina, ou ambas (ADA, 2017). O termo DM compreende um grupo heterogêneo de distúrbios, que apresentam como característica principal a hiperglicemia, que determina o aumento do risco de lesões irreversíveis, principalmente nos rins, coração, olhos, vasos sanguíneos e nervos (SBD, 2016).

Em função do seu efeito pronunciado sobre a ação e/ou secreção de insulina, a Associação Americana de Diabetes (2017) classifica o DM em quatro grandes categorias, de acordo com a etiologia:

- Diabetes *mellitus* tipo 1 (DM1): geralmente caracterizada pela deficiência completa de insulina que decorre da destruição das células beta pancreáticas. A destruição dessas células pode ocorrer sob duas formas, 1A e 1B. A principal forma, tipo 1A, resulta de um processo autoimune, enquanto o tipo 1B é conhecida como idiopático, pois a causa da destruição das células beta é desconhecida (SBD, 2016). Porém, mesmo sem causa determinada e com um menor número de casos, sabe-se que o tipo DM1B é prevalente em indivíduos com descendência africana e asiática e é identificado através de insulinopenia permanente associada à cetoacidose episódica (ADA, 2017);
- Diabetes *mellitus* tipo 2 (DM2): é a forma mais comum da doença, resultante da perda progressiva da secreção de insulina e, invariavelmente está associada a resistência periférica a este hormônio;
- Diabetes *mellitus* gestacional (DMG): diagnosticado entre o segundo ou terceiro trimestre de gestação e caracterizada como Diabetes não evidente antes do período gestacional;
- Outros tipos específicos de Diabetes *mellitus* devido a outras causas, as quais envolvem a síndrome do Diabetes monogênico (Diabetes neonatal e o Diabetes da maturidade com início precoce – MODY – *Maturity-onset Diabetes of the Young*), doenças do pâncreas exócrino (como a fibrose

cística) e aquelas que são induzidas por substâncias químicas ou drogas (WHO, 2016).

Apesar da vasta investigação dos mecanismos envolvidos nesta patologia, a condição subclínica caracterizada pela progressão lenta do DM ainda é um desafio para o diagnóstico precoce da doença. Atualmente, o diagnóstico é baseado na concentração plasmática de glicose e de HbA1c (QUADRO 1).

QUADRO 1 – CRITÉRIOS PARA DIAGNÓSTICO DO DIABETES MELLITUS

| |
|---|
| Glicemia ao acaso ≥ 200 mg/dL (11,1 mmol/L). Em pacientes com sintomas clássicos de hiperglicemia ou crise hiperglicêmica; |
| Ou |
| Glicemia em jejum ≥ 126 mg/dL (7,0 mmol/L). O jejum é definido como a não ingestão calórica por pelo menos 8 horas;* |
| Ou |
| Glicemia 2h após 75 g de glicose oral ≥ 200 mg/dL (11,1 mmol/L). O exame deve ser realizado como descrito pela OMS utilizando dose oral de glicose contendo o equivalente a 75 g de glicose dissolvida em água;* |
| Ou |
| HbA1c $\geq 6,5\%$ (48 mmol/mol). O teste deve ser realizado usando o método certificado pelo <i>National Glycohemoglobin Standardization Program</i> (NGSP) e nos padrões da <i>Diabetes Control and Complications Trial (DCCT)</i> .* |

* Na ausência de glicemia inequívoca, os resultados devem ser confirmados com a repetição dos testes.

FONTE: ADA, 2017.

Para diagnosticar o início agudo do DM1, recomenda-se analisar a concentração glicêmica ao invés da HbA1c em indivíduos com os sintomas da hiperglicemia (polidipsia, xerostomia, poliúria, polifagia, perda abrupta do peso e visão turva). Em crianças e adolescentes, a primeira manifestação do DM1 é a cetoacidose diabética (CAD), a qual é decorrente da rápida perda de células beta funcionais e, conseqüentemente, colabora diretamente para a expressiva taxa de morbimortalidade (WEINSTOCK et al., 2013; KLAFKE et al., 2014; NYENW e KITABCHI, 2016). Por outro lado, indivíduos adultos podem reter células beta funcionais, evitando a manifestação da CAD por anos. No entanto, quando esses indivíduos se tornam dependentes de insulina, também agregam ao grupo de risco para CAD (ADA, 2017).

Os sinais da CAD coexistem com alterações metabólicas provocadas pela hiperglicemia devido à falta de insulina circulante. Em pacientes diabéticos não tratados, a hiperglicemia promove a superprodução de corpos cetônicos

(acetoacetato e beta-hidroxibutirato), que devido as suas propriedades ácidas, reduzem o pH sanguíneo, acarretando a CAD (NELSON e COX, 2014). Os corpos cetônicos são formados a partir da conversão de Acetil-CoA, derivada da degradação de ácidos graxos no fígado, e são especialmente críticos para o cérebro, pois estes compostos não são capazes de atravessar a barreira hematoencefálica e, assim, não podem ser utilizados como combustível para os neurônios do cérebro.

A administração de insulina em pacientes com CAD permite a diminuição da concentração dos corpos cetônicos. A insulina interage com seu respectivo receptor presente na superfície de hepatócitos e adipócitos e sinaliza o deslocamento dos transportadores GLUT4 do espaço intracelular para a superfície da membrana plasmática dessas células. Os transportadores GLUT4 transportam a glicose para o espaço intracelular onde a molécula será fosforilada e, conseqüentemente, a concentração plasmática de glicose sanguínea diminui, impactando na redução de produção dos corpos cetônicos (NELSON e COX, 2014).

Clinicamente, quadros de CAD representam uma das principais complicações agudas nos pacientes portadores de DM1 e tem sido associados com a presença de infecção e estresse (WEINSTOCK et al., 2013; NYENW e KITABCHI, 2016; ADA, 2017). Recentemente foi demonstrado que a correlação estreitamente direta entre a CAD e o mau controle glicêmico aumentam o risco para o desenvolvimento de sintomas clássicos do DM1, que evoluem para quadros mais severos, tais como, alterações neurológicas irreversíveis, perda de consciência (coma) e choque (NYENW e KITABCHI, 2016).

Infelizmente, episódios recorrentes de CAD podem levar à disfunção e até à falência de vários órgãos e, apenas poucas ações, porém importantes, devem ser realizadas para reduzir as morbidades associadas, como, o monitoramento frequente do estado hemodinâmico do indivíduo, controle da terapia insulínica e controle dietético (KITABCHI et al., 2004; SBD, 2016). A CAD é um desafio para o serviço de atendimento de emergência de hospitais em todo o mundo, principalmente naqueles locais onde a ocorrência é menos frequente, fazendo-se necessário a dosagem de glicose quando presente um ou mais sintomas para excluir outras doenças (ADA, 2017). Os parâmetros determinados para a o diagnóstico de CAD (QUADRO 2) são a hiperglicemia (>250 mg/dL), acidose

(bicarbonato sérico <18 mmol/L e/ou pH <7,30) e, aumento na concentração de corpos cetônicos na urina ou no sangue.

QUADRO 2 – CLASSIFICAÇÃO DA CETOACIDOSE DIABÉTICA.

| Componentes | Leve | Moderado | Severo |
|----------------------------|-----------|------------------|--------------|
| Bicarbonato sérico (mEq/L) | 15-18 | 10-15 | <15 |
| pH arterial | 7,25-7,30 | 7,0-7,24 | <7,0 |
| Ânion gap* | >10 | >12 | >12 |
| Estado mental | Alerta | Alerta/sonolento | Estupor/coma |

*Ânion gap, calculado como [sódio – (cloreto – bicarbonato)]

FONTE: Adaptado de ELEDRISI et al., 2006.

Outro parâmetro que pode confirmar o diagnóstico para DM1, bem como, servir de marcador de risco para o DM1A, é a detecção de autoanticorpos associados à destruição das células beta pancreáticas. Dentre esses autoanticorpos detectáveis, destacam-se os autoanticorpos citoplasmáticos anti-ilhotas (*islet cell autoantibodies* – ICA), autoanticorpo antidescarboxilase do ácido glutâmico (*glutamic acid decarboxylase autoantibodies* - GADA), autoanticorpos antiproteína de membrana com homologia às tirosinofosfatases ou anti-antígeno 2 do insulinoma (*insulinoma associated 2 autoantibodies* - IA-2A), autoanticorpos anti-insulina (*insulin autoantibodies* - IAA), e autoanticorpos antitransportador de zinco 8 (*zinc transporter autoantibodies* - ZnT8). Aproximadamente 90% dos pacientes DM1 apresentam um ou mais destes anticorpos (ATKINSON, EISENBARTH e MICHELS, 2014). Já, em crianças que apresentam risco para DM1, a detecção de dois anticorpos aumenta em 70% o risco de desenvolver a doença até os 10 anos e, 84%, dentro de 15 anos (ZIEGLER et al., 2013).

Diretrizes internacionais recomendam que a pesquisa de anticorpos seja indicada nos casos de estudos em pacientes e/ou em familiares com parentesco de primeiro grau (ADA, 2017). Estudos mostram uma forte predileção genética, de tal maneira que se um parente de primeiro grau for portador do DM1, o indivíduo possui um risco de 5% em desenvolver a doença ou 15 vezes mais chance em relação aos demais membros da família (BONIFACIO e ZIEGLER, 2010; TUOMILEHTO, 2013).

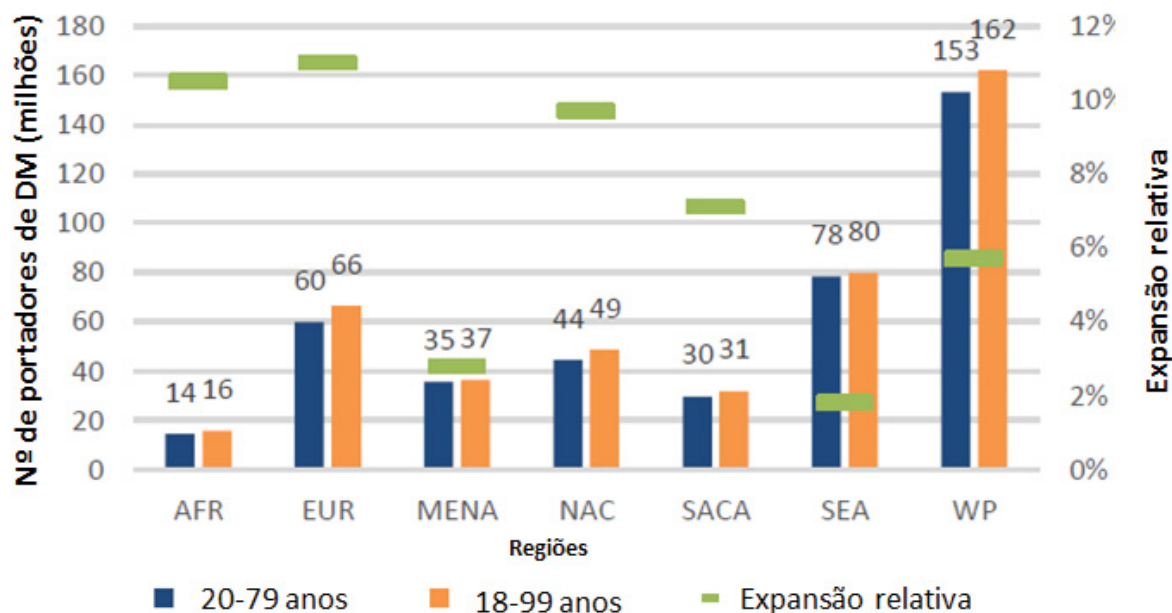
3.2 EPIDEMIOLOGIA DO DIABETES *MELLITUS*

A prevalência de casos de DM1 e DM2 na população mundial é extremamente significativa. O DM1 representa 5 a 10% dos casos, tendo atingido até no ano de 2015, mais de meio milhão de crianças com até 14 anos (IDF, 2015). Já as taxas de prevalência e incidência para os casos de DM2 são estimadas em 90-95% (IDF, 2015; ADA, 2017). O número de casos de DM está proporcionalmente relacionado ao aumento de hospitalizações devido às complicações cardiovasculares e renais e risco de infecções com mortalidade significativamente alta (ADAIR e RAO, 2010; KLAFKE et al., 2014).

Atualmente, aproximadamente 382 milhões de adultos são portadores de DM e, o número de novos casos é crescente em todo mundo, configurando um panorama de epidemia do século (KHAROUBI e DARWISH, 2015; SBD, 2016). A Federação Internacional de Diabetes publicou um prognóstico alarmante para 2040, cuja projeção ultrapassa 600 milhões de casos (IDF, 2015).

A prevalência da doença atinge todos os continentes do globo, alcançando as seguintes proporções: 162 milhões no Pacífico Ocidental; 80 milhões no Sudeste Asiático; 66 milhões na Europa; 49 milhões na América do Norte e Caribe; 36 milhões no Oriente Médio e Norte da África; 32 milhões na América do Sul e Central; e 16 milhões em África (FIGURA 1). O número de pessoas que vivem com Diabetes foi 11% maior quando a faixa etária foi ampliada de 20 a 79 para 18 a 99 anos. Na Europa, houve o maior aumento percentual, de acordo com a IDF (2017). O Sudeste Asiático teve o menor percentual de aumento (3%).

FIGURA 1 – DISTRIBUIÇÃO MUNDIAL DE ACORDO COM A FAIXA ETÁRIA E PROJEÇÃO DA EXPANSÃO DO DIABETES MELLITUS NO ANO DE 2017.



AFR: África; EUR: Europa; MENA: África do Leste e Norte; NAC: América do Norte e Caribe; SACA: América do Sul e Central; SEA: Sudeste Asiático; WP: Pacífico ocidental. Estimativa do número de pessoas afetadas pelo Diabetes em todo o mundo, subdividido por região e faixa etária entre 20-79 e 18-99 anos.

FONTE: Adaptado de HUANG et al, 2017.

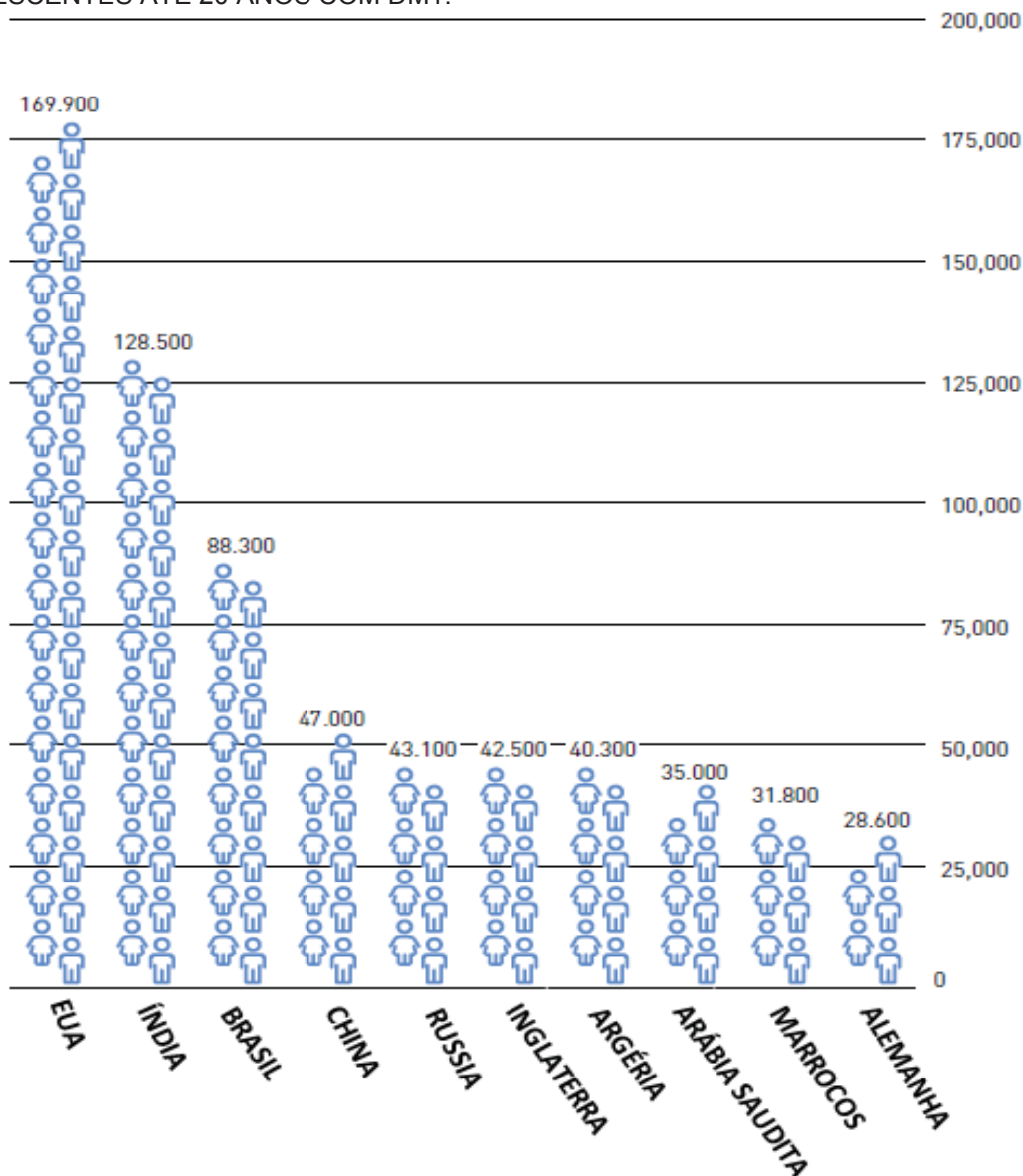
Uma análise publicada pela Federação Internacional de Diabetes revelou que 8,51% da população do mundo com idade entre 20 a 79 anos é diabética (IDF, 2015). No Brasil, esta média está próxima da média mundial, com prevalência de 8,1% (HUANG et al., 2017). Através de estudos multicêntricos, confirma-se que a prevalência do DM na população brasileira apresenta correlação proporcional entre a maior sobrevivência dos pacientes e a presença de obesidade (FERREIRA e PITITTO, 2016).

Embora o DM não apresente correlação com o gênero do indivíduo, no Brasil, de acordo com o relatório da Organização Mundial da Saúde (2016), há maior incidência entre mulheres (8,8%) comparada aos homens (7,4%) e a justificativa é devido à maior busca por cuidados médicos e, conseqüentemente, o diagnóstico mais precoce da doença na população feminina.

Em relação ao número de casos de DM1, o Brasil se mantém entre os primeiros no *ranking* dos países com maior número de novos casos de DM1 entre crianças e adolescentes. Em 2017, a IDF apontou o Brasil como sendo o terceiro colocado entre os 10 países com maior número de crianças e adolescentes com menos de 20 anos com DM1 (88.300 casos), atrás dos Estados Unidos e Índia, com

169.900 e 128.500 casos, respectivamente (FIGURA 2). Além disso, a cada ano, 7.600 crianças e adolescentes abaixo de 15 anos e 9.600 adolescentes abaixo de 20 anos são diagnosticados com DM1 no Brasil (IDF, 2017).

FIGURA 2 – CLASSIFICAÇÃO DOS DEZ PAÍSES COM MAIOR NÚMERO DE CRIANÇAS E ADOLESCENTES ATÉ 20 ANOS COM DM1.



A faixa etária dos participantes da pesquisa foi inferior a 20 anos de idade.
 FONTE: Adaptado de IDF, 2017.

Uma pesquisa, realizada por meio de estudos multicêntricos no Brasil, revelou que aproximadamente metade dos indivíduos diagnosticados desconhece sua condição de saúde (FERREIRA E PITITTO, 2016). No final da década de 80, a prevalência de DM na população de 9 capitais brasileiras, com faixa etária entre 30 e 69 anos, foi em torno de 7,6%. Quase 15 anos depois da realização do Censo

Nacional de Diabetes de 1988, um estudo realizado na região de Ribeirão Preto, mostrou que a prevalência, para a mesma faixa etária, praticamente duplicou (12,1%) (TORQUATO, *et al.*, 2003).

Os estudos de levantamento da incidência de casos de DM1 são um desafio antigo. Sabe-se que a ocorrência do DM1A é mais frequente entre o nascimento até os 14 anos de idade e é considerada a segunda doença crônica mais prevalente nesta população, depois da asma (SPERLING, 1997; RENNERT e FRANCIS, 1999; FOROUHI e WAREHAM, 2014).

A incidência e as taxas de prevalência de DM1 em jovens parecem aumentar lentamente na maioria dos países do mundo, sendo os aumentos mais acentuados nos países com crescimento econômico rápido. No entanto, grande parte dos dados para países de baixa e média renda estão ausentes, incompletos, ou não são representativos. São necessários dados epidemiológicos mais padronizados para permitir um planejamento de saúde direcionado para esses pacientes diabéticos (PATTERSON *et al.*, 2014).

Em 2015, estimou-se gastos entre US\$ 673 a US\$1.197 bilhões no tratamento de pacientes com DM, sendo que na grande maioria dos países, 5 a 20% dos recursos financeiros foram destinados ao tratamento (IDF, 2015). A falta de conhecimento dos impactos reais das complicações crônicas do DM e a má aceitação do paciente em relação à doença, suas complicações e tratamento, impacta negativamente nos gastos públicos. Por isso, projeções do DM são muito importantes para o planejamento de recursos destinados ao setor de saúde. Certamente, o DM de maneira geral é um problema global causando morbidade e mortalidade, reduzindo a expectativa de vida em até 13 anos e aumento significativo dos gastos públicos (MAAHS *et al.*, 2010; LIVINGSTONE *et al.*, 2015).

3.3 DIABETES MELLITUS TIPO 1 IMUNOMEDIADO (DM1A)

O DM1A, até pouco tempo denominado Diabetes-insulino-dependente ou Diabetes juvenil, é uma patologia multifatorial caracterizada pela destruição autoimune parcial ou total das células beta presentes das ilhotas de Langerhans, cujas manifestações cursam com a deficiência de insulina e consequente hiperglicemia sintomática (SBD, 2016).

Alguns estudos buscaram elucidar a origem da desregulação imunológica habitualmente vista no DM1A, permanecendo em grande parte sem uma adequada explicação. Entretanto, mostraram que outras doenças de origem autoimune cursam com o DM1A, incluindo hipertireoidismo e hipotireoidismo, insuficiência adrenal primária, gastrite autoimune, doenças intestinais, doença celíaca, doenças de pele, entre outras (TRIOLO et al., 2011; HUGHES et al., 2016).

A fisiopatologia do DM1A está invariavelmente associada aos fatores ambientais (idade, gênero, histórico familiar, etnia, distribuição geográfica, obesidade, mudanças sazonais, entre outros), e a predisposição genética (MOLTCHANOVA et al., 2009; ATKINSON, 2014). Quando em conjunto, estes fatores ativam as células do sistema imune através de um complexo mecanismo, iniciando a destruição das células beta pancreáticas, responsáveis pela produção de insulina. Uma das hipóteses principais para o desencadeamento deste processo é a resposta inflamatória mediada por células T ($CD4^+$ e $CD8^+$) (DEVENDRA, LIU e EISENBARTH, 2004). O primeiro evento autoimune do DM1 é a apresentação do autoantígeno, expresso nas células beta, através dos macrófagos e/ou células dendríticas para a célula T $CD4^+$ (FERNANDES et al., 2005) (FIGURA 3).

A destruição das células beta pancreáticas pode ser identificada em análises histopatológicas do pâncreas, onde é detectada a infiltração nas ilhotas de Langerhans, especificamente nas células beta, por linfócitos T, células B, macrófagos e células dendríticas, configurando um processo inflamatório conhecido por insulite (KAPUSTIN, 2008; THROWER e BINGLEY, 2014).

O infiltrado linfomonuclear secreta citocinas pró-inflamatórias, dentre as quais, interleucina- 1β (IL- 1β), interferon gama (IFN- γ) e o fator de necrose tumoral- α (TNF- α) (FERNANDES et al., 2005; STANKOV, BENC e DRASKOVIC, 2013). Essas citocinas pró-inflamatórias promovem à destruição das células beta por apoptose ou

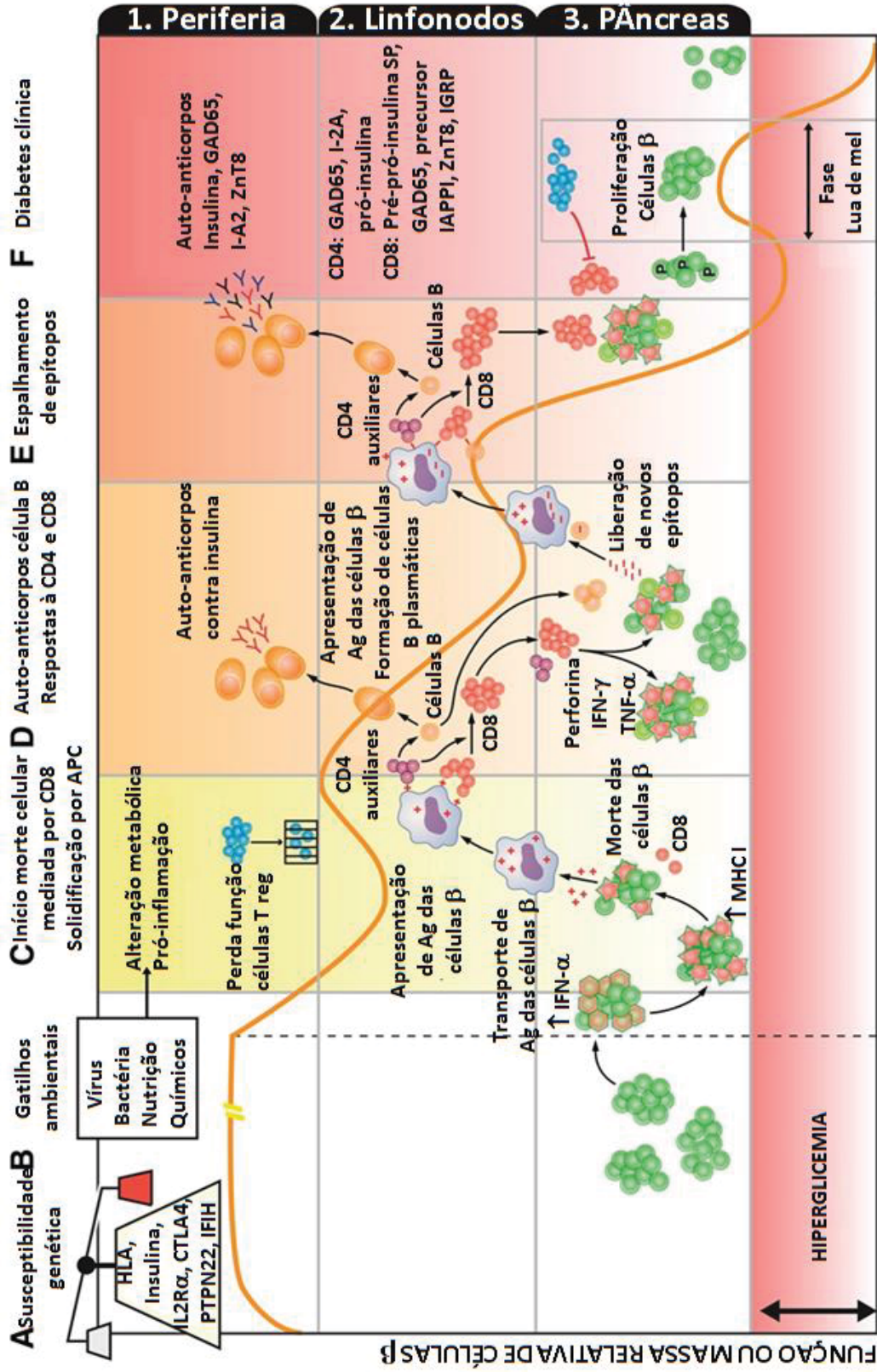
necrose com conseqüente diminuição na síntese e secreção de insulina (STANKOV, BENC e DRASKOVIC, 2013) (FIGURA 3).

Neste processo autoimune, entre os processos, está a apresentação do autoantígeno, expressos nas células beta, através dos macrófagos e/ou células dendríticas para a célula T CD4⁺. As células T CD4 ativadas (CD4⁺) ativam o linfócito T CD8, responsável por reconhecer o autoantígeno, ligado a molécula HLA classe I (antígeno leucocitário humano) que por citólise mediada pela liberação de perforina e granzima, induz o reconhecimento e a destruição das células beta pancreáticas. As células T CD4⁺ também desempenham papel auxiliar na ativação de células B, produtoras de autoanticorpos (ZHOU e TEDDER, 1995; FERNANDES et al., 2005) (FIGURA 3).

Os autoanticorpos, quando detectados, permitem que o atendimento clínico e o manejo destes pacientes sejam realizados adequadamente. Além disso, fornecem informações sobre a patogênese desta doença complexa (TRIOLO et al., 2011). Estes marcadores estão presentes em 85 a 90% dos casos, quando a hiperglicemia é confirmada (CRAIG, HATTERSLEY e DONAGHUE, 2009).

O processo autoimune sinérgico, envolvendo os linfócitos, leva a hiperglicemia crônica devido à incapacidade do pâncreas, especificamente das células beta, em produzir quantidade suficiente de insulina para que a glicose possa ser captada e fosforilada pela hexoquinase (ZHOU e TEDDER, 1995; FERNANDES et al., 2005; STANKOV, BENC e DRASKOVIC, 2013; NELSON e COX, 2014).

FIGURA 3 – PRINCIPAIS EVENTOS IMUNOLÓGICOS NO DM1A



Esta figura representa a massa ou função da célula beta (linha laranja), bem como as diferentes fases imunológicas (colunas) que ocorrem nos locais anatômicos relevantes (abas numéricas à direita). Uma vez que a linha laranja da função das células beta cai na zona vermelha, o indivíduo é clinicamente diagnosticado com DM1. Uma série complicada de eventos precede esse momento e permanece em grande parte despercebida. Inicialmente, a susceptibilidade genética (A1) e um gatilho ambiental (B1) estabelecem a predisposição de um indivíduo para desenvolver Diabetes através de dois eventos: ativação do interferon alfa (IFN- α) pelas células pancreáticas (B3) e posteriormente do Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC) classe I (C3). Esse processo expõe as células beta a serem atacadas por células T CD8 autorreativas e específicas para antígenos do pâncreas (C3). Consequentemente, os antígenos de células beta liberados são capturados por células apresentadoras de antígenos (APC) (C3) e transportados para os linfonodos pancreáticos (LN) (c2). Enquanto isso, no sistema periférico (C1), o gatilho ambiental promove um ambiente proinflamatório que favorece as respostas inibitórias das células T efetoras sobre a função das células T reguladoras (Treg). Neste contexto proinflamatório, os antígenos de células beta e as células T CD4 (C2) iniciam a conversão de células B em células plasmáticas (D2) com consequente produção de autoanticorpos de insulina (D1). Além disso, as células T CD8 autorreativas são estimuladas a proliferar (D2) e migram para o pâncreas (D3). O estresse induzido por esta segunda onda de morte de células beta (D3), que envolve perforina, IFN- α e TNF- α , provoca a interrupção da produção de insulina e causa a liberação de novos antígenos das células beta que são captados pelas APCs e transportados para os linfonodos pancreáticos em conjunto com células B (D3-D2). Como resultado, novas especialidades de células T (E2) e B (E1) são liberadas. Consequentemente, a destruição de uma nova parcela de células beta é iniciada e, portanto, de forma mais grave, resultando geralmente em depleção severa da massa e função de células beta (E3). A inflamação autoimune pode estimular alguma proliferação de células beta e produção de insulina (F3) e Tregs podem se sobrepor e atenuar a resposta imune efetora (F3). Esta pausa no processo inflamatório, conhecida por "Lua de mel" é temporária e, sua velocidade é variável entre os indivíduos. Eventualmente, a resposta autoimune se sobrepõe a essa fase e o DM1 é diagnosticado quando restam apenas 10-30% das células beta funcionais.

FONTE: Adaptado de VAN-BELLE, COPPIETERS e VON HERRATH, 2011.

3.4 BIOMARCADORES DO CONTROLE GLICÊMICO

A manutenção da concentração plasmática de glicose é fundamental para as atividades do corpo humano. Em condições normais, o organismo é capaz de manter a concentração estável de insulina, a qual suprime a produção hepática de glicose e lipólise, estimulando a exposição dos transportadores de glicose nas células dos músculos (esquelético e cardíaco) e tecido adiposo (GLUT4 – transportador de glicose) (JAMES e PIPER, 1994). A insulina permite a utilização da glicose pelas células, estimula a produção de proteínas, glicogênio e ácidos graxos, sendo essencial no processo de conversão de glicose em outras formas de armazenamento de energia, como os triglicerídeos e glicogênio. Portanto, a insulina contribui para a manutenção homeostática da concentração glicêmica no organismo (RAMESAN e SHARMA, 2009).

Em um paciente com diagnóstico de DM, o monitoramento glicêmico é muito importante, pois é o principal meio para o controle do tratamento e prevenção das complicações inerentes à doença. Em um indivíduo saudável, a glicemia se mantém estável entre as concentrações 70 a 110 mg/dL, raramente ultrapassando 140 mg/dL

(BITTAR et al., 2003). Já em pacientes diabéticos as concentrações plasmáticas chegam a atingir concentrações superiores a 180 mg/dL.

Após a década de 70, surgiram novos avanços tecnológicos e científicos que permitiram o rastreamento da glicemia, como a dosagem de HbA1c, o automonitoramento da glicemia capilar (AMGC) e o sistema de monitoramento contínuo da glicose em líquido intersticial (CGMS) (ADA, 2015). A partir de 2008, outros métodos foram sugeridos para verificação do estado glicêmico do paciente, como a glicemia média estimada (GME) e a variabilidade glicêmica (SBD, 2016)

Atualmente, os portadores de DM dispõem de aparelhos de aferição de glicemia capilar que possibilitam o automonitoramento em domicílio. As instruções para o automonitoramento podem variar de indivíduo para indivíduo, sendo recomendada a aferição antes e/ou após as refeições e, 2 horas após as principais refeições. Em função do uso da insulina, de acordo com a recomendação médica, ainda é possível que seja necessário à aferição da glicemia capilar em jejum, logo nas primeiras horas do dia, para que seja evitada uma hipoglicemia ou mesmo, para que o indivíduo saiba se deve ou não administrar a dose recomendada de insulina exógena (BRASIL, 2007).

A Portaria nº 2583 de 10 de outubro de 2007, define os medicamentos e insumos disponibilizados pelo SUS, nos termos da Lei n. 11347/2006, como tiras e reagentes para medida da glicemia capilar em domicílio (BRASIL, 2007). Este tipo de controle requer um treinamento para o usuário, o que pode ser uma grande limitação para pacientes idosos, principalmente àqueles com acuidade visual reduzida. Nesta lógica de acompanhamento e controle do DM, criou-se o que foi denominado de “Metas do controle glicêmico”, estabelecido de acordo com consensos internacionais, incluindo controles realizados em jejum, pós-prandiais e de HbA1c (ADA, 2017; SBD, 2016). O QUADRO 3, sintetiza as recomendações mais importantes de diferentes sociedades médicas:

QUADRO 3 - RECOMENDAÇÕES DE CONTROLE GLICÊMICO PARA ADULTOS, DE ACORDO COM AS DIVERSAS SOCIEDADES MÉDICAS.

| Instituições | Glicemia pré-prandial (mg/dL) | Glicemia pós-prandial (mg/dL) | HbA1c (%) |
|--------------|-------------------------------|-------------------------------|-----------|
| ADA | 80 a 130 | < 180 | < 7 |
| IDF | < 115 | < 160 | < 7 |
| AACE | < 110 | < 140 | < 7 |
| SBD | < 100 | < 160 | < 7 |

ADA, Associação Americana de Diabetes; IDF, Federação Internacional de Diabetes; AACE, Associação Americana de Endocrinologistas Clínicos; SBD, Sociedade Brasileira de Diabetes.

FONTE: Adaptado de SBD, 2016.

Nos últimos anos, achados importantes relacionados às consequências da hiperglicemia no DM1 tem direcionado a comunidade de endocrinologistas a rever seu posicionamento frente ao controle glicêmico e postular recomendações para o manejo do tratamento de crianças e adolescentes e assim, minimizar as complicações tão importantes nesta patologia. O QUADRO 4 lista as recomendações para as metas de controle glicêmico de acordo consenso da Sociedade Internacional de Diabetes para Pediatria e Adolescência (ISPAD) (2014) e ADA (2017).

QUADRO 4 - RECOMENDAÇÕES DA ISPAD E ADA PARA O CONTROLE GLICÊMICO DE CRIANÇAS E ADOLESCENTES.

| Instituição | Jejum ou Pré-prandial (mg/dL) | Pós-prandial (mg/dL) | Ao dormir (mg/dL) | HbA1c (%) |
|---------------|-------------------------------|----------------------|-------------------|-----------|
| Ideal (ISPAD) | 65 a 100 | 80 a 126 | 80 a 100 | < 6,5 |
| Ótimo (ISPAD) | 90 a 145 | 90 a 180 | 120 a 80 | < 7,5 |
| ADA | 80 a 130* | < 180 | - | < 7,0 |

*Os objetivos glicêmicos devem ser flexibilizados com base na duração do Diabetes, idade, expectativa de vida e condições concomitantes, complicações vasculares avançadas, desconhecimento de hipoglicemia, ou seja, deve ser individualizada. As medições de glicose pós-prandial devem ser realizadas 1-2 após a refeição; ADA, Associação Americana de Diabetes; ISPAD, Sociedade Internacional de Diabetes para Pediatria e Adolescência.

FONTE: Adaptado de ISPAD, 2014; ADA, 2017.

3.4.1 Hemoglobina Glicada (HbA1c)

A hemoglobina glicada (HbA1c) é considerada “padrão ouro” para controle glicêmico do Diabetes, pois permite que seja avaliada sua concentração circulante referente a um período de dois a três meses anteriores a coleta, que se refere ao tempo de meia vida do eritrócito (cerca de 120 dias) (NELSON e COX, 2014).

Sabe-se que a hemoglobina glicada é formada pela reação não enzimática entre a glicose e o grupo amino primário do resíduo de aminoácido valina da porção N-terminal e com o grupo amino da cadeia lateral da lisina. Cabe ressaltar que outros resíduos de aminoácidos também podem ser glicosados, mas a glicação no grupo α -NH₂ da valina N-terminal conduz a uma alteração de carga elétrica na hemoglobina (BUNN, 1981; NELSON e COX, 2014).

De acordo com a Sociedade Brasileira de Diabetes, *United Kingdom Prospective Diabetes Study* (UKPDS) e o DCCT, a concentração de HbA1c representa correlação positiva com as concentrações de glicose e, portanto, é considerada um bom marcador para avaliar o controle glicêmico e monitorar indiretamente as complicações inerentes do DM (FRAYLING, COLHOUN e FLOREZ, 2008; SBD, 2016).

No entanto, a acurácia das dosagens de HbA1c pode ser influenciada em determinadas condições clínicas, como hemorragia e transfusões; anemia hemolítica, ferropriva e hemoglobinopatias; medicamentos utilizados por pacientes HIV positivos; uremia; hipertrigliceridemia; hiperbilirrubinemia; altas dosagens de ácido acetilsalicílico, vitaminas C e E, além de opiáceos e etilismo (GOLDSTEIN et al., 2004; RENARD, 2005; SBD, 2016).

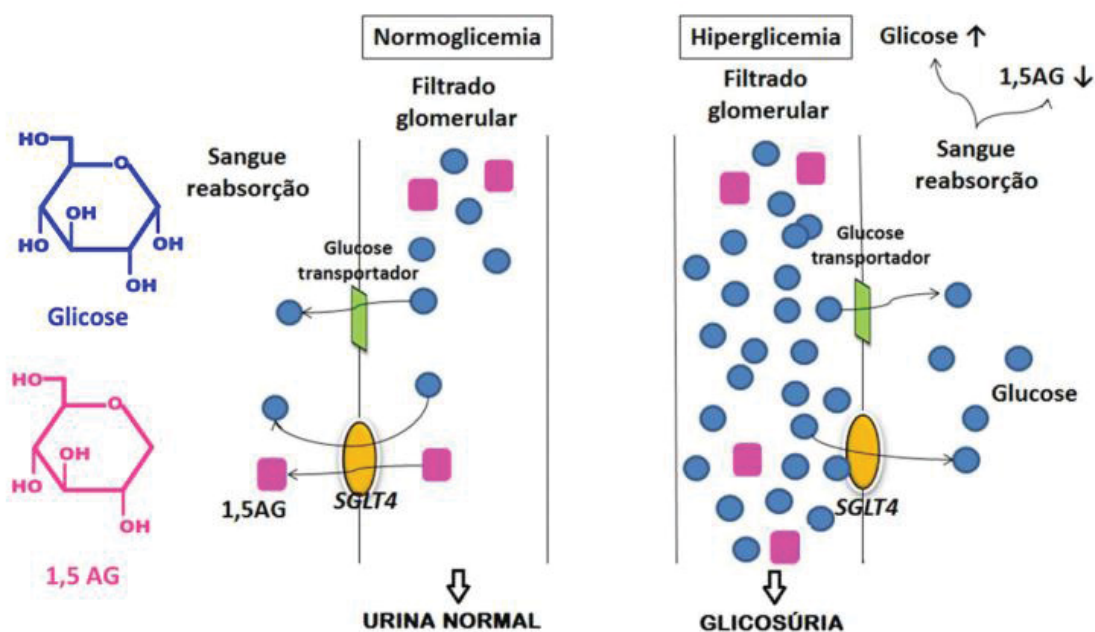
Em alguns casos de DM1, a concentração de HbA1c pode não apresentar elevação significativa durante o diagnóstico, mesmo quando o indivíduo manifesta sintomas de hiperglicemia, isso porque a concentração glicêmica pode variar com os períodos de refeição, exercícios, entre outros, de modo que elevações perigosas podem passar despercebidas (CRAIG et al., 2014; NELSON e COX, 2014). Contudo, o cumprimento do tratamento e das recomendações médicas nutricionais, contribuem para obter resultados de HbA1c dentro dos limites esperados (KILPATRICK, 2008).

3.4.2 1,5 Anidroglucitol (1,5-AG)

O monossacarídeo 1,5-anidroglucitol (1,5-AG) ou 1-deoxi glicose é um analito obtido naturalmente a partir da dieta, pouco metabolizado pelo organismo, que compete com a glicose pela sua reabsorção através dos mesmos transportadores dos túbulos renais (DUNGAN, 2008; KOGA, 2014). O 1,5-AG também é aceito como um biomarcador de controle glicêmico de curto prazo ou pós-prandial, pois apresenta picos de concentração plasmática dentro de 24 a 72 horas em condição hiperglicêmica (BUSE et al., 2003).

Quando a concentração plasmática de glicose ultrapassa 180 mg/dL (limiar renal), a concentração plasmática de 1,5-AG diminui, visto que a reabsorção tubular é inibida competitivamente pelo excesso glicose (FIGURA 4). Portanto, concentrações plasmáticas baixas de 1,5-AG estão relacionadas a episódios hiperglicêmicos.

FIGURA 4 - REABSORÇÃO TUBULAR DO 1,5-AG E GLICOSE EM CONDIÇÕES DE NORMO E HIPERGLICEMIA.



No estado normoglicêmico, a glicose (círculos azuis) e o 1,5-AG (quadrados rosas) são reabsorvidos do filtrado glomerular através dos transportadores tubulares de glicose e SGLT4 (transportador de manose com afinidade para 1,5-AG). Nesta condição, os transportadores recuperam quase totalmente a glicose e o 1,5-AG filtrados, sendo perdidos na urina quantidades desprezíveis de 1,5-AG. Na hiperglicemia, o excesso de glicose presente nos túbulos renais (glicose > 180mg/dL), compete com o 1,5-AG pela reabsorção através dos transportadores tubulares e consequentemente a glicose é reabsorvida, enquanto o 1,5-AG é eliminado pela urina. A resultante na hiperglicemia é a elevação da glicose no sangue com concomitante redução do 1,5-AG.

FONTE: Adaptado de DUNGAN, 2008.

De acordo com Buse e colaboradores (2003), este é um teste importante que pode complementar o automonitoramento frequente ou contínuo do controle glicêmico. Para realizar a quantificação desta molécula, três princípios metodológicos diferentes podem ser empregados: espectrometria de massa, cromatografia ou enzimático-colorimétrico. Embora haja grande interesse em estudar este analito, o exame não é amplamente disponível na prática clínica laboratorial (BORITZA, 2014; WEISS, 2014; GOMES, 2015).

3.4.3 Frutosamina

A frutosamina se refere à estrutura do produto de rearranjo formado pela reação não enzimática da glicose com ϵ -amino grupos nos resíduos de lisina de proteína (NETTO et al., 2009). Portanto, frutosamina é o nome genérico dado a todas as proteínas glicadas, das quais a albumina é a fração plasmática majoritária.

Como o tempo de meia-vida da albumina é aproximadamente 15 dias, a frutosamina é um analito de controle glicêmico de curto período, que avalia a glicemia média referente ao período de 10-15 dias antes do exame (NETTO et al., 2009; SBD, 2016). A utilização do teste é uma alternativa nos casos em que existem fatores que possam influenciar a confiabilidade da dosagem de HbA1c, como anemia ou hemoglobinopatias (SBD, 2016).

3.4.4 Albumina glicada (AG)

A dosagem de AG reflete o controle glicêmico em duas a três semanas, referente à meia-vida da albumina (cerca de 15 dias) (NETTO et al., 2009). A glicação da albumina não é afetada pelo tempo de sobrevivência dos eritrócitos, assim como ocorre com a HbA1c, por outro lado o teste pode ter sua confiabilidade questionada na presença de distúrbios que afetem o estado nutricional do paciente, presença de proteinúria maciça, cirrose, disfunção da tireoide e tabagismo (SBD, 2016).

3.4.5 Tratamento para o Diabetes *mellitus* tipo 1

No tratamento terapêutico do DM1A, a insulina exógena é o principal suporte para os pacientes, sendo considerada fundamental logo no início do diagnóstico, devido a destruição das células beta pancreáticas, que incapacita a síntese e secreção da insulina nestes pacientes (SBD, 2016; ADA, 2017).

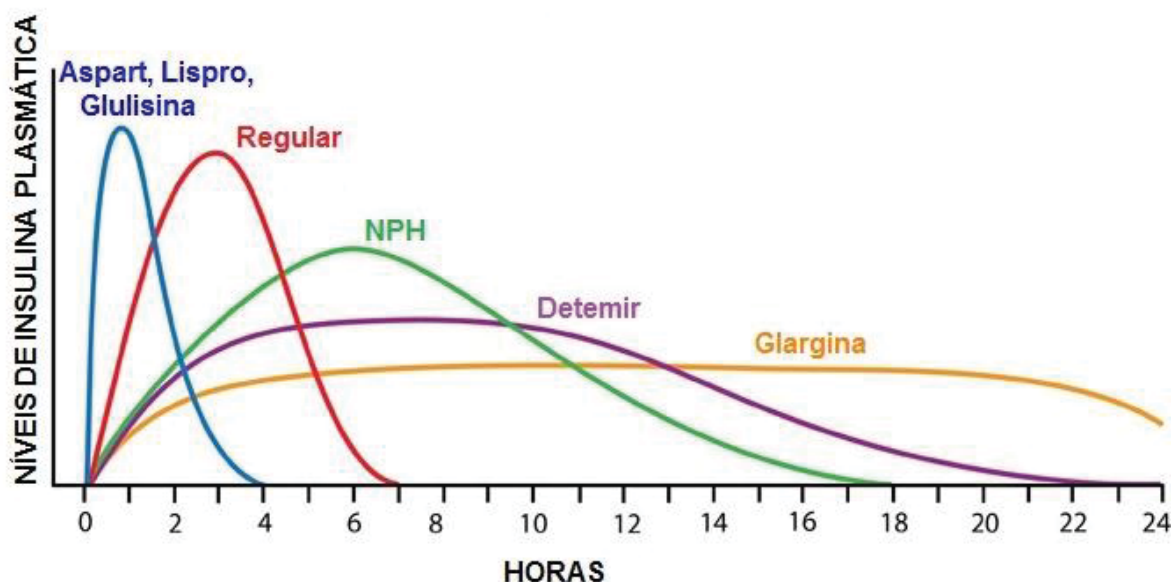
Nos dias atuais, é possível encontrar diferentes tipos de insulina e análogos, que em parte se diferem na velocidade de início de ação, duração (FIGURA 5), bem como, na manutenção da concentração de glicemia próxima ao nível basal. Independente da larga diversidade de insulinas exógenas e análogos, o objetivo único do tratamento insulínico é justamente evitar a ampla variabilidade dos valores de glicemia, que afeta diretamente o desenvolvimento das complicações agudas e crônicas do DM (MALIK e TAPLIN, 2014).

Em função do seu efeito pronunciado sobre a glicemia, o plano de tratamento deve ser individualizado, adaptado às características e necessidade do paciente e da sua família (idade, histórico de hipoglicemias, principalmente noturnas e não evidentes, estilo de vida, nível sócio econômico e intelectual, prática de atividades físicas, outras comorbidades e doenças macrovasculares) (REWERS et al., 2007; CHIANG et al., 2014). A dose inicial de insulina, deve ser prescrita com base no peso do paciente, com doses que variam de 0,4 a 1,0 unidades/Kg/dia. Paralelamente ao ajuste da dose, é de extrema importância que seja feita a conscientização do paciente em relação à ingestão de carboidratos e prática de atividades físicas (ADA, 2017)

As diferentes insulinas disponíveis atualmente percorreram um longo caminho desde a sua descoberta, a partir da insulina animal purificada para insulinas humanas produzidas por organismos geneticamente modificados (MATHIEU, GILLARD e BENHALIMA, 2017). Contudo, embora nas últimas décadas tenha ocorrido nítido avanço técnico e científico no desenvolvimento de ferramentas de auxílio para a administração da insulina, como as canetas, bombas de infusão, e seringas, ainda há pontos fracos na substituição da insulina endógena pela exógena, como as crises hipoglicêmicas, que ocorrem devido à impossibilidade de supressão da liberação de insulina quando a concentração de glicose diminui (ATKINSON, EISENBARTH e MICHELS, 2014). O importante é que novos análogos de insulina ou pelo menos, novos conceitos na administração de insulina estão sob constante

investigação (BECKER et al., 2005; SCHMID, 2007; MATHIEU, GILLARD e BENHALIMA, 2017).

FIGURA 5 - REPRESENTAÇÃO FARMACOCINÉTICA DAS INSULINAS E SEUS ANÁLOGOS.



Essa figura ilustra alguns dos principais tipos de insulina e seus análogos (de rápida e de longa ação), e apresenta graficamente o início e tempo aproximado de ação de cada uma. A linha azul representa a farmacocinética da insulina Aspart, Lispro, e Glulisina que possuem início de ação em minutos após a administração, com pico de 1-2 horas, com tempo de ação de aproximadamente de 4 horas. A linha vermelha, ilustra a insulina regular, a qual inicia sua ação logo após administração, no entanto com pico entre 2-4 horas e a duração de sua ação é próxima de 7 horas. A NPH (linha verde) apresenta início de ação de aproximadamente 1 hora, alcançando o pico em cerca de 6 horas, e a duração da ação próxima a 18 horas. A Detemir (linha roxa), e Glargina (linha alaranjada) apresentam início de ação após 1-2 horas, com pico pouco pronunciado, e ação em torno de 24 horas.

FONTE: Adaptado de PIRES e CHACRA, 2008.

A escolha dos esquemas terapêuticos para o tratamento dos indivíduos com DM1 está associada principalmente à tentativa de evitar lipólise, a liberação hepática de glicose no período interdigestório, e manter o controle glicêmico prandial (refeições), bem como as doses complementares que corrigem as hiperglicemias pré-prandiais ou inter-prandiais (MALIK e TAPLIN, 2014). Por isso, os diversos tipos de ação das insulinas (rápida, curta, intermediária e prolongada) são importantes para compor o tratamento, que envolve múltiplas aplicações durante o dia, a fim de possibilitar um melhor controle glicêmico (WHITE et al., 2001; SBD, 2016).

3.5 ASPECTOS GENÉTICOS ASSOCIADOS AO DM1A

Achados importantes nos últimos anos relacionados a susceptibilidade ao DM1 e as consequências da destruição autoimune das células beta pancreáticas tem direcionado a comunidade científica a afirmar que fatores genéticos contribuem de uma forma importante para gênese da doença (REDONDO et al., 2008). Estudos voltados a detectar polimorfismos no DNA em diferentes populações obtiveram grande destaque na investigação não somente do risco para a doença, mas também de proteção (MIJOVIC et al., 1991; FLOREZ, HIRSCHHORN e ALTSHULER, 2003).

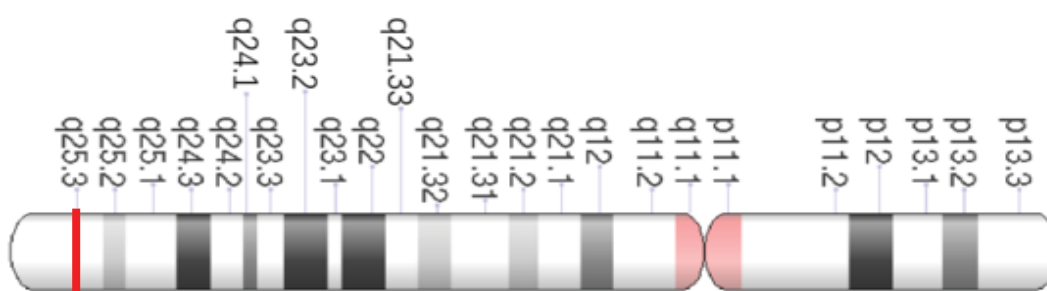
O polimorfismo do tipo *single nucleotide polymorphisms* (SNP) é o termo utilizado para definir a variação de uma única base nitrogenada no DNA. SNPs localizados em genes podem levar a variações na sequência de aminoácidos afetando a estrutura e função de proteínas. No entanto, os SNPs não estão apenas em genes, como também podem ocorrer em regiões não codificantes de DNA. Cabe ressaltar que para ser um polimorfismo, a variação detectada na sequência do DNA deve ocorrer com uma frequência $\geq 1\%$ na população, caso contrário, a variação é considerada uma mutação (RISCH e MERIKANGAS, 1996; BROOKES, 1999).

O mapeamento de SNPs pode ser considerada uma ferramenta eficaz em estudos caso-controle. O estudo realizado por Abbasi e colaboradores (2017) mostrou associação entre o alelo raro do SNP rs2476601 do gene *PTPN22* com o DM1 em uma população iraniana. O gene *PTPN22* codifica a proteína tirosina fosfatase, cuja função é regular a atividade das células T e B. Outro estudo caso-controle com DM1 relatou que o rs187238 do gene *IL-18* não está associado ao DM1 diagnosticado em crianças euro-brasileiras (AL-LAHHAM et al., 2018). No entanto, em pesquisa realizada com crianças predominantemente afro-brasileiras, o mesmo SNP foi associado a presença de DM1. Logo, a relação do SNP como fator de risco ou proteção em relação a uma determinada doença pode ser fortemente influenciada pelas diferenças na ancestralidade existentes no Brasil (TAVARES et al., 2013).

3.5.1 Gene da frutosamina-3-quinase (*FN3K*): controle de glicação não enzimática intracelular

O gene da frutosamina-3-quinase (*FN3K*), localizado no braço longo do cromossomo 17, posição 17q.25.3, possui 6 éxons (MIJOVIC et al., 1991), é expresso em todos os tecidos humanos, mas as maiores concentrações da enzima encontram-se nos rins, coração e tecido nervoso (MONNIER, 2006).

FIGURA 6- LOCALIZAÇÃO DO GENE *FN3K* NO CROMOSSOMO 17



A marcação vermelha indica que este gene está localizado no braço longo na posição 25.3.

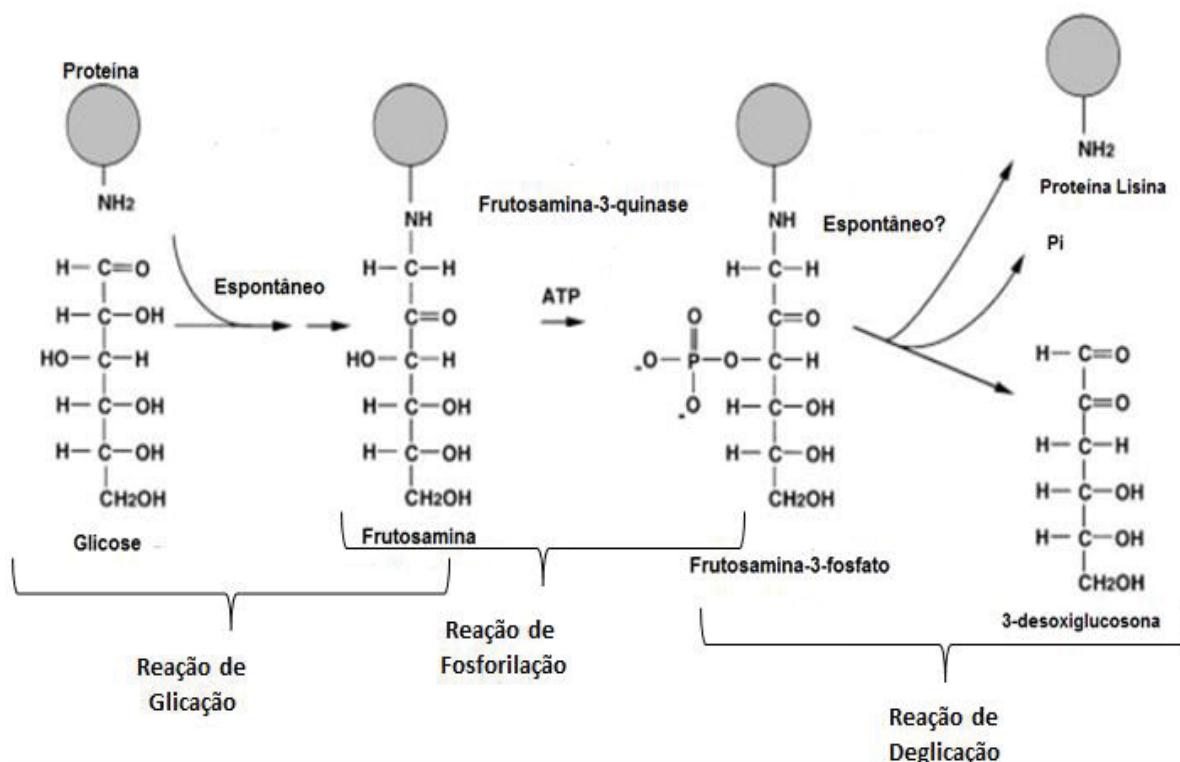
FONTE: Adaptado de <[http://www.wikiwand.com/pt/Cromossoma_17_\(humano\)](http://www.wikiwand.com/pt/Cromossoma_17_(humano))> Acesso em 29 de dezembro de 2017.

Este gene codifica a enzima frutosamina-3-quinase (*FN3K*), de massa molecular de 34kDa, constituída por 309 resíduos de aminoácidos (DELPPIERRE et al., 2000; SZWERGOLD, HOWELL e BEISSWENGER, 2001). Através da concentração relativa de RNAm foi possível constatar que a expressão de *FN3K* é significativamente maior nos órgãos susceptíveis ao Diabetes, como os rins, coração e tecido nervoso (CONNER, BEISSWENGER e SZWERGOLD, 2005). No entanto, a determinação da resposta transcricional do gene *FN3K* em fibroblastos estimulados com alguns tratamentos que mimetizavam as condições metabólicas e hormonais no DM, não resultou no aumento da concentração de RNAm, indicando que a expressão do gene *FN3K* é constitutiva, ou seja, o gene é expressado constantemente (CONNER, BEISSWENGER e SZWERGOLD, 2005).

Devido a sua ação catalítica, a *FN3K* é considerada uma enzima reparadora, pois atua no processo de reversão da glicação (FIGURA 7), evitando a formação dos produtos finais de glicação avançada (AGEs), os quais estão envolvidos nas complicações do DM. Mesmo promovendo a deglicação de proteínas em muitos

tecidos, como o pancreático e, conseqüentemente, uma desaceleração nas complicações do DM, a FN3K não está envolvida na manutenção e sobrevivência das células beta pancreáticas (MOSCA et al., 2011; ŠKRHA et al., 2014).

FIGURA 7 – ESQUEMA DA VIA DE DEGLICAÇÃO INICIADA PELA FRUTOSAMINA-3-QUINASE.



ATP, Trifosfato de adenosina; NH₂, Radical amino; Pi, Fosfato inorgânico.

A reação de glicação não enzimática ocorre entre o grupo carbonila da glicose e o grupo amino de um resíduo de aminoácido da proteína, geralmente a lisina, gerando o produto frutossamina. Essa cetossamina será fosforilada no carbono-3 pela ação catalítica da enzima frutossamina-3-quinase (FN3K). O produto frutossamina-3-fosfato é instável e possivelmente se decompõe espontaneamente em 3-desoxiglucosona e fosfato inorgânico, regenerando o aminoácido lisina. O produto 3-desoxiglucosona é rapidamente detoxificado para produtos inertes, como a 3-desoxifrutose ou 2-deoxy-3-ácido cetoglucônico.

FONTE: Adaptado de DELPIERRE, 2002; AVE MARIA et al., 2015

A ação de deglicação da FN3K foi evidenciada em um estudo empregando ratos FN3K ^{-/-}, cujas hemácias apresentaram concentração de HbA1c cerca de 2,5 vezes mais elevada em relação aos valores detectados nas hemácias de ratos FN3K ^{+/+} ou FN3K ^{+/-} (VEIGA-DA-CUNHA et al., 2006).

A ação reparadora da FN3K também foi mostrada em um estudo *in vitro* com células eritrocitárias tratadas com o substrato e inibidor competitivo, 1-deoxi-1-morfolinofrutose (DMF) para FN3K. Na presença desse substrato, ocorreu uma duplicação da concentração de Hb1Ac, enquanto na ausência do substrato, a concentração diminuiu. Esses resultados indicaram que a inibição de FN3K pelo

substrato DMF permitiu que o processo de glicação da hemoglobina ocorresse (DELPIERRE et al., 2002). Portanto, este trabalho foi uma contraposta à teoria de que a formação de frutosaminas é um processo irreversível, inevitavelmente guiado para conversão de AGEs.

Em estudo subsequente, Delpierre e colaboradores (2006) mostraram que a atividade de FN3K não foi diferente entre pacientes com DM1 e indivíduos sem a doença, mas a atividade em ambos os grupos apresentava uma variabilidade interindividual em até quatro vezes. Essa variabilidade foi associada com a detecção de polimorfismos próximos ou ao longo do gene *FN3K*. No total, 6 polimorfismos foram detectados, sendo dois na região promotora do gene (P1 e P2), um no éxon 2 (P3), um no intron 4 (P4) e 2 no éxon 6 (P5 e P6).

No entanto, de acordo com outro autor, nenhum destes polimorfismos no gene *FN3K* resultou na modificação na estrutura da enzima, que pudesse aumentar ou diminuir a sua atividade catalítica bem como aquelas localizadas nas regiões próximas ao gene. Uma explicação provável é que eles estejam em desequilíbrio de ligação com polimorfismos em sequências reguladoras (elementos potenciadores, *enhancers*) (DELPIERRE et al., 2006). Interessantemente, os polimorfismos P1 e P5 foram significativamente associados à atividade FN3K, sendo que individualmente representaram ≈ 40 e 35% da variância total da atividade, respectivamente. O P5, descrito como um polimorfismo 900C/G ou rs1056534 é o SNP estudado no presente projeto.

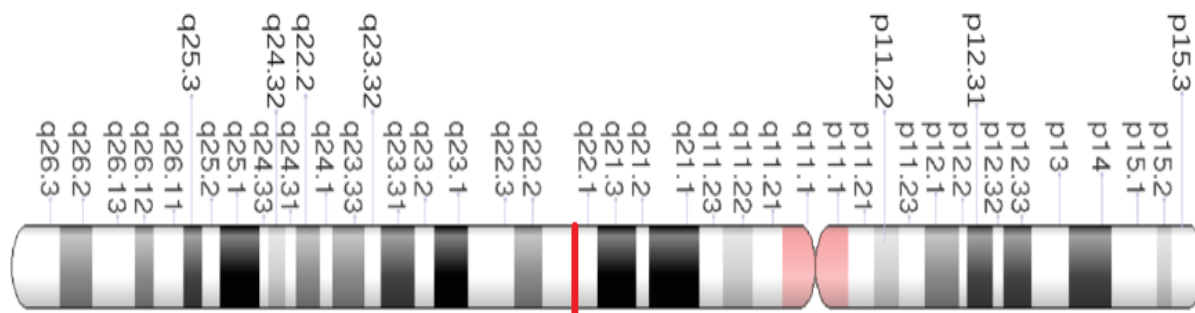
O polimorfismo rs1056534 caracterizado pela troca de uma guanina por uma citosina (G>C) promove uma alteração sinonímia do códon (TCC para TCG), que corresponde ao aminoácido serina. Apesar desse polimorfismo não alterar o resíduo de aminoácido da FN3K, estudos referentes às diferenças de genótipo e frequências alélicas tem sido realizados em diferentes populações e, os resultados obtidos, associados com a atividade de FN3K, complicações do DM e com outros parâmetros bioquímicos (MHOAS et al., 2010; TANHÄUSEROVÁ et al., 2014; ŠKRHA et al. 2014; CIKOMOLA et al., 2016). Os genótipos GG e CG de pacientes com DM1 e DM2 foram associados com uma diminuição significativa na concentração do receptor solúvel RAGE (sRAGE) (GG: 1055 ± 458 e CG: 983 ± 363 vs. CC: 1796 ± 987 ng/L, $p < 0.0001$), o qual pode ser um fator de proteção em relação às complicações do DM (ŠKRHA et al., 2014).

Em outro estudo, pacientes DM2 com genótipo CC, apresentaram concentração de HbA1c estatisticamente menor ($6,48 \pm 0,05\%$) em relação aos pacientes com genótipo GC ($7,66 \pm 0,09\%$) e GG ($7,68 \pm 0,09\%$). Além disso, a variação alélica CC em pacientes DM2 foi associada com o diagnóstico tardio da doença (CC: $56,0 \pm 1,90$ anos; GC: $52,0 \pm 0,62$ anos; GG: $50,1 \pm 0,71$ anos; $p < 0.05$) (MOHÁS et al., 2010). Em relação à associação com as complicações do DM, o polimorfismo rs1056534 do *FN3K* apresentou uma associação fraca com a progressão da doença renal em pacientes DM2 (TANHÄUSEROVÁ et al., 2013).

3.5.2 Gene da hexoquinase-1 (*HK1*): fator limitante da glicólise

O gene *HK1* está localizado no cromossomo 10, na posição 10q22.1 e, é composto por 25 éxons (FIGURA 8). Esse gene codifica a enzima hexoquinase-1, que participa da primeira reação da via catabólica da glicose (glicólise) catalisando a fosforilação no carbono 6 da glicose às expensas de ATP, formando o composto glicose-6-fosfato (FIGURA 9).

FIGURA 8 - LOCALIZAÇÃO DO GENE *HK1* NO CROMOSSOMO 10

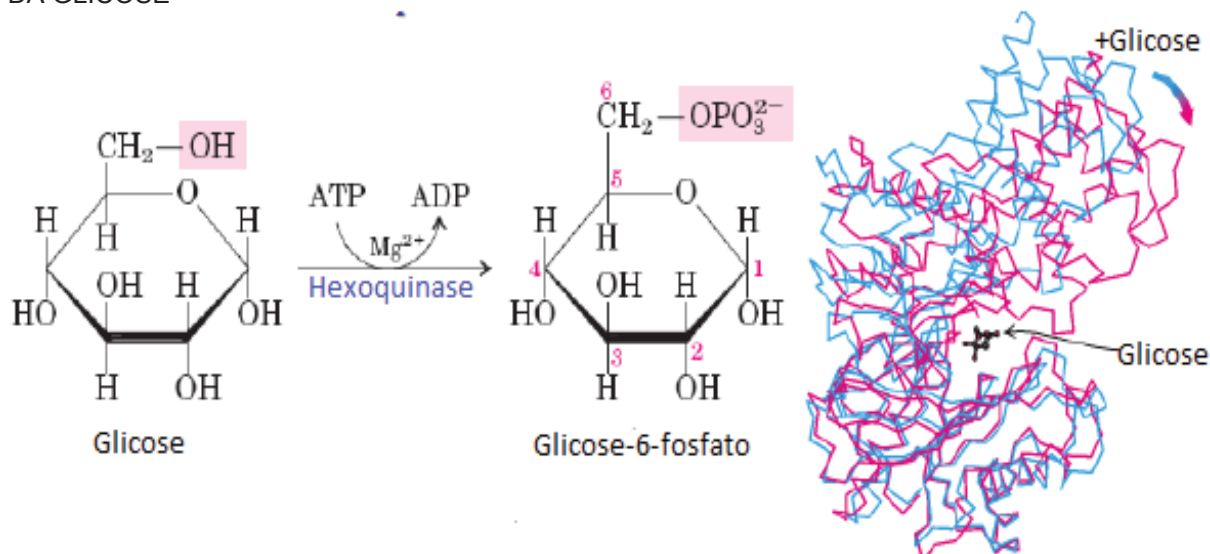


A marcação vermelha indica que este gene está localizado no braço longo na posição 22.1.

FONTE: <https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/d/dc/Human_chromosome_10_-_400_550_850_bphs.png/640px-Human_chromosome_10_-_400_550_850_bphs.png> Acesso em 22 de dezembro de 2017.

A HK1 é considerada uma enzima reguladora, pois atua como fator limitante da glicólise, uma vez que tem a atividade catalítica suprimida quando a concentração intracelular do seu próprio produto, a glicose-6-fosfato, for superior a sua concentração basal (RAPOPORT, HEINRICH e RAPOPORT, 1976; GJESING et al., 2011). Embora importante nesta reação, a HK1 também participa da fosforilação de outras hexoses, a exemplo da frutose e da manose (VOOGHT, et al., 2009).

FIGURA 9 – ETAPA INICIAL DA CATÁLISE DA GLICOSE: FOSFORILAÇÃO E APRISIONAMENTO DA GLICOSE



A hexoquinase catalisa a transferência de um grupo fosforil do ATP para uma variedade de açúcares de seis carbonos (hexoses), como glicose e manose. Para a catálise, a enzima requer Mg^{2+} , que forma um complexo com ATP. A hexoquinase consiste em dois lóbulos (azul), que se movem um para o outro (vermelho) quando a glicose está ligada. A fenda entre os lóbulos se fecha e a glicose é cercada pela proteína, com exceção do grupo hidroxila do carbono 6, que aceitará o grupo fosforil da ATP.

FONTE: BERG, TYMOCZKO e STRYER, 2002.

Além da HK1, a família da hexoquinase é composta por outras 3 isoformas: HK2 (2p13.1), HK3 (5q.35.2) e a HK4 ou glicokinase. A isoforma HK1 está associada à membrana mitocondrial externa e tem localização ubíqua na maioria dos tecidos, mas é altamente expressa no cérebro e hemácias, pois esses tecidos necessitam de maior consumo de glicose para suportar altas taxas de gasto de energia (BIANCHI et al., 1997, WILSON 2003; JONH, WEISS e RIBALET, 2011). A isoforma HK2 está localizada em tecidos dependentes de insulina, como o músculo esquelético, cardíaco e tecido adiposo e, também se encontra associada à membrana mitocondrial externa (JONH, WEISS e RIBALET, 2011). Já a HK3 está presente no citoplasma de praticamente todos os tecidos (WILSON 2003). Por fim, a HK4 localiza-se precisamente no fígado e no pâncreas (VOOGHT et al., 2009; NELSON e COX, 2014).

A deficiência ou ausência da atividade catalítica da enzima HK1 está associada com o desenvolvimento de anemia hemolítica não-esferocitária, a qual é uma condição rara, clinicamente significativa, e que ainda o mecanismo permanece não totalmente elucidado (BIANCHI et al., 1997; SORANZO, 2011). Em particular, o polimorfismo rs7072268 (T>C) promove a alteração do aminoácido leucina para

serina, sendo responsável pela perda completa da atividade catalítica da hexoquinase, enquanto a deleção de 96pb causa uma redução drástica da atividade da hexoquinase (BIANCHI et al., 1997).

Além da anemia hemolítica não-esferocitária, variações genéticas no gene *HK1* ou em regiões não codificantes podem apresentar associações com parâmetros bioquímicos de controle glicêmico. Estudos recentes correlacionaram variantes genéticas do gene da HK1 com a concentração de HbA1c. Entre essas variações, está o SNP rs7072268, localizado no íntron 7, posição 10q22.1, que promove a alteração de uma citosina por timina (alelo raro). Esse polimorfismo vem sendo associado à elevação de concentrações de HbA1c, porém pesquisadores não foram capazes de explicar o mecanismo envolvido (PARE et al., 2008; BONNEFOND et al., 2009; VOOGHT et al., 2009; GJESING et al., 2011).

Uma hipótese para associação do polimorfismo com a maior concentração de HbA1c é que sua presença pode afetar a quantidade e/ou atividade da enzima HK1 (PARE et al., 2008). Pare e colaboradores (2008) foram os primeiros a associar a variação genética de HK1 (rs7072268) com o aumento significativo de HbA1c em indivíduos saudáveis, não diabéticos, numa população de mulheres americanas. Esta associação entre o rs7072268 e HbA1c também foi descrita por Bonnefon e colaboradores (2009), que avaliou uma população francesa caucasiana com DM2. No entanto, o rs7072268 não apresentou associação com outros marcadores do controle glicêmico. Por outro lado, houve associação do rs7072268 com diminuição da concentração de hemoglobina e hematócrito sugerindo um estado pró-anêmico (BONNEFOND et al., 2009).

A associação do alelo T do rs7072268 com DM2, bem como a dislipidemia em jejum em indivíduos dinamarqueses não diabéticos foi relatado por Gjesing e colaboradores (2011) em um estudo caso-contrôle cujos resultados foram inseridos em um estudo de metanálise envolvendo outras populações (GJESING et al., 2011).

4 MATERIAL E MÉTODOS

Este projeto de pesquisa foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná, sob o CAAE: 24676613.6.0000.0102 (ANEXO 1).

4.1 AMOSTRAS

Este é um estudo tipo caso-controle, que incluiu indivíduos com Diabetes *mellitus* tipo 1 (DM1, n=149) e indivíduos sem Diabetes, como controle (CTRL, n=168), de faixa etária até 14 anos, não relacionados, pareados por gênero. As amostras dos portadores com DM1 foram coletadas durante exames de rotina, conforme protocolo do serviço de atendimento do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná (HC-UFPR) e da Unidade de Endocrinologia Pediátrica do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná. Já as amostras dos indivíduos sem Diabetes foram obtidas em escolas municipais da Região Metropolitana de Curitiba.

Os dados antropométricos e clínicos dos pacientes DM1 foram coletados através de entrevista e dados do prontuário médico, enquanto do grupo controle foi obtido exclusivamente por entrevista. Os pacientes com DM1 e indivíduos sem Diabetes participaram da pesquisa após o consentimento dos pais ou responsável, que foi firmado através da assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (ANEXO 2).

A coleta de sangue dos participantes da pesquisa foi realizada à vácuo através de tubos para obtenção de soro, o qual foi utilizado para a determinação dos parâmetros bioquímicos, e através de tubos com anticoagulante para quantificação de Hb1Ac e extração de DNA. O volume de sangue coletado dos participantes da pesquisa para obtenção do soro foi de aproximadamente 4mL, em tudo seco com gel separador (Tubo Gel BD Vacutainer® SSTTM; Becton, Dickinson, Co). O mesmo volume foi coletado em tubos contendo 7,2 mg de anticoagulante K₂EDTA (BD Vacutainer® K₂EDTA; Becton, Dickinson, Co) para obtenção de sangue total e plasma.

Após a coleta, as amostras de sangue para obtenção de soro foram centrifugadas a 6.000 rpm por 10 minutos (Centrífuga Compacta Hermle Z 206,

Alemanha), e alíquotas de soro foram transferidas para microtubos 1,5 mL, que foram armazenados à -20 e -80°C para a quantificação dos parâmetros bioquímicos (albumina, creatinina, ureia, glicose, HbA1c e proteínas totais).

As amostras de sangue total e foram homogeneizadas por 15 minutos. Após esse período, aproximadamente 1,0 mL do sangue total foi empregado para a determinação de Hb1Ac e o restante foi centrifugado a 3.500 rpm por 20 minutos (Centrífuga Hermle Z 306K, Alemanha) para obtenção do plasma e da camada leucocitária (*buffy coat*), que foi submetida à extração de DNA.

4.2 EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DO DNA GENÔMICO

O DNA genômico da camada leucocitária foi extraído pelo método de *salting out* (LAHIRI e NURNBERGER, 1991). Após extração, a quantificação do DNA genômico foi realizada através de espectrofotometria em 260 e 280 nm (*NanoDrop*®, *Thermo Scientific*). As amostras que apresentaram concentração inferior a 20 ng/μL e cujo grau de pureza obtido através da razão $A_{260/280}$ fosse <1,7 ou >2,1 não foram empregadas neste estudo, pois esses parâmetros são indicativos de baixa qualidade de DNA e contaminação da amostra (NEUMAIER et al., 1998).

Após a quantificação, as amostras de DNA foram diluídas em água ultrapura estéril à uma concentração de 100 ng/μL para serem armazenadas à -20°C no Biorrepositório do Laboratório de Bioquímica Clínica da UFPR. Para as análises de genotipagem pelo o sistema *TaqMan*®, as amostras de DNA à 100 ng/μL foram diluídas até a concentração final de 20 ng/μL em água ultrapura estéril e também armazenadas -20 °C.

4.3 GENOTIPAGEM DOS POLIMORFISMOS POR PCR EM TEMPO REAL

As genotipagens dos polimorfismos rs1056534 e rs7072268 foram realizadas através de PCR em tempo real com sondas fluorescentes específicas do sistema SNP *TaqMan*® (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). O ensaio de genotipagem SNP *TaqMan*® inclui dois iniciadores (*primers*) de PCR específicos para as regiões que flanqueiam o SNP de interesse e duas sondas de oligonucleotídeos *TaqMan*® específicas para os dois alelos em estudo. Essas

sondas tem um fluoróforo na extremidade 5', e um atenuador de fluorescência (*quencher*) na extremidade 3'. Uma sonda intacta emite um sinal fluorescente mínimo quando excitada, porque o atenuador absorve os fótons emitidos pelo fluoróforo devido à proximidade física entre o fluoróforo e o atenuador. Um sinal fluorescente é gerado quando a sonda intacta, após hibridização com o alelo alvo, é clivada pela atividade exonucleásica 5' da DNA polimerase durante cada ciclo da reação de PCR (DE LA VEGA et al., 2005).

Para discriminação alélica, duas sondas específicas para cada alelo do SNP são empregadas e, cada sonda é marcada com um fluoróforo (VIC e FAN), permitindo a detecção de ambos os alelos. Assim, a sonda que anelar ao DNA, será clivada pela DNA polimerase, liberando o silenciador e permitindo que a fluorescência do fluoróforo seja emitida e quantificada (SCHLEINITZ, DISTEFANO e KOVACS, 2011).

A sonda fluorescente TaqMan® (*Applied Biosystems*) validadas para o rs1056534 foi C_11802689_10 e, para o rs7072268 foi a C_30 0005592_10. Essas sondas carregam os fluoróforos VIC e FAN (QUADRO 5).

QUADRO 5 - CARACTERIZAÇÃO DOS POLIMORFISMOS NO ESTUDO

| Designação OMIN | Cromossomo Posição | Gene | Polimorfismos | | TaqMan |
|-----------------|--------------------|-------------|---------------|-----|----------------|
| 64122 | 17q25.3 | <i>FN3K</i> | rs1056534 | C/G | C__1180268_10 |
| 3098 | 10q22.1 | <i>HK1</i> | rs7072268 | C/T | C__30005592_10 |

rs: dbars: reference SNP database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez>).

OMIN, Online Mendelian Inheritance in Man®, <http://omim.org/>

TaqMan: sonda específica para cada polimorfismo

FONTE: O autor, 2017.

As genotipagens foram realizadas no equipamento 7500 Fast™ (*Applied Biosystems*, Foster City, CA, USA), utilizando reagentes (*Master Mix*®, *SNP Genotyping Assay*®) e demais suplementos fornecidos pelo fabricante (*Applied Biosystems*). Inicialmente, os reagentes e o DNA extraído foram pipetados em placas de 96-poços (QUADRO 6). As pipetagens ocorreram em câmara de fluxo laminar para evitar contaminação. A placa foi coberta com filme específico e posteriormente centrifugada por 4 minutos a 4000 rpm para remoção de possíveis bolhas de ar nos poços. Em cada placa, dois poços foram usados como controle negativo, contendo apenas o Super Master Mix (*MasterMix*® + *SNP*

Genotyping Assay[®] + água ultrapura estéril), para avaliar uma possível contaminação do sistema. Para cada placa, amostras de DNA do grupo DM1 e controle foram distribuídas de maneira aleatória.

QUADRO 6 – PROTOCOLO UTILIZADO NAS GENOTIPAGENS COM SONDAS FLUORESCENTES POR PCR EM TEMPO REAL

| Reagentes | Volumes (Volume final 8,0 µL) |
|---|---------------------------------------|
| Master Mix [®] (2x) | 3,0 µL |
| SNP Genotyping Assay [®] (40x) | 0,1 µL |
| Água ultrapura estéril | 1,9 µL |
| DNA molde (20 ng/µL) | 3,0 µL |
| | |
| Clivagem | Temperatura → Tempo (segundos) |
| 1 ciclo | 60°C → 30 s (pré-PCR) |
| 1 ciclo | 95°C → 600 s (ativação polimerase) |
| | 95°C → 15 s (desnaturação) |
| 50 ciclos | 60°C → 90 s (anelamento/extensão) |
| 1 ciclo | 60°C → 30 s |

Sonda TaqMan[®] SNP *Genotyping Assays*, contendo um par de oligonucleotídeos iniciadores (primers), sondas fluorescentes específicas para genotipagem com os fluoróforos VIC[®] e FAM[™]. *Master Mix*[®]: sistema de reação composto pela DNA polimerase, Mg⁺⁺, tampão e ativadores, otimizado para uso com sondas *TaqMan*[®].

FONTE: O autor, 2017.

Em todas as análises, a qualidade da genotipagem identificada pelo software do sistema 7500 Fast[™] foi superior >98%, excluindo, portanto, a necessidade de investigação de fontes de baixa eficiência na PCR e/ou repetição das análises.

4.4 QUANTIFICAÇÃO DE PARÂMETROS BIOQUÍMICOS E DADOS ANTROPOMÉTRICOS.

As dosagens bioquímicas incluíram função renal (ureia, creatinina), controle glicêmico (glicemia de jejum, HbA1c e 1,5-AG), proteínas totais e albumina. As dosagens foram realizadas em sistema automatizado Labmax 400 (Labtest Diagnóstica SA) no Laboratório Escola, UFPR, e Architect Ci8200 (Abbott Diagnóstica Laboratórios do Brasil) no Laboratório do Hospital de Clínicas, HC-UFPR, utilizando reagentes, calibradores e controles adequados ao sistema automatizado (QUADRO 7).

QUADRO 7 - PARÂMETROS BIOQUÍMICOS, METODOLOGIAS E INTERVALO DE REFERÊNCIA PARA CRIANÇAS E ADOLESCENTES.

| Dosagem | Princípio Metodológico | CVA (%) | Intervalo de Referência |
|------------------------|---|---------|-------------------------|
| Albumina | Colorimétrico (Verde de Bromocresol) | 1,6 | 2,9-4,7g/dL |
| Creatinina | Colorimétrico (Picrato alcalino) | 2,7 | 0,26-0,81*mg/dL |
| Glicose | Glucose oxidase – Trinder | 2,2 | <100mg/dL |
| Hemoglobina glicada | Imunoensaio (padronizado DCCT) | 1,7 | 3,5-6,5% |
| Proteínas Totais | Colorimétrica (Biureto) | 1,4 | 6-8g/dL |
| Ureia | Enzimático (Urease UV) | 6,2 | 8-36mg/dL |
| 1,5 anidroglicitol | Enzimático Glycomark | 3,4 | >10 µg/mL |

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

FONTE: O autor, 2017.

Os dados antropométricos (idade, peso, altura, gênero) e clínicos (tempo de Diabetes, CAD no diagnóstico e histórico CAD no último ano) foram obtidos através de entrevista direta e análise de registros médicos.

4.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

O teste de *Kolmogorov-Smirnov* foi empregado para avaliar a normalidade das variáveis contínuas e a presença de *outliers* foi realizada pelo método gráfico disponível no programa *Statistica* para *windows* 10.0 (*StatSoft Inc, Tulsa OK, USA*).

As variáveis que apresentaram distribuição normal foram comparadas pelo teste t de *Student* (não pareado e bidirecional). Estas variáveis foram representadas pela média $\pm 1SD$ (1-desvio padrão) e, variáveis discretas foram comparadas com o teste de *Chi-quadrado* (χ^2). Para as análises de correlação, o modelo descrito por *Pearson* (correlação linear) foi utilizado. Variáveis contínuas sem distribuição normal passaram por transformação logarítmica ou analisadas pelo teste *U* de *Mann-Whitney*, conforme apropriado. Estas variáveis foram representadas pela mediana e intervalo interquartil (Q1-Q3; percentil 25%–75%).

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

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

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

O *z-score* foi calculado com o calculador do *The Children's Hospital of Philadelphia* (<http://zscore.research.chop.edu/>).

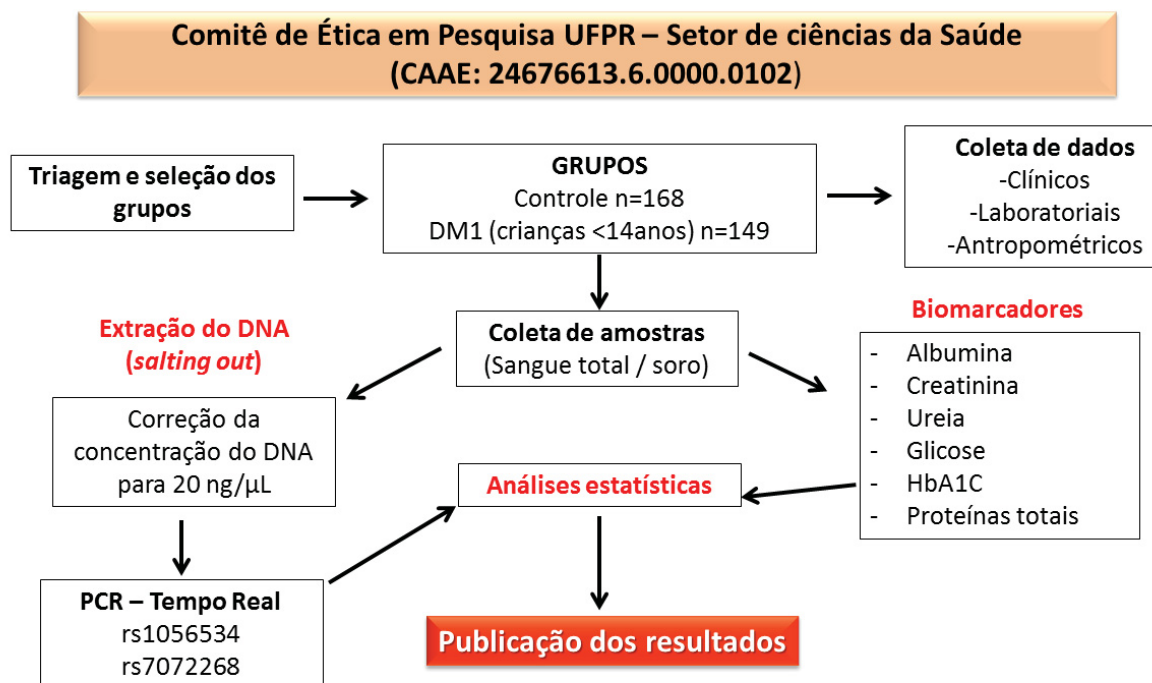
As comparações das frequências alélicas com outras populações foram consideradas similares quando a frequência do alelo menos comum se encontrava dentro do limite do IC 95%. Frequências acima ou abaixo de 95%IC foram consideradas diferentes.

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

4.6 FLUXOGRAMA DE TRABALHO

O fluxograma de trabalho, com as principais etapas do projeto, está representado na Figura 10.

FIGURA 10 – FLUXOGRAMA DE TRABALHO.



FONTE: O autor, 2017.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados e discussão serão apresentados em três tópicos: 1) caracterização da amostra; 2) Biomarcadores; 3) Genotipagem dos SNPs em estudo.

5.1 DADOS ANTROPOMÉTRICOS, CLÍNICOS E LABORATORIAIS DOS GRUPOS DM1 E CONTROLE

O grupo DM1 e grupo controle foram pareados por idade e gênero e a partir deste pareamento, os participantes de cada grupo tiveram os parâmetros peso, altura, índice de massa corpórea (IMC) comparados (Tabela 1). 90% das crianças e adolescentes (6 – 14 anos) de ambos os grupos eram Euro-brasileiras e 10% eram Afro-brasileiras ou outras etnias.

A estatística descritiva dos parâmetros antropométricos para os grupos controles e DM1 é apresentada na tabela 1.

TABELA 1 - CARACTERÍSTICAS ANTROPOMÉTRICAS DOS GRUPOS CONTROLE E DM1

| PARÂMETROS | CONTROLE (n = 168) | DM1 (n = 149) | P |
|--------------------------|-----------------------|--------------------|------------------|
| Idade (anos) | 10,0 (10-11) | 12,0 (9-13) | <0,001 |
| Gênero (M/F) | 90/78 | 72/77 | 0,351** |
| Peso (kg) | 38,2 (33,2-45,1) | 38,9 (30,4 – 50,3) | 0,973 |
| Altura (m) | 1,44 ± 0,09 | 1,44 ± 0,15 | 0,933 |
| IMC (kg/m ²) | 18,1 (16,7-20,3) | 18,0 (16,6-20,9) | 0,926 |
| Z-score | 0,52 ± 1,0 | 0,25 ± 0,98 | 0,019 |
| Tempo de DM (anos) | - | 4,7 ± 3,6 | |

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. M, masculino; F, feminino; -: dados não disponíveis; IMC: Índice de massa corpórea; P <0,05 (negrito) é considerado significativo.

FONTE: O autor, 2017.

5.1.1 Idade e etnia

A Suécia está posicionada em segundo lugar no *ranking* de número de casos de DM1 no mundo, com valores estimados próximos a 40-44 por 100.000 crianças

por ano (BERHAN et al., 2011). A Finlândia, primeira colocada, registrou um total de 14.721 crianças suecas (7.769 meninos e 6.952 meninas) com DM1 antes dos 15 anos de idade durante 1978 – 2007. Deste total de casos, foi constatado que entre 1978 até o final da década de 1990, os grupos etários 0-4 e 5-9 anos apresentaram o maior aumento relativo de casos de DM1. Ao longo da década de 90, foram os grupos etários 5-9 e 10-14 anos que tiveram as maiores taxas relativas de casos de DM1 e a partir de 2000, a maior incidência foi observada no grupo de 10 a 14 anos (BERHAN et al., 2011).

Ludvigsson (2017) compilou outros estudos (BERHAN et al., 2011; DAHLQUISTGG, NYSTRÖML e PATTERSON, 2011; PETERSON et al., 2014) e relatou que a incidência de DM1 continuou a aumentar na Suécia até 2015, o último ano completo de registro. Entre 2014-2015, a incidência em adolescentes com idade inferior a 15 anos foi de 48,8 por 100.000 pessoas a cada ano, sendo que nos últimos 6 anos, foi observada uma incidência diminuída entre as faixas etárias de 0 a 4 anos (~28%) e um aumento para a idade entre 10-14 anos (~62%), diminuindo após os 15 anos de idade (~41%) (LUDVIGSSON, 2017).

Manuwald e colaboradores (2017) realizaram uma pesquisa semelhante que comparou registros de 1982 a 1989 e 1999 a 2014, com dados da população europeia, observando que a taxa de incidência do DM1 aumentou de 3,5 para 11,5 anos no primeiro período e de 14,0 para 24,0 anos no segundo. Este estudo também detectou que a idade do diagnóstico no grupo entre 10 e 14 anos foi maior comparado a outros grupos etários (0 ± 4 e 5 ± 9 anos). Novamente, as prováveis razões para o aumento de casos de DM1 entre 10 e 14 anos estão atreladas às mudanças nas condições de vida e ambientais após a reunificação alemã.

De acordo com a Federação Internacional de Diabetes (IDF, 2017), o Brasil ocupa o terceiro lugar dentre os 10 países com maiores números de novos casos de DM1 em crianças e adolescentes. Para a faixa etária inferior a 15 anos de idade, 7.600 novos casos foram diagnosticados, enquanto para a faixa etária com menos de 20 anos, o número de novos casos passou para 9.600.

O grupo DM1 foi composto por 90% de indivíduos Euro-brasileiros, sendo os 10% restantes predominantemente afro-brasileiros. Esta distribuição étnica já era esperada, devido às características raciais da região onde foram obtidas as amostras, na população do sul do Brasil.

5.1.2 Peso, Altura, IMC e Z-score

Para os parâmetros, peso, altura e IMC não houve diferença significativa entre os dois grupos ($p>0,05$). O IMC é um parâmetro amplamente utilizado para avaliação e compreensão do estado nutricional que, segundo recomendações da Sociedade Americana de Diabetes (2017) deve fazer parte da avaliação médica, assim como a altura, peso, avaliação do crescimento e desenvolvimento puberal das crianças e adolescentes, como forma de medida de triagem e acompanhamento.

O *z-score* é outro dado antropométrico que combina dados antropométricos (estatura, peso, gênero e idade) para expressar o estado nutricional de crianças e adolescentes e, avaliar o crescimento. O cálculo baseia-se na diferença entre o valor individual (x) e a média da população, dividida pelo desvio padrão (σ). O resultado varia de +2 (sobrepeso) a -2 (abaixo do peso), indicando quão longe, e em qual direção (negativo ou positivo) o valor se desvia da média populacional (WANG et al., 2006).

Para o *z-score*, foi encontrada uma redução significativa no valor do grupo DM1 quando comparado ao grupo controle ($P=0,019$). Este resultado está de acordo com o esperado, segundo a literatura, pois a correlação entre o DM1 e o *z-score* baseia-se nas alterações metabólicas, consequência da deficiência de insulina, bem como também aos primeiros sinais e sintomas da doença (redução de peso severa e desidratação) (EISENBARTH, CONNELLY e SOELDNER, 1987; USHER-SMITH, *et al.*, 2015).

5.2 PARÂMETROS BIOQUÍMICOS DOS GRUPOS EM ESTUDO

A tabela 2 mostra os resultados obtidos para os parâmetros bioquímicos avaliados neste estudo.

TABELA 2 - PARÂMETROS BIOQUÍMICOS DOS GRUPOS DM1 E CONTROLE

| PARÂMETRO | CONTROLE (n = 168) | DM1 (n = 149) | P |
|----------------------------|-------------------------------|--------------------------|------------------|
| Glicemia em jejum (mg/dL) | 92,0 (85-98) | 259,0 (170-338) | <0,001 |
| HbA1c (%) | 5,2 (5,1-5,4) | 9,7 (8,7-11,1) | <0,001 |
| 1,5 anidroglicitol (µg/mL) | 29,9 (25,7-38,4) | 3,0 (1,9-4,9) | <0,001 |
| Albumina (g/dL) | 4,2 (4,0-4,6) | 4,2 (4,0-4,4) | 0,728 |
| Creatinina (mg/dL) | 0,55 (0,39-0,67) | 0,7 (0,70-0,80) | <0,001 |
| Ureia (mg/dL) | 22,0 (18-26) | 27,0 (22-31) | <0,001 |
| Microalbuminúria (mg/g) | - | 13,7 (8,3 – 26,6) | - |

Os resultados são apresentados como mediana (intervalo interquartil); *P*, probabilidade, teste U de Mann-Whitney; *P* <0,0001 (negrito) é considerado significativo.

FONTE: O autor, 2017.

5.2.1 Marcadores para controle glicêmico

Os valores dos parâmetros de glicemia em jejum, HbA1c e 1,5-AG foram significativamente superiores no grupo com DM1 em comparação ao grupo CTRL. Essa diferença estatística era esperada e confirma os critérios de seleção dos grupos, especialmente para o grupo CTRL, em que os valores da glicemia em jejum (92 mg/dL) e a Hb1Ac (5,2%) se enquadraram abaixo dos valores de corte, que caracterizam o DM. Já para o grupo DM1, o resultado para a glicemia em jejum foi significativamente maior (259mg/dL) corroborando para o diagnóstico de DM (ADA, 2017).

Ao avaliar o valor de HbA1C (9,7%) para o grupo DM1, também foi possível constatar que o controle glicêmico de longo prazo desses pacientes estava inadequado, ou seja, há 3 meses antes do exame, esses pacientes apresentaram controle glicêmico inadequado. Estes dados refletem a dificuldade dos pacientes DM1 na manutenção da normoglicemia. Em suma, mensurar a concentração de HbA1c é de extrema importância na avaliação do controle glicêmico (GREVEN et al., 2010; METHA et al., 2012).

Com relação ao controle glicêmico adequado, Campbell e colaboradores (2014), realizaram um estudo envolvendo 58 clínicas de atendimento à crianças e jovens com DM1 nos Estados Unidos, avaliando o controle glicêmico de 3.272 crianças e adolescentes, com faixa etária entre 6 e 17 anos. Os pacientes com

HbA1c <7,5% foram considerados com excelente controle e >9,0% com mau controle. A pesquisa mostrou que o número de crianças com mau controle foi 4,6 vezes maior em relação ao outro grupo (2.684 contra 588).

O grupo DM1 apresentou concentração estatisticamente menor de 1,5-AG (3,0 µg/mL) em relação ao grupo controle (29,9 µg/mL), indicando que o controle glicêmico de curto prazo desses pacientes não estava adequado. Portanto, provavelmente, os pacientes DM1 apresentaram picos hiperglicêmicos durante esse período, que sobrepuseram ao limiar renal, permitindo que a glicose, em alta concentração, fosse competitivamente reabsorvida através dos túbulos renais em relação ao 1,5-AG, que conseqüentemente passou a ser eliminado pela urina (YAMANOUCI et al., 1987; MEHTA et al., 2012).

Diante do exposto, o monitoramento glicêmico é de extrema importância no grupo de pacientes DM1, bem como fornece informações para que seja realizado o ajuste da terapia insulínica, melhorando a qualidade de vida e prevenindo tanto complicações agudas como crônicas (SBD, 2016).

5.2.2 Albumina

A dosagem de albumina não foi significativamente diferente ($p > 0,728$) entre os grupos, cujos os valores obtidos se encontram dentro do intervalo de referência (TABELA 2). A análise desse parâmetro permite afirmar que não há sinais de perda proteica ou deficiência nutricional nos grupos em estudo (SHIMADA, 2013).

5.2.3 Ureia, Creatinina e Microalbuminúria

No presente estudo, as concentrações de creatinina e ureia foram significativamente diferentes entre os grupos, sendo as concentrações destes analitos maiores no grupo com DM1 (TABELA 2). Porém, os valores apresentados no grupo DM1, encontram-se dentro do intervalo de referência, sugerindo que os indivíduos estudados não apresentam lesão renal manifesta. Este fato também pode ser sustentado pelo valor de microalbuminúria encontrado.

De acordo com o KDIGO (Sociedade Internacional de Nefrologia, 2017), a albuminúria pode ser dividida em três categorias normal (<30 mg/g), moderada (30 a

300 mg/g) e severa (>300 mg/g), sendo estes prognósticos para a doença renal crônica.

5.3 GENOTIPAGEM DOS POLIMORFISMOS COM SONDAS FLUORESCENTES

Os dois polimorfismos em estudo se encontram no equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE; $P > 0,05$). O princípio de H-W, define a relação entre as frequências de alelos e contagens de genótipos em gerações sucessivas e, prevê em uma população de tamanho infinito que estas frequências sejam constantes em uma geração para a outra sem fatores de desequilíbrio, tais como casamentos consanguíneos, estratificação populacional e até problemas relacionados a erros de genotipagem (NAMIPASHAKI, RAZAGHI-MOGHADAM e ANSARI-POUR, 2015).

5.3.1 Polimorfismo rs1056534 do gene *FN3K*

As frequências genotípicas e alélicas para o polimorfismo rs1056534 do gene *FN3K* e as comparações entre os grupos são apresentadas na Tabela 3.

TABELA 3 - FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS DO POLIMORFISMO rs1056534 DO GENE *FN3K* NA AMOSTRA EM ESTUDO

| POLIMORFISMO | GENÓTIPOS | CONTROLE N=168 | DM1 N=149 | P |
|---------------------------------|---------------------|-------------------|------------------|-------|
| rs1056534 | G/G | 63 (37,5%) | 65 (43,6%) | 0,483 |
| G>C | G/C | 77 (45,8%) | 59 (39,6%) | |
| FN3K | C/C | 28 (16,7%) | 25 (16,8%) | |
| H-W | - | 0,589 | 0,074 | - |
| Frequência do Alelo [95% IC] | C-alelo [95% CI] | 39,6% [34-45] | 36,6% [31-42] | 0,437 |
| Dominante | *GG vs. GC+CC | 63/105 | 65/84 | 0,267 |
| Recessivo | **CC vs. GG+GC | 28/140 | 25/124 | 0,979 |

Genótipos descritos em n (%); 95% IC: Intervalo de confiança de 95%; P: probabilidade, teste de χ^2 Chi-quadrado. H-W: Equilíbrio de Hardy-Weinberg (teste de χ^2). SNP rs105653; * modelo dominante; ** modelo recessivo

FONTE: O autor, 2017.

Não houve diferença estatística significativa na distribuição genotípica ($P=0,483$) ou alélica ($P=0,437$), determinando que o polimorfismo rs1056534 do gene *FN3K* não está associado ao DM1 na amostra em estudo, em concordância

com outros estudos que envolveram pacientes com a doença (ŠKRHA et al., 2014; MOSCA et al., 2011) (TABELA 4).

Em um estudo realizado com pacientes DM2 e controles em uma população húngara, os autores relataram uma associação entre o polimorfismo rs1056534 com valores menores de HbA1c e início tardio do DM2. Os genótipos não apresentaram diferença significativa nas frequências entre os grupos, mas pacientes DM2 com genótipo CC apresentaram valores de Hb1AC ($6,48 \pm 0,05\%$) significativamente menores em relação às variantes CG ($7,66 \pm 0,09\%$) e GG ($7,68 \pm 0,09\%$) (MOHÁS et al., 2010).

As diferenças nas frequências genótípicas e alélicas para o rs1056534 também não foram detectadas entre indivíduos DM1, DM2 e indivíduos sem Diabetes na cidade de Praga (ŠKRHA et al., 2014). No entanto, esses mesmos pacientes DM1 e DM2 com genótipo GG, CG foram associados com um significativo decréscimo na concentração plasmática dos receptores solúveis de AGEs (sRAGE) em comparação com o genótipo CC (GG: 1055 ± 458 e CG: 983 ± 363 vs. CC: 1796 ± 987 ng/L, $p < 0.0001$) (ŠKRHA et al., 2014). Elevadas concentrações de sRAGE podem indicar um fator de proteção contra o estresse oxidativo promovido pelos AGEs, uma vez que esses são removidos da circulação pelos receptores solúveis (TANHÄUSEROVÁ et al., 2014).

A TABELA 4 apresenta as comparações das frequências genótípicas e alélicas para o polimorfismo rs1056534 em outras populações.

TABELA 4 - FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS DO POLIMORFISMO rs1056534 DO GENE *FN3K* COM DADOS DA LITERATURA

| GRUPO ÉTNICO | <i>FN3K</i> rs1056534 CARACTERÍSTICAS | Genótipo (%) | | | | Alelo-c (%) |
|--|---|--------------|------|------|------|-------------|
| | | N | G/G | G/C | CC | |
| Euro-brasileiros (Presente estudo) | DM1 | 149 | 43,6 | 39,6 | 16,8 | 36,6 |
| | Controle | 168 | 37,5 | 45,8 | 16,7 | 39,6 |
| Africanos Subsaarianos (CIKOMOLA et al., 2016) | DM2 | 210 | 41,4 | 48,6 | 10,0 | 34,3 |
| | Controle | 125 | 56,8 | 35,2 | 8,0 | 25,6 |
| Húngaro (MOHÁS et al., 2010) | DM2 | 859 | 41,0 | 54,0 | 5,0 | 33,0 |
| | Controle | 265 | 43,0 | 51,0 | 6,0 | 30,5 |
| Caucasianos Praga (ŠKRHA et al., 2014) | DM1 | 129 | 44,0 | 41,0 | 15,0 | 36,0 |
| | DM2 | 340 | 44,0 | 43,0 | 13,0 | 34,0 |
| | Controle | 126 | 41,0 | 39,0 | 20,0 | 40,0 |
| Caucasianos (Morávia do Sul) (TANHÄUSEROVÁ et al., 2014) | DM2 | 314 | - | - | - | 41,0 |
| Italianos (MOSCA et al., 2011) | DM1 | 35 | 31,4 | 60,0 | 8,6 | 38,6 |
| | DM2 | 35 | 31,4 | 54,3 | 14,3 | 41,4 |
| | Controles | 33 | 39,4 | 51,5 | 9,1 | 34,8 |

Destacadas em negrito as frequências para o alelo menos frequente (C) que são diferentes do Intervalo de Confiança (95%) obtido para este estudo; DM1: Diabetes *mellitus* tipo 1; DM2: Diabetes *mellitus* tipo 2; -: dados não disponíveis.

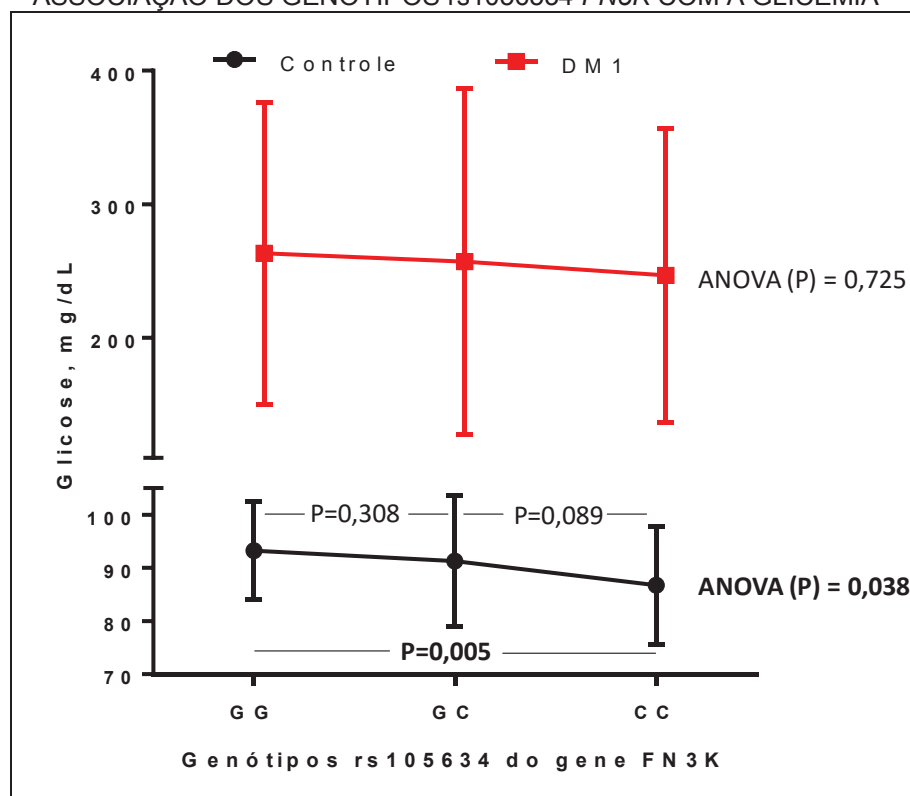
FONTE: O autor, 2017.

A frequência do alelo raro “C” para o grupo CRTL (39,6%; 95IC, 34-45%) observada neste estudo é similar à descrita para por Škrha e colaboradores (2014) para caucasianos e, também é similar a frequência descrita por Mosca e colaboradores (2011) para população italiana. Para indivíduos com DM1, a frequência do alelo raro “C” (36,6% 95IC, 31-42%) também foi similar à frequência descrita por Škrha e colaboradores (2014) para caucasianos com DM1 e DM2 (36,0% e 34,0% respectivamente), italianos com DM1 e DM2 (38,6% e 41,4% respectivamente) (MOSCA et al 2011), bem como para pacientes africanos subsaarianos com DM2 (34,3%) (CIKOMOLA et al., 2016) e para pacientes húngaros com DM2 (33%) (MOHÁS et al., 2010).

Na busca de associação dos genótipos com as concentrações séricas de biomarcadores, através das análises de variância (ANOVA), apenas a glicemia

apresentou uma associação significativa com o genótipo CC. Para o grupo controle, os portadores do genótipo CC (menos frequente) comparados àqueles com genótipo GG, apresentaram uma redução na glicemia em cerca de 7% (86,7 mg/dL vs 93,3 mg/dL). Já no grupo DM1, esta associação não foi observada, provavelmente pela ampla variação observada, uma vez que estes pacientes utilizam insulina para o tratamento da doença, aumentando a dispersão dos resultados (FIGURA 11).

FIGURA 11 – ASSOCIAÇÃO DOS GENÓTIPOS rs1056534 *FN3K* COM A GLICEMIA



Os quadrados vermelhos e os círculos pretos representam as médias do grupo DM1 e grupo controle, respectivamente. As barras verticais representam 1-desvio padrão; Valores de P (teste t-Student) e análise de variância (ANOVA); Valores de P significativos destacados em negrito.

FONTE: O autor, 2017

O polimorfismo rs105634 tem sido associado com a concentração de Hb1Ac, mas não com valores de glicemia. Mohás e colaboradores (2010) constataram que pacientes DM2 com genótipo CC apresentaram valores de glicose menores em relação aos genótipos GC e GG, mas para o grupo controle, a mesma análise não foi realizada devido à não determinação da Hb1Ac. No presente estudo, não houve associação da Hb1Ac com os genótipos para os grupos DM1 e controle. Mais estudos serão necessários para explicar a redução da glicemia em pacientes portadores da homozigose CC.

5.3.2. Polimorfismo rs7072268 do gene *HK1*

A TABELA 5, mostra os resultados das genotipagens do polimorfismo rs7072268 do gene *HK1* para os grupos controle e DM1.

TABELA 5 - FREQUÊNCIAS GENOTÍPICA E ALÉLICA DO POLIMORFISMO rs7072268 DO GENE *HK1* NA AMOSTRA EM ESTUDO

| POLIMORFISMO | GENÓTIPOS | CONTROLE N=168 | DM1 N=149 | P |
|---------------------|-------------------|-------------------|--------------|-------|
| rs7072268 | C/C | 34 (20,2%) | 37 (24,8%) | |
| C>T | C/T | 95 (56,6%) | 81 (54,4%) | 0,602 |
| HK1 | T/T | 39 (23,2%) | 31 (20,8%) | |
| H-W | - | 0,087 | 0,277 | - |
| Frequência do Alelo | T-alelo | 51,5% | 48,0% | 0,379 |
| [95% IC] | [95% CI] | [46-57] | [42-54] | |
| Dominante | *CC vs. CT+TT | 34/134 | 37/112 | 0,328 |
| Recessivo | **TT vs. CC+CT | 39/129 | 31/118 | 0,606 |

Genótipos descritos em n (%); 95% IC: Intervalo de confiança de 95%; P: probabilidade, teste de χ^2 Chi-quadrado. H-W: Equilíbrio de Hardy-Weinberg (teste de χ^2). SNP rs7072268; * modelo dominante; ** modelo recessivo

FONTE: O autor, 2017.

Os grupos não apresentaram diferença estatística significativa na distribuição genotípica (P=0,602) ou alélica (P=0,379) (TABELA 5). Dessa forma, o polimorfismo rs7072268 do gene *HK1* não foi associado ao DM1 na amostra em estudo. Do mesmo modo, não foi encontrada nenhuma associação adicional com outros marcadores do controle glicêmico.

A frequência do alelo raro "T" para o rs7072268 foi 48,0% (IC95%, 46-57%) para o grupo controle. Esta frequência é similar à encontrada na literatura para europeus (50%) (BONNEFOND et al., 2009) e, distinta comparada a asiáticos (TABELA 6). Para o grupo DM1, a frequência do alelo raro "T" (51,5%) também é similar quando comparada com europeus (BONNEFOND et al., 2009), mas inferior em relação aos indivíduos de origem asiática (CHEN et al., 2013).

TABELA 6 - FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS DO POLIMORFISMO rs7072268 DO GENE HK1 COM DADOS DA LITERATURA

| GRUPO ÉTNICO | HK1 rs7072268 CARACTERÍSTICAS | N | GENÓTIPO(%) | | | Alelo-t (%) |
|---|-------------------------------------|--------------|-------------|--------|--------|----------------|
| | | | C/C | C/T | TT | |
| Euro-brasileiros (Presente estudo) | DM1 | 149 | 24,8 | 54,4 | 20,8 | 51,5 |
| | Controle | 168 | 19,6 | 57,1 | 23,3 | 48,0 |
| Dinamarqueses (GJESING, <i>et al.</i> , 2011) | DM2 | 3389 | 27,7 | 49,7 | 22,6 | |
| | Controle | 5604 | 27,6 | 49,2 | 23,2 | - |
| | Tolerantes a glicose | 4449 | 28,0 | 49,0 | 23,0 | |
| Europeu (BONNEFOND, <i>et al.</i> , 2009) | DM2 | 7447 | 24,0 | 50,0 | 26,0 | 51,0 |
| | Controle | 5380 | 25,0 | 50,0 | 25,0 | 50,0 |
| | Franceses D.E.S.I.R | 4590 | - | - | - | 49,0 |
| | Suíços adultos obesos | 2101 | - | - | - | 54,0 |
| | Haguenau | | | | | |
| | Crianças francesas obesas | 1455 1411 | - - | - - | - - | 52,0 49,0 |
| | Franceses Adultos obesos | 3850 | - | - | - | 51,0 |
| Asiáticos - não diabéticos (CHEN, <i>et al.</i> , 2013) | Chineses | 3353 | - | - | - | 76,0 |
| | Malaio | 3280 | - | - | - | 71,0 |
| | Índios asiáticos | 3400 | - | - | - | 43,0 |

Destacadas em negrito as frequências para o alelo menos frequente (C) que são diferentes do Intervalo de Confiança (95%); DM1: Diabetes *mellitus* tipo 1; DM2: Diabetes *mellitus* tipo 2; D.E.S.I.R *Insulin Resistance Syndrome*; -: dados não disponíveis
 FONTE: O autor, 2017.

Um estudo realizado com mais de 14.000 mulheres americanas, não diabéticas, evidenciou a associação entre maior concentração de HbA1c com o alelo T do polimorfismo rs7072268 nesta população (PARE *et al.*, 2008). Segundo os autores, a hipótese que pode sustentar este achado, seria a que este SNP afeta a concentração ou a atividade da hexoquinase nos eritrócitos. Alternativamente, a variação genética pode modular o metabolismo sistêmico da glicose, propondo assim que este resultado reflita uma predisposição ao desenvolvimento do DM.

Gjesing e colaboradores (2011) avaliaram, em um grupo de dinamarqueses não diabéticos, o impacto da presença do alelo T na HK1 sobre algumas variáveis metabólicas. Os resultados mostraram que o alelo T está associado com o aumento da HbA1c, bem como, com o aumento do colesterol total. Esta associação entre o

alelo T e aumento de HbA1c também foi detectada em outro estudo realizado com europeus não-diabéticos (BONNEFOND et al., 2009).

Neste estudo de Bonnefond e colaboradores (2009), foi proposto que *HK1* rs7072268 seria responsável pela promoção de um quadro anêmico, uma vez que está associado a concentração baixa de hemoglobina. Assim, a condição anêmica promovida por *HK1* rs7072268 ou o efeito que *HK1* rs7072268 exerce sobre o metabolismo da glicose nas hemácias, pode influenciar na concentração de HbA1c. Esses achados podem ter implicações para o diagnóstico de DM2 e o manejo clínico do paciente, pois a anemia é uma complicação freqüente do estado do Diabetes (BONNEFOND et al., 2009).

6 CONCLUSÕES

As frequências alélicas e genóticas do polimorfismo rs1056534 associado ao gene *FN3K* e do rs7072268 associado ao gene *HK1* não diferiram significativamente ($P < 0,05$) entre o grupo de indivíduos com DM1 e o grupo controle. Portanto, esses polimorfismos não foram associados como fatores de risco ou proteção para o Diabetes *mellitus* do tipo 1 na amostra de crianças e adolescentes do sul do Brasil, que participaram desse estudo. Estes resultados não são discrepantes quando comparados com outras populações caucasoides e europeias. Além disso, na análise de associação dos parâmetros bioquímicos com os genótipos de ambos os grupos, somente no grupo controle, os portadores do genótipo CC (menos frequente) da *FN3K* comparados àquele com genótipos GC, apresentaram uma redução estatística significativa na glicemia em cerca de 7% (86,7 mg/dL vs 93,3 mg/DI). Diante dos resultados apresentados e da análise comparativa feita frente a literatura científica, os polimorfismos associados aos genes *FN3K* e *HK1* não estão associados diretamente com o diagnóstico do DM1. No entanto, mais estudos são necessários para compreender a relação desses polimorfismos com o desenvolvimento do DM.

7 REFERÊNCIAS

ABBASI, F.; et al. PTPN22 Single-Nucleotide Polymorphisms in Iranian Patients with Type 1 Diabetes *Mellitus*. **Immunological Investigations**. p.1-11. 2017.

ADA. Diagnosis and classification of Diabetes *mellitus*. . **Diabetes Care**. v. n.1, p. 8-16. 2015.

ADA. Classification and Diagnosis of Diabetes. **American Diabetes Association**. v. p. 11. 2017.

ADA. Standards of Medical Care in Diabetesd2017. **Diabetes Care**. v. 40, n.1, p. 142. 2017.

ADAIR, T.; RAO, C. Changes in certification of Diabetes with cardiovascular diseases increased reported Diabetes mortality in Australia and the United States. **Journal of Clinical Epidemiology**. v. 63, p. 199-204. 2010.

AL-LAHHAM, Y.; et al. Interleukin-18 (Rs187238) and glucose transporter 4 (rs5435) polymorphisms in Euro-Brazilians with type 1 Diabetes. **Genetics and Molecular Research**, v. 16, n. 3, p. 1-7. 2018.

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

ATKINSON, M. A. The Pathogenesis and Natural History of Type 1 Diabetes. **Cold Spring Harb Perspect Med**. v. 2, n. 11, p. 1-18. 2014.

BECKER, R. H.; et al. Insulin glulisine, a new rapid-acting insulin analogue, displays a rapid time-action profile in obese non-diabetic subjects. **Exp Clin Endocrinol Diabetes**. v. 113, n. 8, p. 435-443. 2005.

BERG, J. M. TYMOCZKO, J. L.; STRYER, L. Biochemistry. 5th edition. New York: W H Freeman. 2002.

BERHAN, Y.; et al. Swedish Childhood Diabetes Study Group. Thirty years of prospective nationwide incidence of childhood type 1 Diabetes: the accelerating increase by time tends to level off in Sweden. **Diabetes**. v. 60, p. 577–581. 2011.

BIANCH, M. B. ; et al. Molecular bases of hexokinase deficiency. **Biochimica et Biophysica Acta**. p. 211-221. 1997.

BRASIL. Portaria nº 2.583, de 10 de outubro de 2007. Define elenco de medicamentos e insumos disponibilizados pelo Sistema Único de Saúde, nos termos

da Lei nº 11.347, de 2006, aos usuários portadores de Diabetes *mellitus*. **Ministério da Saúde**, Brasília/DF, 2007.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Caderno de Atenção Básica: Estratégias para o cuidado da pessoa com Doença Crônica, Diabetes *Mellitus*. **Ministério da Saúde**, Brasília, n. 36. 2013.

BONIFACIO, E.; ZIEGLER, A. G. Advances in the prediction and natural history of type 1 Diabetes. **Endocrinol Metab Clin North Am**. v. 39, p. 513–525. 2013.

BONNEFOND, A. et al., Genetic variant in HK1 is associated with a proanemic state and A1C but not other glycemic control-related traits. **Diabetes**, v. 58, n. 11, p. 2687-2697. 2009.

BORITZA, K. C. 1,5 Anidroglicitol e controle glicêmico em pacientes com Diabetes *mellitus* tipo 1, tipo 2 e gestacional. 140 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Paraná, UFPR – Curitiba/PR, 2012.

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

BUSE, J. B.; et al. Serum 1,5-anhydroglucitol (GlycoMark): a short-term glycemic marker. **Diabetes Technol Ther**, v. 5, n. 3, p. 355 – 363. 2003.

CHEN, P.; et al. A Study Assessing the Association of Glycated Hemoglobin A1C (HbA1C) Associated Variants with HbA1C, Chronic Kidney Disease and Diabetic Retinopathy in Populations of Asian Ancestry. **PLOS ONE**. v. 8, n. 11, p.1-11. 2013.

CHIANG, J. L.; et al. Type 1 Diabetes Through the Life Span: A Position Statement of the American Diabetes Association. **Diabetes Care**. v. 41, n. 2. p. 2034-2054. 2014.

CIKOMOLA, J. C.; et al. The association between fructosamine-3 kinase 900C/Gpolymorphism, transferrin polymorphism and human herpesvirus-8infection in diabetics living in South Kivu. **Acta Tropica**. v. 163, p. 14-19. 2016.

CONNER, J. R; BEISSWENGER, P. J.; SZWERGOLD, B. S. Some clues as to the regulation, expression, function, and distribution of fructosamine-3-kinase and fructosamine-3-kinase-related protein. **Ann N Y Acad Sci**. v. 1043, p. 824-836. 2005.

CRAIG, M. E.; HATTERSLEY, A.; DONAGHUE, K. C. Definition, epidemiology and classification of Diabetes in children and adolescents. **Pedriatric Diabetes**. v. 10, n. 12, p. 3-12. 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, p. 4-17. 2014.

DABELEA, D.; et al. Association of Type 1 Diabetes vs Type 2 Diabetes Diagnosed During Childhood and Adolescence With Complications During Teenage Years and Young Adulthood. **JAMA**. v. 317, n. 8, p. 825-835. 2017.

DELPIERRE, G.; et al. Identification, cloning, and heterologous expression of a mammalian fructosamine-3-kinase. **Diabetes**. v. 49, n. 10, p. 1627-1634. 2000

DELPIERRE, G.; et al. Fructosamine 3-kinase, an enzyme involved in on intracellular deglycation pathway in human erythrocytes. **Biochem J**. p. 801-808. 2002.

DELPIERRE, G.; et al. Variability in erythrocyte fructosamine 3-kinase activity in humans correlates with polymorphisms in the FN3K gene and impacts on haemoglobin glycation at specific sites. **Diabetes Metab**.v. 32, p. 31-39. 2006.

DEVENDRA, D.; LIU, E.; EISENBARTH, G. S. Clinical review: type 1 Diabetes – recent developments. **BMJ**. v. 328, p.750-754, 2004.

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

EISENBARTH, G. S.; CONNELLY, J.; SOELDNER, J. S. The "Natural" History of Type I Diabetes. 1987.

FOROUHI, N. G.; WAREHAM, N. J. Epidemiology of Diabetes. **Medicine (Abingdon)**. v. 42, n.12, p. 698-702. 2014.

FRAYLING, T. M.; COLHOUN, H.; FLOREZ, J. C. A genetic link between type 2 Diabetes and prostate cancer. **Diabetologia**. v. 57, p. 1757-1760. 2008.

ELEDRISI, M. S. et al. Overview of the diagnosis and management of diabetic ketoacidosis. **Am J Med Sci**. v. 331, n.5, p. 243-51. 2006.

FERNANDES, A. P. M.; et al., Fatores imunogenéticos associados ao Diabetes *mellitus* do tipo 1. **Rev Latino-am Enfermagem**. v. 13, n. 5, p. 743-749. 2005.

FERREIRA, S. R. G.; PITITTO, B. A. Capítulo 1: Aspectos epidemiológicos do Diabetes *Mellitus* e seu impacto no indivíduo e na sociedade. **Sociedade Brasileira de Diabetes**, E-book 2.0. Disponível em: <<http://www.Diabetes.org.br/ebook/component/k2/item/73-capitulo-1-aspectos->

epidemiologicos-do-Diabetes-mellitus-e-seu-impacto-no-individuo-e-na-sociedade>
Acesso em 20 de jul. 2016.

FLOREZ, J. C.; HIRSCHHORN, J.; ALTSHULER, D. The inherited basis of Diabetes *mellitus*: implications for the genetic analysis of complex traits. **Annu Rev Genomics Hum Genet.** v. 4, p. 257-91. 2003.

FREEDMAN, B. I. A critical evaluation of glycated protein parameters in advanced nephropathy: a matter of life or death: time to dispense with the hemoglobin A1C in end-stage kidney disease. **Diabetes Care.** v. 35, n.7, p. 1621-4. 2012.

GJESING, A. P.; et al. Studies of a genetic variant in HK1 in relation to quantitative metabolic traits and to the prevalence of type 2 Diabetes. **BMC Medical Genetics.** v. 12, p. 1-8, 2011.

GREVEN, W. L. Glycemic Variability in Inadequately Controlled Type 1 Diabetes and Type 2 Diabetes on Intensive Insulin Therapy: A Cross-Sectional, Observational Study. **Diabetes Technology & Therapeutics.** v, 12, n. 9, p. 695-699. 2010.

GULDEN, E.; WONG, F. S.; WEN, L. The gut microbiota and Type 1 Diabetes. **Clin Immunol.** v. 159, n.2, p. 143-53. 2015.

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

GOMES, L. C. intervalo de referência para 1,5 anidroglicitol e polimorfismos funcionais da região promotora do gene do receptor para produtos de glicação avançada (rage) em crianças e adolescentes portadoras de Diabetes *mellitus* tipo 1. 111f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Paraná – UFPR, Curitiba/PR, 2015.

HUANG, Y.; et al. IDF Diabetes Atlas estimates for the global Diabetes prevalence of of adults aged 18 to 99 years. Disponível em: <<https://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:Bt5PMmlaXDMJ:https://www.idf.org/component/attachments/%3Ftask%3Ddownload%26id%3D1261:huang-atlas-sp-ADA-2017+&cd=5&hl=pt-BR&ct=clnk&gl=br>> Acesso em 21 de dezembro de 2017.

HUGHES, J. W.; et al. Autoimmune diseases in children and adults with type 1 Diabetes from T1D exchange clinic registry. **J Clin Endocrinol Metab,** p. 1-7. 2016.

International Diabetes Federation (IDF), ATLAS – 7th Ed. 2015

International Diabetes Federation (IDF), ATLAS – 8th Ed. 2017

ILONEN, J.; et al. Environmental factors and primary prevention in type 1 Diabetes. **Pediatr Endocrinol Diabetes Metab**. v. 15, n.4, p. 227-32. 2009.

JAMES, D. E.; PIPER, R. C. Insulin resistance, Diabetes, and the insulin- regulated trafficking of GLUT-4. **J Cell Biol**. v. 126, n.5, p. 1123-6. 1994.

KADIGO - KDIGO 2017 Clinical Practice Guideline Update for the Diagnosis, Evaluation, Prevention, and Treatment of Chronic Kidney Disease–Mineral and Bone Disorder (CKD-MBD). v. 7, n. 1, p. 1-60. 2017.

KAPUSTIN, J. Latent autoimmune Diabetes in adults. **The Journal for nurses practitioners**, p. 682-687, 2008.

KAWASAKI, E.; ABIRU, N.; EGUCHI, K. Prevention of type 1 Diabetes: from the view point of beta cell damage. **Diabetes Res Clin Pract**. v. 66 Suppl 1, p. S27- 32. 2004.

KHARROUBI, A. T.; DARWISH, H. M. Diabetes *mellitus*: The epidemic of the century. World J. **Diabetes**. v.6, p. 850–867, 2015.

KILPATRICK, E. S. Hemoglobin A1c in the diagnosis and monitoring of Diabetes *mellitus*. **J Clin Pathol**. v. 61, p. 977-982. 2008.

KITABCHI, A. E. et al. Hyperglycemic crises in Diabetes. **Diabetes Care**. v. 27 Suppl 1, p. S94-102. 2004.

KLAFKE, A.; et al. Mortalidade por complicações agudas do Diabetes melito no Brasil, 2006-2010. **Epidemiol Serv Saúde**. v. 23, n.3, p. 455-462. 2014.

KOGA, M. 1,5-Anhydroglucitol and glycated albumin in glycemia. **Adv Clin Chem**. v. 64, p. 269-301. 2014.

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.

LIVINGSTONE, S. J.; et al. Estimated Life Expectancy in a Scottish Cohort With Type 1 Diabetes, 2008-2010. **JAMA**. v. 313, n. 1, p. 37-44. 2015.

LUDVIGSSON, J. Increasing incidence but decreasing awareness of type 1 Diabetes in Sweden. **Diabetes Care**. v. 40, n. 10. p. e143-e144. 2017.

MAAHS, D. M. et al. Epidemiology of type 1 Diabetes. **Endocrinol Metab Clin North Am**. v. 39, n.3, p. 481-97. 2010.

MALIK, F. S.; TAPLIN, C. E. Insulin therapy in children and adolescents with type 1 Diabetes. **Paediatr Drugs**. v.16, n. 2, p. 141-150, 2014.

MANUWALD, U.; et al. Incidence trends of type 1 Diabetes before and after the reunification in children up to 14 years of age in Saxony, Eastern Germany. **PLOS ONE**. p. 1-11. 2017.

MATHIEU, C.; GILLARD, P.; BENHALIMA, K. Insulin analogues in type 1 Diabetes *mellitus*: getting better all the time. **Nat Rev Endocrinol**. v. 13, n. 7, p. 385-399. 2017.

MEHTA, S.; et al. Evaluation of 1,5-anhydroglucitol, hemoglobin a1c, and glucose levels in youth and young adults with type 1 Diabetes and healthy controls. **Pediatric Diabetes**. v. 13, n. 3, p. 278-284. 2012.

MHOAS, M.; et al. A Polymorphism within the Fructosamine-3-kinase Gene is Associated with HbA 1c Levels and the Onset of Type 2 Diabetes *Mellitus*. **Exp Clin Endocrinol Diabetes**. v. 118, p. 209-212. 2010.

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

MOHÁS, M. et al. A polymorphism within the fructosamine-3-kinase gene is associated with HbA1c Levels and the onset of type 2 Diabetes *mellitus*. **Exp Clin Endocrinol Diabetes**. v. 118, n. 3, p. 209 – 212. 2010.

MOLTCHANOVA, E. V.; et al. Original article: epidemiology seasonal variation of diagnosis of type 1 Diabetes *mellitus* in children worldwide. **Diabetic Medicine**. v. 26, p. 673-678. 2009.

MONNIER, V. M.; SELL, D. R.; GENUTH, S. Glycation products as markers and predictors of the progression of diabetic complications. **Annals New York Academy of Sciences**. p. 567 – 581, 2005.

MOSCA, L.; et al. Genetic variability of the fructosamine 3-kinase gene in diabetic patients. **Clin Chem Lab Med**. v. 49, n. 5, p. 803–808. 2011.

NAMIPASHAKI, A.; RAZAGHI-MOGHADAM, Z.; ANSARI-POUR, N. The Essentiality of Reporting Hardy-Weinberg Equilibrium Calculations in Population-Based Genetic Association Studies. **Cell J**. v. 17, n.2, p. 187-92. 2015.

NELSON, D. L.; COX, M. M. Princípios de bioquímica de Lehninger. Porto Alegre: Artmed, 2011. 6. Ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.

NETTO, A. P.; et al. Update on glycated hemoglobin (HbA_{1c}) for assessment of glycemic control and the diagnosis of Diabetes: clinical and laboratory aspects. **J Brasil Patol Med Lab**. v. 45, n. 1 p. 31-48. 2009.

NEUMAIER, M.; et al. Fundamentals of quality assessment of molecular amplification methods in clinical diagnostics. **Clinical Chemistry**. v. 44, n. 1, p. 12-26. 1998.

NYENWE, E. A.; KITABCHI, A. E. The evolution of diabetic ketoacidosis: An update of its etiology, pathogenesis and management. **Metabolism-Clinical and Experimental**. v. 65, n.4, p. 507-21. 2016.

PARE, G.; et al. Novel Association of HK1 with Glycated Hemoglobin in a Non-Diabetic Population: A Genome-Wide Evaluation of 14,618 Participants in the Women's Genome Health Study. **PLoS Genetics**. v. 4, n. 12, p. 1-8. 2008.

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.

PATTERSON, C.C.; et al. Diabetes in the young - a global view and worldwide estimates of numbers of children with type 1 Diabetes. **Diabetes Res Clin Pract**. v. 103, n. 2, p. 161-175. 2014.

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

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

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, T. A.; HEINRICH, R.; RAPOPORT, S. M. The regulatory principles of glycolysis in erythrocytes in vivo and in vitro. A minimal comprehensive model describing steady states, quasi-steady states and time-dependent processes. **Biochem J**. v. 154, n. 12, p. 449-469. 1976.

REDONDO, M. J. et al. Concordance for islet autoimmunity among monozygotic twins. **N Engl J Med**. v. 359, n.26, p. 2849-50. 2008.

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

RENNERT, O. M.; FRANCIS, G. L. Update on the genetics and pathophysiology of type I Diabetes *mellitus*. **Pediatr Ann.** v. 28, n.9, p. 570-5. 1999.

REWERS M.; et al. Assessment and monitoring of glycemic control in children and adolescents with Diabetes. **Pediatr Diabetes.** v. 8, n.6, p. 408-418. 2007.

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

ROSE, K.; et al. Influence of the vitamin D plasma level and vitamin D-related genetic polymorphisms on the immune status of patients with type 1 Diabetes: a pilot study. **Clin Exp Immunol.** v. 171, n.2, p. 171-85. 2013.

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

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

SBD. Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes - Classificação Etiológica. **Sociedade Brasileira de Diabetes.** v. p. 2016.

SCHMID, H. New options in insulin therapy. **Jornal de Pediatria.** v. 83, n. 5, p. 146-154. 2007.

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

ŠKRHA, J. J. et al. Fructosamine 3-Kinase and Glyoxalase I Polymorphisms and Their Association With Soluble RAGE and Adhesion Molecules in Diabetes. **Physiological Research,** v. 63, n. 2, p. 283 – 291, 2014.

SORANZO, N. Genetic Determinants of Variability in Glycated Hemoglobin (HbA1c) in Humans: Review of Recent Progress and Prospects for Use in Diabetes Care. **Curr Diab Rep.** v. 11, p. 562–569.2011.

SPERLING, M. A. Aspects of the etiology, prediction, and prevention of insulin-dependent Diabetes *mellitus* in childhood. **Pediatr Clin North Am.** v. 44, n.2, p. 269-84. 1997.

STANKOV, K.; BENC, D.; DRASKOVIC, D. Genetic and epigenetic factors in etiology of Diabetes *mellitus* type 1. **Pediatrics.** v. 132, n.6, p. 1112-22. 2013.

SZWERGOLD, B. S.; HOWELL, S.; BEISSWENGER, P. J. **Human Fructosamine-3-Kinase** Purification, Sequencing, Substrate Specificity, and Evidence of Activity In Vivo. **Diabetes**. v. 50, p. 2139-2147. 2001.

TAILON-MILLER, P.; PIERNOT, E. E.; KWOK, P. Y. Efficient approach to unique single-nucleotide polymorphism Discovery. **Genome Research**. v. 9, p. 499-505. 1999.

TANHÄUSEROVÁ, V.; et al. Genetic variability in enzymes of metabolic pathways conferring protection against nonenzymatic glycation versus Diabetes-related morbidity and mortality. **Clin Chem Lab Med**. p.1-8. 2014.

TAVARES, N. A.; et al. Interleukin 18 (IL18) gene promoter polymorphisms are associated with type 1 Diabetes *mellitus* in Brazilian patients. **Cytokine**, v. 62, p. 286-289. 2013.

THROWER, S. L.; BINGLEY, P. J. Diabetes: Basic facts. **Medicine**, v.42, n.12, p. 682-686. 2014.

TORQUATO, M. T. C. G.; et al. Prevalence of Diabetes *mellitus* and impaired glucose tolerance in the urban population aged 30-69 years in Ribeirao Preto (São Paulo), Brazil. **Sao Paulo Med J**. v. 121, n. 6, p. 224-230. 2003.

TRIOLO, T. M.; et al., Additional autoimmune disease found in 33% of patient at type 1 Diabetes onset. **Diabetes Care**. v. 34, p. 1211-1213. 2011.

TUOMILEHTO, J. The emerging global epidemic of type 1 Diabetes. **Curr Diab Rep**. v. 13, p. 795–804, 2013.

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. 1-10. 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.

VOOGHT. K. M. K.; et al. First mutation in the red blood cell-specific promoter of hexokinase combined with a novel missense mutation causes hexokinase deficiency and mild chronic hemolysis. **Haematologica**. v, 94, n. 9, p.1203-1210. 2009.

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

WEINSTOCK, R. S. et al. Severe hypoglycemia and diabetic ketoacidosis in adults with type 1 Diabetes: results from the T1D Exchange clinic registry. **J Clin Endocrinol Metab.** v. 98, n.8, p. 3411-9. 2013.

WEISS, I. C. R. S. Variabilidade genética e biomarcadores associados ao Diabetes gestacional. 200 f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) Universidade Federal do Paraná – UFPR, Curitiba/PR, 2014.

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.

WILSON, J. E. Isozymes of mammalian hexokinase: structure, subcellular localization and metabolic function. **Journal of Experimental Biology.** v. 206, p. 2049-2057. 2003.

WHO. World Health Statistics 2016: monitoring health for the sustainable development goals. 2016.

YAMANOUCHI, T.; et al. Reduction and Recovery of Plasma 1,5-Anhydro-D-Glucitol Level in Diabetes *Mellitus*. **Diabetes.** v. 36, p. 709-715. 1987.

ZHOU, L. J.; TEDDER, T. F. Human blood dendritic cells selectively express CD83, a member of the immunoglobulin superfamily. **J Immunol.** v. 154, n.8, p. 3821-35. 1995.

ZIEGLER, A. G; et al. Seroconversion to multiple islet autoantibodies and risk of progression to Diabetes in children. **JAMA.** 309, p. 2473-2479. 2013.

ZIEMAN, S. J.; et al. Advanced glycation endproduct crosslink breaker (alagebrium) improves endothelial function in patients with isolated systolic hypertension. **J Hypertens** v.25, p. 577-583. 2007.

8 ANEXOS

ANEXO 1 – PARECER DO COMITE DE ETICA

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



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

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

Pesquisador: Fabiane Gomes de Moraes Rego

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 24676613.6.0000.0102

Instituição Proponente: Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas

Patrocinador Principal: Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 655.477

Data da Relatoria: 21/05/2014

Apresentação do Projeto:

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

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

Objetivo da Pesquisa:

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

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

Endereço: Rua Padre Camargo, 280

Bairro: 2º andar

CEP: 80.060-240

UF: PR

Município: CURITIBA

Telefone: (41)3360-7259

E-mail: cometica.saude@ufpr.br

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



Continuação do Parecer: 655.477

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

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

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

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

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

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

Recomendações:

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

Endereço: Rua Padre Camargo, 280

Bairro: 2º andar

CEP: 80.060-240

UF: PR

Município: CURITIBA

Telefone: (41)3360-7259

E-mail: cometica.saude@ufpr.br

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



Continuação do Parecer: 655.477

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

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

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

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

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

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

CURITIBA, 21 de Maio de 2014

Assinado por:
IDA CRISTINA GUBERT
(Coordenador)

Endereço: Rua Padre Camargo, 280

Bairro: 2º andar

CEP: 80.060-240

UF: PR Município: CURITIBA

Telefone: (41)3360-7259

E-mail: cometica.saude@ufpr.br

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

TERMO DE ASSENTIMENTO INFORMADO LIVRE E ESCLARECIDO

Adolescentes maiores de 12 anos e menores de 18 anos

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

Responsável: Fabiane Gomes de Moraes Rego (orientador)

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

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

O que significa assentimento?

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

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

Informação ao Paciente:

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Contato para dúvidas

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

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

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

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

DECLARAÇÃO DE ASSENTIMENTO DO PACIENTE:

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

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

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

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

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

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

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

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

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

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

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

| |
|---|
| 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> |
|--|

ANEXO 4 – QUESTIONÁRIO UTILIZADO PARA COLETA DE DADOS DOS PACIENTES

COLETA DE DADOS

Paciente nº _____

Registro HC: _____

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

ANEXO 5 – EXEMPLO DE DETECÇÃO DE POLIMORFISMOS POR PCR EM TEMPO REAL (rs1056534 do gene *FN3K*)

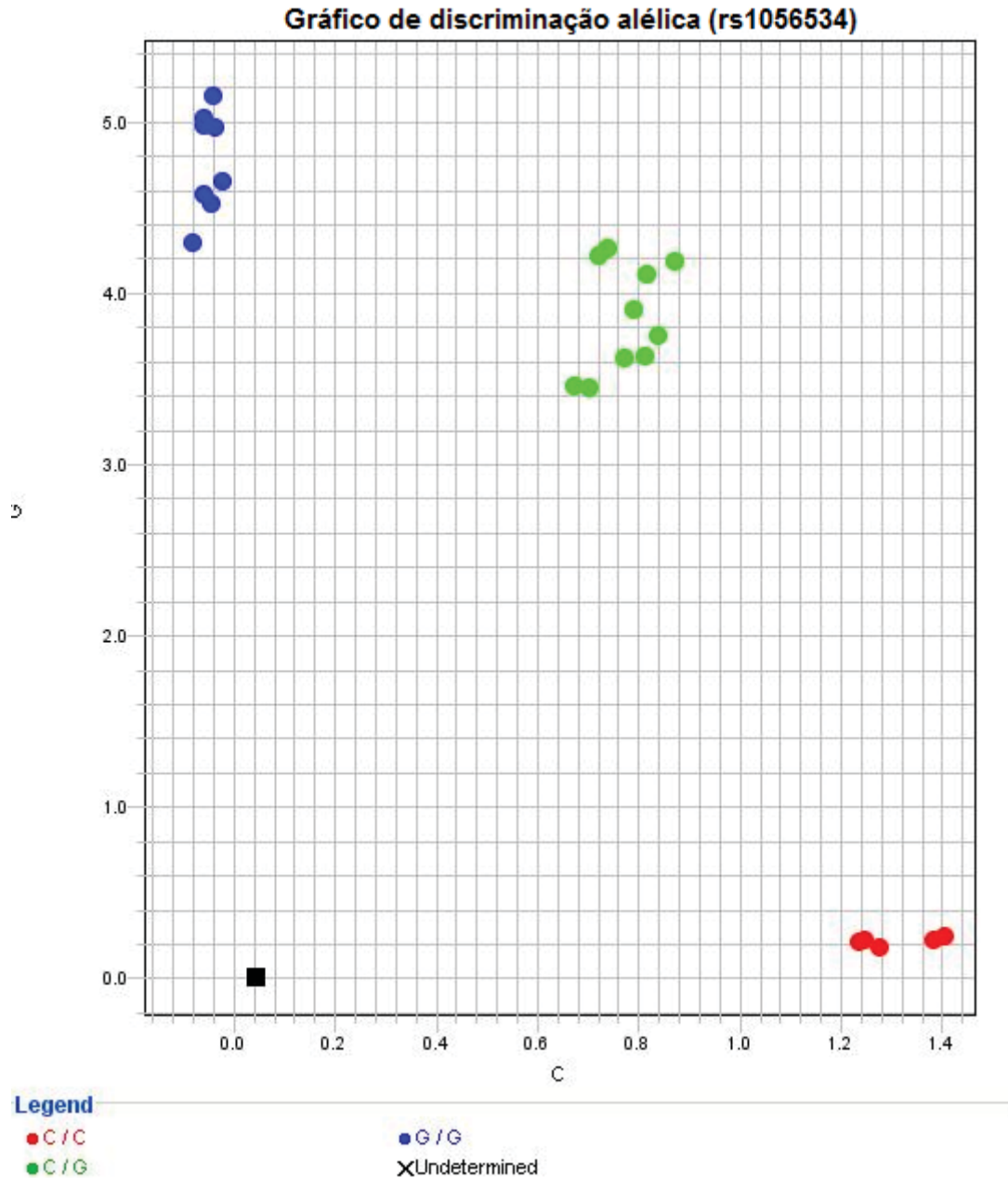


Gráfico de discriminação alélica SNP rs1056534. Em vermelho estão amostras homozigotas (genótipo C/C); em verde, amostras heterozigotas (genótipo C/G) e em azul, amostras homozigotas (genótipo G/G), em preto controle negativo.

ANEXO 6 – EXEMPLO DE DETECÇÃO DE POLIMORFISMOS POR PCR EM TEMPO REAL (rs7072268 do gene *HK1*)

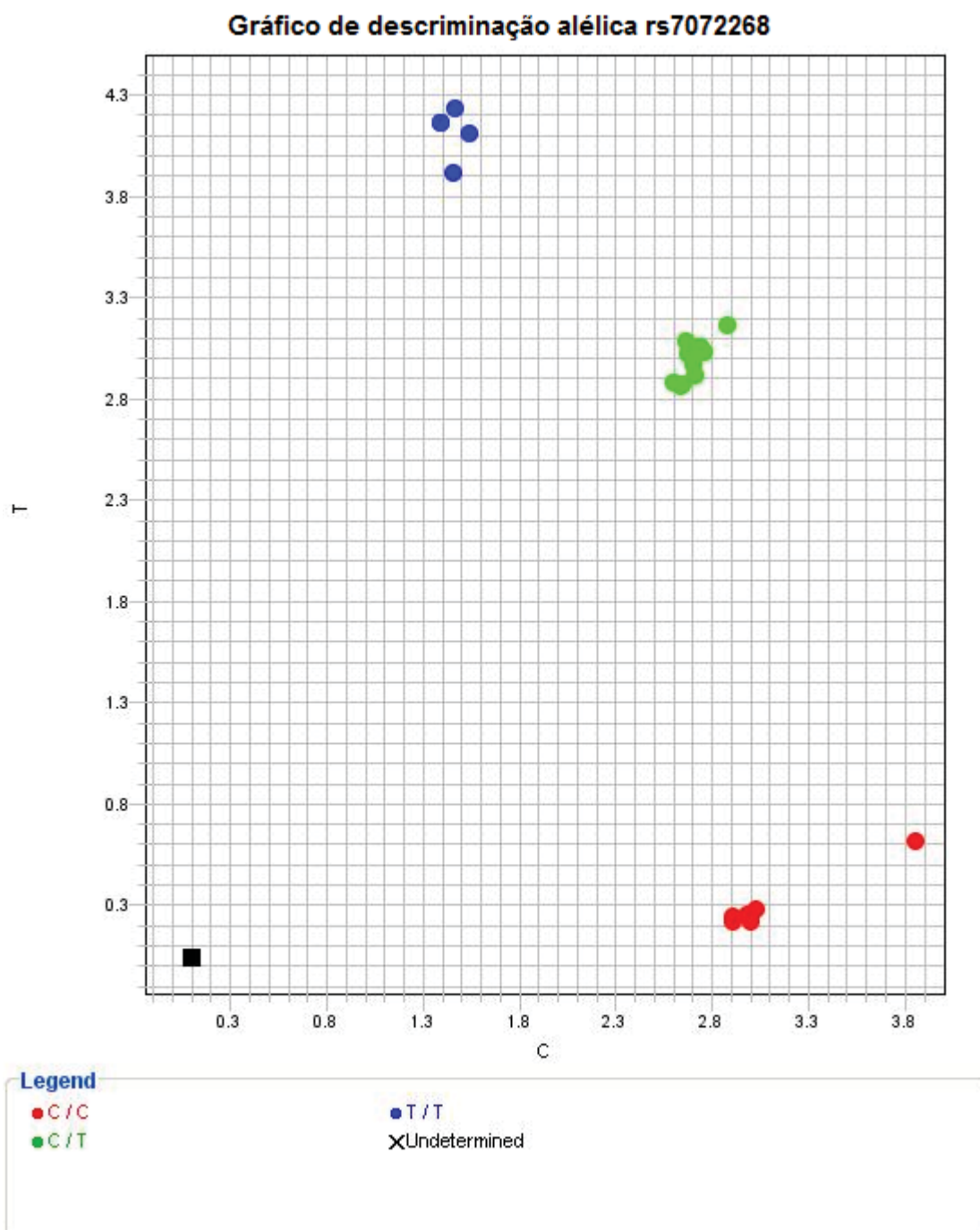


Gráfico de discriminação alélica SNP rs7072268. Em vermelho estão amostras homozigotas (genótipo CC); em verde, amostras heterozigotas (genótipo CT), e em azul, amostras homozigotas (genótipo TT), em preto controle negativo.