



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
PRÓ- REITORIA DE ENSINO DE PÓS-GRADUAÇÃO
CAMPUS MINISTRO REIS VELLOSO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

ALLAN TEIXEIRA SILVA

**ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO DOS POLIMORFISMOS *KCNJ11* Glu23Lys E
ABCC8 Ser1369Ala COM A SUSCETIBILIDADE AO *DIABETES MELITUS* TIPO
2 EM UMA POPULAÇÃO DO NORDESTE BRASILEIRO**

PARNAÍBA

2016

ALLAN TEIXEIRA SILVA

**ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO DOS POLIMORFISMOS *KCNJ11* Glu23Lys E *ABCC8*
Ser1369Ala COM A SUSCETIBILIDADE AO *DIABETES MELITUS* TIPO 2 EM
UMA POPULAÇÃO DO NORDESTE BRASILEIRO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia (PPGBiotec) da Universidade Federal do Piauí (UFPI), como requisito para a obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Área de Concentração: Biologia Molecular

Orientadora: Prof^a. Dr^a. France Keiko N Yoshioka

Parnaíba

2016

ALLAN TEIXEIRA SILVA

**ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO DOS POLIMORFISMOS *KCNJ11* Glu23Lys E *ABCC8*
Ser1369Ala COM A SUSCETIBILIDADE AO *DIABETES MELITUS* TIPO 2 EM
UMA POPULAÇÃO DO NORDESTE BRASILEIRO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia (PPGBIOTEC) da Universidade Federal do Piauí (UFPI), como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

APROVADA EM ___/___/___

BANCA EXAMINADORA:

Prof^ª. Dr^ª. France Keiko Nascimento Yoshioka
Universidade Federal do Piauí - *Campus* Ministro Reis Velloso
Presidente

Prof. Dr. Giovanny Rebouças Pinto
Universidade Federal do Piauí - *Campus* Ministro Reis Velloso
Membro interno

Prof^ª. Dr^ª. Renata Canalle
Universidade Federal do Piauí - *Campus* Ministro Reis Velloso
Membro interno

Dedico este trabalho à minha família, que sempre me apoiou e incentivou.

Agradecimentos

Agradeço a cima de tudo a Deus pela sabedoria, paciência, domínio próprio e força de vontade para concluir mais esta etapa.

A todos os professores que me ajudaram a construir o conhecimento necessário para alcançar este nível acadêmico. Desde os que me ensinaram as primeiras letras no jardim de infância até os professores doutores da graduação e mestrado (Jand, Durcilene, Gustavo, Anna Carolina, José Roberto, Reginaldo e aos demais). Em especial a minha orientadora, Prof.^a Dr.^a France Keiko Nascimento Yoshioka pela disponibilidade em tirar minhas dúvidas e dar conselhos, sempre de forma precisa e quase imediata, e ao amigo e Prof. Dr. Giovanni Rebouças Pinto pela extrema paciência e ajuda no desenvolvimento da escrita desse trabalho, sempre com ideias inteligentes e pertinentes que contribuíram para lapidar minha forma de escrever do jeito que só alguém com muita experiência e conhecimento poderia fazer.

Aos professores Dr. Daniel Fernando Pereira Vasconcelos e Dr.^a Renata Canalle pela participações em minha banca de qualificação e suas preciosas contribuições. Ao Prof. Dr. Fábio José Nascimento Mota e (mais uma vez) Dr. Giovanni Rebouças Pinto pela participação na banca de defesa desta dissertação.

Também agradeço a amiga, biomédica, mestre em biotecnologia, Hianny Ferreira Fernandes, pelo apoio, incentivo, dicas e compartilhamento de experiências que ajudaram na realização deste trabalho, tanto na parte prática, quanto teórica e nas dicas sobre os testes estatísticos utilizados. Seu trabalho de mestrado serviu como modelo e inspiração para o meu!

Ao amigo e companheiro de PCRs Jônatas de Santana Galvão Pinheiro, pela indescritível ajuda na realização das amplificações e genotipagens das amostras, mesmo quando dava contaminado e tínhamos que refazer tudo novamente (rsrs)! Se não fosse pela sua ajuda, creio que ainda hoje estaria fazendo PCRs!!!

Não poderia deixar de agradecer a todos os alunos de iniciação científica que dividiam o espaço do laboratório de genética e que, além de ajudarem sempre que precisava, deixavam o ambiente mais descontraído e agradável para se trabalhar: Tâmisa, Valéria, Cristina, Augusto (agora também mestrando!), Jéssica e Anderson.

Os também companheiros de laboratório e amigos mestrandos que sempre dividiam ideias e sugestões, sempre com o intuito de ajudar: Sara, Vânia, Vanessa, Valdenise, Teresa, Yasmine, Abdias, Raquel e Bruna. Aos demais amigos que dividiram o espaço da sala de aula: Tarcísio, Allane, Kaline, Thais, Thiago, Diêgo, Nara, Moara, Rayssa, Antônio Carlos, Rayele, Andreanne, Edmar, Nayara, Jéssica, Luan, Iara, Lucas...

Agradeço de forma muito especial e carinhosa à minha noiva Jacqueline, pela paciência, compreensão, incentivo e cuidados que teve por mim durante todo esse tempo (e ainda temos muitos anos pela frente, não é mesmo? Rrs). A minha sogra (e segunda mãe) Francisca pelo carinho e atenção sempre que precisei, pelo apoio e pelos deliciosos almoços!

Ao meu pai Lourenço Alves Teixeira e a minha mãe Maria Luísa, pelo cuidado de sempre, pelo apoio emocional e financeiro e por sempre me incentivarem a estudar e buscar ser honesto e responsável. Se fosse descrever todos os aspectos pelos quais tenho que agradecê-los essa dissertação se tornaria por demais volumosa e pesada! (rsrs).

Enfim a todos que fizeram parte dessa caminhada, meu sincero obrigado!

RESUMO

O *diabetes mellitus* (DM) é uma síndrome metabólica caracterizada pelo aumento da concentração de glicose no sangue, acompanhada de distúrbios metabólicos nas proteínas e ácido graxos. O diabetes tipo 2 (DM2) é consequência de uma interação complexa entre fatores genéticos, epigenéticos e ambientais. Embora os fatores ambientais pareçam ter um peso maior, os fatores genéticos têm ganhado notoriedade nos últimos tempos devido ao desenvolvimento de tecnologias de biologia molecular e estudos de associação. Polimorfismos dos genes *KCNJ11* e *ABCC8* já foram associados em diversas populações ao risco aumentado de desenvolver DM2. O objetivo deste estudo é avaliar a influência dos polimorfismos *KCNJ11* Glu23Lys e *ABCC8* Ser1369Ala, bem como seus haplótipos, no desenvolvimento do DM2 em uma população do nordeste brasileiro e suas relações com as variáveis clínicas e bioquímicas dos grupos caso e controle. Para compor o grupo de estudo foram coletadas amostras de sangue periférico de 235 pacientes não aparentados diagnosticados com DM2. Também foram coletadas 206 amostras de controles saudáveis provenientes de laboratórios de análises clínicas, sem condições associadas à doença, confirmado por exames clínicos e laboratoriais e sem história familiar de diabetes. Dados laboratoriais como HbA1c, glicemia em jejum, colesterol HDL, colesterol total e triglicerídeos, bem como o IMC foram coletados dos dois grupos. A análise dos polimorfismos foi realizada utilizando-se a técnica de PCR-RFLP. As frequências genótípicas de *KCNJ11* e *ABCC8* não diferiram significativamente entre os grupos caso e controle (*KCNJ11* $p=0,7863$ e *ABCC8* $p=0,2145$), bem como as frequências alélicas ($p=0,87$ e $p=0,75$; respectivamente). Em nenhum dos casos foi observada uma maior predisposição de desenvolver DM2 associada a qualquer dos genótipos ($p>0,05$). Os polimorfismos *KCNJ11* Glu23Lys e *ABCC8* Ser1369Ala apresentam um forte desequilíbrio de ligação ($D'=0,911$ e $r^2=0,779$). Nenhum dos haplótipos diferiu significativamente entre a população caso e controle ($p>0,05$). Verificou-se que os níveis colesterol total são mais baixos em controles que possuem duas cópias do alelo *KCNJ11* Lys23 ($p=0,0338$) e que esses indivíduos ainda possuem níveis de HbA1c mais elevados que portadores do genótipo selvagem *KCNJ11* Glu23 ($p=0,0091$). Os níveis de HbA1c foram consideravelmente mais elevados apenas em homozigotos *ABCC8* Ala1369 quando comparados a homozigotos *ABCC8* Ser1369. Pacientes com DM2 que possuem os genótipos *KCNJ11* Lys/Lys e *ABCC8* Ala/Ala e não fazem uso de insulina e sulfonilureias simultaneamente apresentam um IMC significativamente mais baixo que portadores dos genótipos *KCNJ11* Glu/Glu ($p=0,0003$) ou Glu/Lys ($p=0,0003$) e *ABCC8* Ser/Ser ($p=0,0151$) ou Ala/Ser ($p=0,0082$). Em suma, nosso estudo não apontou correlações significativas entre os polimorfismos *KCNJ11* Glu23Lys e *ABCC8* Ser1369Ala com uma suscetibilidade aumentada para o DM2. No entanto, as diferenças apresentadas por algumas das variáveis analisadas entre os diferentes genótipos sugerem que os polimorfismos abordados desempenham um papel importante no curso dessa doença.

Palavras-chave: Síndrome metabólica. canal K-ATP dependente. insulina. glicemia

ABSTRACT

Diabetes mellitus (DM) is a metabolic syndrome characterized by the increase of the concentration of glucose in the blood, accompanied by metabolic disorders in protein and fatty acid. Type 2 diabetes (T2D) is a result of a complex interaction between genetic, epigenetic and environmental factors. Although environmental factors appear to have a greater burden, genetic factors have gained notoriety in recent times due to the development of molecular biology technologies and association studies. *KCNJ11* gene and *ABCC8* polymorphisms have been associated in various populations at increased risk of developing T2D. The aim of this study is to evaluate the influence of polymorphisms *KCNJ11* Glu23Lys and *ABCC8* Ser1369Ala, as well as their haplotypes, in the development of DM2 in a population of northeastern Brazil and its relationship with clinical and biochemical variables of case and control groups. To compose the study group were collected samples of peripheral blood of 235 patients unrelated diagnosed with T2D. Were also collected samples of 206 healthy controls from laboratories of clinical analyses, without conditions attached to the disease, confirmed by clinical and laboratory examinations and no family history of T2D. Laboratory data as a HbA1c, fasting glucose, HDL cholesterol, total cholesterol and triglycerides, as well as the BMI were collected from the two groups. The analysis of polymorphisms was performed using PCR-RFLP technique. The genotype frequencies of *KCNJ11* and *ABCC8* did not differ significantly between the case and control groups (*KCNJ11* $p = 0.7863$ and *ABCC8* $p = 0.2145$) as well as the allele frequencies ($p = 0.87$ and $p = 0.75$, respectively). In any cases was observed a predisposition increase to develop DM2 associated with any of the genotypes ($p > 0.05$). Polymorphisms *KCNJ11* Glu23Lys and *ABCC8* Ser1369Ala present a strong linkage disequilibrium ($D = 0.911$ and $r^2 = 0.779$). None of the haplotypes differed significantly between the case and control populations ($p > 0.05$). It was found that total cholesterol levels are lower in controls that have two copies of the *KCNJ11* Lys23 allele ($p = 0.0338$) and that these individuals still have HbA1c levels higher than carriers of the wild *KCNJ11* Glu23 genotype ($p = 0.0091$). HbA1c levels were considerably higher in homozygotes *ABCC8* only Ala1369 when compared to the homozygous *ABCC8* Ser1369. Patients with T2D that have the genotypes *KCNJ11* Lys/Lys and *ABCC8* Ala/Ala and don't make use of insulin and sulfonilureias simultaneously present a significantly lower BMI than carriers of genotypes *KCNJ11* Glu/Glu ($p = 0.0003$) or Glu/Lys ($p = 0.0003$) and *ABCC8* Ser/Ser ($p = 0.0151$) or Ala/Ser ($p = 0.0082$). In sum, our study showed no significant correlation between polymorphisms *KCNJ11* Glu23Lys and *ABCC8* Ser1369Ala with an increased susceptibility to the T2D. However, the differences presented by some of the analyzed variables between different genotypes suggest that polymorphisms covered play an important role in the course of the disease.

Key words: Metabolic syndrome. K-ATP dependent channel. Insulin. Glycaemia.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

Figura 1: Número estimado de adultos entre (20 e 79 anos) vivendo com diabetes em 2015 (INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION, 2015).....	16
Figura 2: Subunidades Kir6.2 e SUR1 e seus domínios de ligação no meio intracelular. Adaptado de Sato et al. 2010.....	23

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2

Tabela 1: Variáveis clínicas e bioquímicas de portadores de DM2 e controles.	40
Tabela 2: Distribuição das frequências genótípicas e alélicas dos polimorfismos KCNJ11 Glu23Lys e ABCC8 Ser1369Ala nos grupos caso e controle.	44
Tabela 3: Frequência haplotípica dos polimorfismos KCNJ11 Glu23Lys e ABCC8 Ser1369Ala do grupo de pacientes e controles.....	45
Tabela 4: Características clínicas e bioquímicas dos diferentes genótipos dos polimorfismos KCNJ11 Glu23Lys e ABCC8 Ser1369Ala no grupo de pacientes e controles. Dados apresentados como média \pm erro padrão (SEM).....	46
Tabela 5: Características clínicas e bioquímicas dos diferentes genótipos do polimorfismo ABCC8 Ser1369Ala no grupo de pacientes e controles. Dados apresentados como média \pm erro padrão (SEM).....	46

LISTA DE ABREVIATURAS

A - Adenina

ABCC8 - *ATP binding cassette*, subfamília C, membro 8

ADP – Adenosina difosfato

Ala – Alanina

ANOVA – Análise de variância

ATP – Adenosina trifosfato

C - Citosina

Ca²⁺ - Íon Cálcio

DM2 – Diabetes *mellitus* tipo 2

DNA - *Deoxyribonucleic acid* (Ácido Desoxirribonucleico)

ESF – Estratégia de Saúde da Família

G - Guanina

Glu – Ácido glutâmico

GLUT – *Glucose transporter* (transportador de glicose)

GWAS – *Genome wide association studies* (Estudos de associação ampla do genoma)

HbA1c – Hemoglobina glicada

IMC – Índice de massa corporal

K⁺ - Íon Potássio

KCNJ11 - *Potassium inwardly-rectifying channel*, subfamília J, membro 11

Lys - Lisina

Mg⁺² – Íon Magnésio

mmol - Milimol

NBD – *Nucleotide binding domain* (Domínio de ligação de nucleotídeos)

NCBI - *National Center for Biotechnology Information* (Centro Nacional de Informação Biotecnológica)

OMS – Organização Mundial da Saúde

PCR – *Polymerase Chain Reaction* (Reação em cadeia da polimerase)

Pi – Fosfato inorgânico

PI – Estado do Piauí

RFLP – *Restriction Fragment Length Polymorphism* (Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos de Restrição)

Ser – Serina

SUR – *Sulphonylurea Receptor* (Receptor de Sulfonilureia)

T - Timina

TOTG – Teste oral de tolerância à glicose

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
CAPÍTULO 1	15
2 REFERENCIAL TEÓRICO	16
2.1 Aspectos epidemiológicos e fatores de risco do <i>diabetes mellitus</i>	16
2.2 Complicações do DM2	18
2.3 Tratamento do DM2	19
2.4 Relevância de fatores genéticos no desenvolvimento do DM2	20
2.5 Fisiologia das células β pancreáticas e o canal de potássio dependente de ATP ..	22
2.6 <i>KCNJ11</i> : a subunidade Kir6.2 e o polimorfismo Glu23Lys	25
2.7 <i>ABCC8</i> : a subunidade SUR1 e o polimorfismo Ser1369Ala	26
3 OBJETIVOS	28
3.1 Objetivo geral	28
3.2 Objetivos específicos	28
4 REFERÊNCIAS	29
CAPÍTULO 2	35
RESUMO	37
INTRODUÇÃO	38
MÉTODOS	40
Seleção dos pacientes, coleta de amostras e aspectos éticos	40
Extração, Amplificação e análise das regiões polimórficas	41
Análise estatística	42
RESULTADOS	44
Associação dos polimorfismos com o risco de DM2	44
Análise comparativa das frequências dos haplótipos	45
Associação dos polimorfismos com as variáveis de risco	45
DISCUSSÃO	47
Referencias	50

1 INTRODUÇÃO

O *diabetes mellitus* é uma síndrome metabólica caracterizada pelo aumento da concentração de glicose no sangue, acompanhada de distúrbios metabólicos nas proteínas e ácido graxos (DROUIN et al., 2009). Essa doença afeta mais de 415 milhões de pessoas de diversas idades ao redor do mundo (INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION, 2015). As causas que levam ao desenvolvimento dessa síndrome são diversas, estando entre elas fatores genéticos e ambientais (FOROUHI; WAREHAM, 2014).

Em alguns casos os fatores genéticos exercem grande influência e os sintomas surgem precocemente na vida do paciente (DELLA MANNA, 2007; SAITO-HAKODA et al., 2012). Em outras situações o surgimento dos sintomas ocorre tardiamente, já na idade adulta, apresentando uma forte correlação com casos de obesidade e tipo de dieta seguida pelo paciente (ALGOBLAN; ALALFI; KHAN, 2014; CHADT et al., 2000; EGGER; DIXON, 2014).

O diabetes pode ser classificado em duas formas distintas: tipo 1 e tipo 2. O tipo 1 ocorre quando a produção da insulina é insuficiente devido a destruição de células β do pâncreas, geralmente por reações autoimunes. Por outro lado, o tipo 2 é consequência da resistência à insulina, tendo como principais fatores predisponentes maus hábitos alimentares, sedentarismo e obesidade (GOLAN et al., 2012). A investigação do envolvimento dos fatores genéticos nessa doença tem alargado a fronteira para novos conhecimentos no tratamento e cuidados com pacientes portadores dessa condição (PRASAD; GROOP, 2015; SUN; YU; HU, 2014).

Diversos genes têm sido propostos como estando relacionados ao desenvolvimento de DM2 (LEBRÓN-ALDEA et al., 2015; QI; HU, 2012). Polimorfismos dos genes *KCNJ11* e *ABCC8* já foram associados em diversas populações ao risco aumentado de desenvolver DM2 devido a diminuição da sensibilidade do canal de potássio, expresso em células pancreáticas, à adenosina trifosfato (ATP), o que acaba por diminuir a secreção de insulina nessas células. No entanto, em algumas populações essa correlação não pode ser observada (KLEN; DOLŽAN; JANEŽ, 2014; QIN; LV; HUANG, 2013).

Diante do exposto, faz-se necessário investigar a influência de polimorfismos relacionados ao DM2 em outras populações. Portanto, o objetivo deste trabalho é

avaliar a associação dos polimorfismos *KCNJ11* Glu23Lys e *ABCC8* Ser1369Ala com a suscetibilidade ao DM2 em uma amostra da população do estado do Piauí, por meio da comparação da frequência desses polimorfismos e seus haplótipos entre um grupo de pacientes diabéticos e um grupo controle.

Este trabalho foi organizado em dois capítulos. No Capítulo 1 é apresentado o referencial teórico, com o objetivo de fornecer uma breve revisão sobre a epidemiologia e a genética do DM2. Em seguida, é descrito como funciona o canal de potássio nas células pancreáticas, o qual é composto por subunidades codificadas pelos genes *KCNJ11* e *ABCC8*, bem como a presença dos polimorfismos Glu23Lys e Ser1369Ala dos respectivos genes podem influenciar no desenvolvimento do DM2. Ao final deste capítulo, também estão os objetivos gerais e específicos desse estudo. No Capítulo 2, é apresentado o artigo em língua portuguesa, que será submetido à revista *Acta Diabetologica* (ISSN: 0940-5429, fator de impacto 2,399).

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Aspectos epidemiológicos e fatores de risco do *diabetes mellitus*

O DM é uma doença de alta prevalência em todo o mundo. Os dados da Federação Internacional do Diabetes estimam que cerca de 415 milhões de pessoa entre 20 e 79 anos sejam portadoras de DM, esperando-se um crescimento do número de casos, podendo chegar a 642 milhões em 2040. O Brasil é o quarto país no mundo com o maior número de casos, com uma estimativa de 14,3 milhões de adultos vivendo com essa doença (Figura 1) (INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION, 2015). Do total de casos, quase 90% refere-se ao tipo 2 (DM2). Estima-se que 80% das pessoas acometidas vivam em países pobres ou em desenvolvimento (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2014).

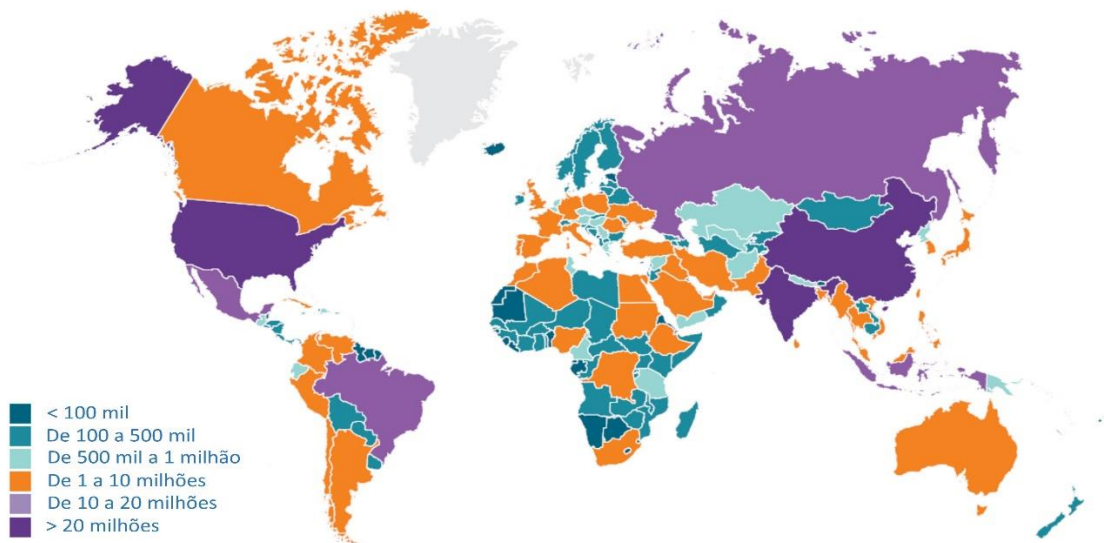


Figura 1: Número estimado de adultos entre 20 e 79 anos vivendo com diabetes em 2015 (INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION, 2015).

A ausência de um diagnóstico adequado tem contribuído para o aumento da morbidade e mortalidade dessa doença (BERTOLDI et al., 2013). Além disso, um enorme impacto econômico, psicossocial e físico acompanha pacientes, familiares e a sociedade como um todo. A carga econômica associada ao DM2 diz respeito aos

custos com serviços de saúde e também a custos indiretos, referentes à perda de produtividade do paciente portador de DM2 (ABDULLAH et al., 2014).

O diagnóstico de indivíduos diabéticos e pré-diabéticos no Brasil é feito com base nas diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes. O paciente que apresentar glicose em jejum ≥ 126 mg/dL em dois exames seguidos, ou glicemia casual ≥ 200 mg/dL será considerado como suspeito. A confirmação do diagnóstico se dá por meio do teste oral de tolerância à glicose (TOTG), que confirma como diabético aquele que permanecer com taxa de glicemia acima de 200 mg/dL após duas horas do início do teste. O paciente pré-diabético será aquele que apresentar glicose em jejum ≥ 100 mg/dL e < 126 mg/dL ou ≥ 140 mg/dL e < 200 mg/dL no TOTG (ALMEIDA-PITITTO et al., 2015; SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2014).

Diversos fatores contribuem para o desenvolvimento do DM2, sendo assim uma doença de etiologia complexa. Tais fatores podem ser de origem genética ou ambiental/comportamental. Entre os principais fatores evitáveis podemos citar a má alimentação, excesso de peso, fumo, álcool e sedentarismo. Além disso, outras circunstâncias como a ansiedade, sono inadequado, doenças hepáticas e até mesmo a quantidade inadequada de vitamina D, ou alterações em seu receptor predis põem ao surgimento do diabetes (EGGER; DIXON, 2014; QIU et al., 2014).

Atualmente, não encontramos discordância quanto à associação da obesidade com DM2 (CHADT et al., 2000; TORO et al., 2015). O mecanismo base que leva ao desenvolvimento do distúrbio metabólico é a diminuição da sensibilidade à insulina. Essa alteração pode ser notada em algumas etapas da vida, como na puberdade, gravidez e velhice (SEGULA, 2014). Qualquer pessoa que esteja obesa apresenta resistência à insulina; porém, só se tornará diabético se o nível de insulina produzida por esse indivíduo for insuficiente para compensar a resistência. Em alguns desses casos a produção de insulina é altíssima (ALGOBLAN; ALALFI; KHAN, 2014). A sensibilidade à insulina pode variar de um indivíduo para o outro devido a forma como a gordura corporal está distribuída. Indivíduos com distribuição mais periférica tem maior sensibilidade à insulina do que aqueles onde essa gordura se concentra em maior quantidade na região do abdômen e tórax (KARPE; DICKMANN; FRAYN, 2011).

O tecido adiposo exerce papel fundamental devido a sua importância metabólica na secreção de hormônios, glicerol, mediadores inflamatórios e ácidos

graxos não esterificados (ALGOBLAN; ALALFI; KHAN, 2014). Esse tecido apesar de ser formado na sua maioria por adipócitos, também abriga diversos tipos de células de defesa. O acúmulo de gordura leva a diversas mudanças na quantidade e função das células imunitárias desse tecido, aumentando umas e diminuindo outras. Essas alterações podem levar a quadros de inflamações locais ou sistêmicas e ao desenvolvimento de DM2 (DANDONA et al., 2003; MRAZ; HALUZIK, 2014).

Entretanto, estudos prospectivos apontam que cerca de 15 a 20% dos casos de diabetes ocorrem em pessoas com peso normal e IMC < 25 Kg/m². Essas pessoas não obesas que apresentam um risco aumentado para DM2, sendo também denominadas “pessoas metabolicamente obesas de peso normal” (HU, 2001; WANG, 2005). Um estudo comparando pacientes diabéticos não obesos com um grupo controle saudável constatou que o número de indivíduos que fumavam, hipertensos, sedentários e tinham uma maior circunferência abdominal era significativamente maior entre os diabéticos. Além disso, esses pacientes também apresentavam maior propensão a desenvolver doenças cardiovasculares (ECKEL et al., 2015).

Distúrbios relacionados ao sono exercem um impacto negativo na função de muitos hormônios regulados pelo ciclo circadiano, como o cortisol, hormônio do crescimento, leptina, melatonina e grelina. Existem mecanismos circadianos endógenos que regulam o metabolismo da glicose e dos lipídeos por meio da ação de genes “*CLOCK*”. Os hepatócitos têm grande importância nesse processo, sendo responsáveis pela síntese e degradação de glicogênio. Uma concentração mais elevada de glicose no sangue é necessária durante o dia, ao passo que durante o sono, a necessidade é menor (KIM; JEONG; HONG, 2015).

2.2 Complicações do DM2

A elevada taxa de glicose no sangue por um longo período promove diversos efeitos indesejados no organismo. Tal evidência foi comprovada por um estudo realizado em 1998 no Reino Unido, onde foi observado que um contínuo controle glicêmico diminui radicalmente complicações em longo prazo do DM2 (KING; PEACOCK; DONNELLY, 1999). No entanto, as complicações crônicas do DM parecem ser uma combinação da hiperglicemia, hiperlipidemia e aumento dos sinalizadores inflamatórios (GOLAN et al., 2012).

O controle glicêmico pode ser feito pela avaliação da glicose em jejum, testes rápidos de glicose ou pela dosagem de hemoglobina glicada (HbA1c). Os dois primeiros avaliam a glicemia de forma aguda, enquanto o segundo permite um acompanhamento crônico das concentrações de glicose (BERTOLDI et al., 2013).

Entre os principais fatores de morbidade associados ao diabetes estão a aterosclerose, retinopatia, nefropatia e neuropatia. A combinação de má circulação, neuropatia e dificuldade de cicatrização de feridas aumenta significativamente o risco de amputação de membros (ABDULLAH et al., 2014). Níveis elevados de lipoproteínas plasmáticas também estão associados com o alto risco de desenvolvimento de complicações macro e microvasculares, além de nefropatias em pacientes diabéticos (JUNG et al., 2014; TORO et al., 2015).

Além dos fatores já citados, o DM2 tem se mostrado um fator de risco para o desenvolvimento de doenças cognitivas e demências. Parte dessas doenças está relacionada a consequências de eventos vasculares. Entretanto, há evidências que apontam uma correlação positiva entre a resistência à insulina e o desenvolvimento da doença de Alzheimer (UMEGAKI, 2014).

A importância do controle da glicemia em longo prazo extrapola os benefícios pessoais para o indivíduo e reflete nos fatores econômicos. Levantamentos indicam que cerca de 40 a 60% dos gastos de pacientes diabéticos estão relacionados a tratamentos dessas complicações, onde apenas 18% equivalem ao montante destinado a medicamentos hipoglicemiantes (LIEBL et al., 2015).

2.3 Tratamento do DM2

As estratégias usadas para tratar pacientes diabéticos incluem, por exemplo, mudança de hábitos alimentares, exercícios e a intervenção farmacológica. Alguns pacientes alcançam níveis desejados de glicose sem tratamento medicamentoso, porém em alguns casos é necessário recorrer a alguns fármacos (EVANS; BAHNG, 2000; LEY et al., 2014; LIEBL et al., 2015; WOLFFENBUTTEL; GRAAL, 1996). O tratamento farmacológico do DM visa diminuir os níveis sanguíneos de glicose para evitar complicações futuras. Tal ação deve ser equilibrada ao ponto de manter a normoglicemia, mas também evitar possíveis quadros de hipoglicemia (ONGE et al., 2015; SINGH; SINGH, 2015).

Existem diversos tipos de fármacos de administração oral com diversos tipos de ações que tem por finalidade diminuir os níveis de glicose circulante. Esses podem agir na absorção da glicose, diminuindo a velocidade por inibição da α -glicosidase, aumentar a secreção de insulina a partir de células β pancreáticas ou diminuir a resistência à insulina em tecidos periféricos (MARTIN et al., 2013; SEMIZ; DUJIC; CAUSEVIC, 2013).

As sulfonilureias fazem parte de um grupo de medicamentos conhecidos como secretagogos de insulina, um dos principais tipos de medicamentos utilizados para combater a hiperglicemia em pacientes portadores de DM2. Terapias a base de sulfonilureias foram estabelecidas desde 1955 (ENGLER; YELLON, 1996; SAGREIRA, 1989). A administração desse tipo de fármaco apresenta um bom nível de segurança, produzindo poucos efeitos adversos. Porém, o principal efeito adverso observado em pacientes que fazem uso de sulfonilureias é a hipoglicemia advinda do excesso de insulina secretada. Por essa razão, pessoas que são sensíveis a episódios de hipoglicemia, como idosos ou portadores de alterações no estado mental, devem evitar esses tipos de medicamentos (BOGLOU et al., 2013; HIRST et al., 2013; SIGNOROVITCH et al., 2013). Outro ponto a ser considerado é o ganho de peso em consequência do tratamento, o qual pode gerar uma complicação para pacientes que já são obesos. Por isso, o uso de sulfonilureias é ideal para pacientes diabéticos não-obesos (MCINTOSH et al., 2012; NAIDOO et al., 2014).

2.4 Relevância de fatores genéticos no desenvolvimento do DM2

O DM2 é consequência de uma interação complexa entre fatores genéticos, epigenéticos e ambientais. Embora os fatores ambientais pareçam ter um peso maior, os fatores genéticos têm ganhado notoriedade nos últimos tempos devido a estudos de associação (LEY et al., 2014; PRASAD; GROOP, 2015).

Um estudo realizado em 1976 pelo *National Health Interview Survey*, nos Estados Unidos, sugeriu haver uma correlação significativa entre etnia e o diabetes. Inicialmente imaginou-se que pessoas com massa corporal equivalente teriam o mesmo grau de suscetibilidade à doença independente de sua etnia. Esse estudo apontou haver um maior acometimento em pessoas negras em comparação a

brancos. No entanto, para os pesquisadores não ficou claro se essa diferença estava relacionada a fatores genéticos ou a outros fatores (BONHAM; BROCK, 1985).

Embora fatores ambientais seja sabidamente relevante para o desenvolvimento do DM2, ainda na década de 80 foi observado que pessoas não-obesas que tinham parentes de primeiro grau afetados pelo DM2 apresentavam um risco dez vezes maior de também desenvolver a doença quando comparados com pessoas obesas sem histórico familiar da doença (MATSUDA; KUZUYA, 1984).

Uma maior concordância entre gêmeos monozigóticos, cerca de 70%, em comparação com gêmeos dizigóticos, em torno de 20 a 30% para desenvolver DM2, evidencia a força do componente genético nessa patologia (QI; HU, 2012). Há ainda o fato de que pessoas que tem pelo menos um parente de primeiro grau afetado apresentam um risco de 5 a 10 vezes maior de desenvolver DM do que indivíduos de mesma idade e peso sem histórico familiar da doença (RACITI et al., 2015).

Ao longo dos anos, diversos tipos de estudos tentaram identificar os genes envolvidos no DM2. A abordagem de genes candidatos conseguiu identificar apenas quatro *loci* relacionados em duas décadas. Embora muitos candidatos tenham sido propostos, poucos conseguiram ser replicados. Os polimorfismos Pro12Ala (rs1801282) do gene *PPAR γ* e Glu23Lys (rs5219) do gene *KCNJ11* foram os primeiros a serem reproduzidos em estudos mais robustos. Em contrapartida, desde o ano de 2007, com o advento de estudos de associação ampla do genoma (GWAS, do inglês *genome-wide association studies*), rapidamente foram identificados diversos outros *loci* relacionados à suscetibilidade ao DM2 (LEBRÓN-ALDEA et al., 2015; QI; HU, 2012)).

Até o momento, 74 *loci* identificados apresentam forte associação com a suscetibilidade ao desenvolvimento do DM2, dos quais 45 foram detectados em populações europeias e 29 em populações asiáticas. Estudos recentes envolvendo populações africanas e americanas podem elevar essa estimativa para mais de 100 *loci* associados ao DM2 (ADEYEMO et al., 2015; MORRIS et al., 2012; NG et al., 2013; SUN; YU; HU, 2014). Esses estudos geralmente apresentam diferentes resultados para diferentes populações, dependendo de sua ancestralidade, ou mesmo de fatores culturais e comportamentais (ODGEREL et al., 2012).

Estudos de associação baseados em haplótipos são considerados mais confiáveis que estudo de marcadores isolados. O termo haplótipo se refere ao

conjunto de alelos de genes adjacentes, presentes no mesmo cromossomo que podem ser herdados juntos. Quando o haplótipo de cada indivíduo é conhecido eles podem ser considerados como um único marcador multi-alélico e analisados por métodos baseados em marcadores simples (LIU; ZHANG; ZHAO, 2008). A associação não aleatória de um conjunto de alelos de diferentes *loci* é denominada desequilíbrio de ligação; ou seja, podemos dizer que dois *loci* genéticos estão ligados, se eles são transmitidos conjunto de pais para filhos com mais frequência do que o esperado sob a herança independente (DAWN TEARE; BARRETT, 2005; NORDBORG; TAVARÉ, 2002).

Haplótipos formados por variantes dos genes *KCNJ11* e *ABCC8* são bem estabelecidos como fatores de risco para DM2 em populações caucasianas; no entanto, o forte desequilíbrio de ligação entre esses genes estende a possibilidade de que outras variantes nesses e até em outros genes possam contribuir para as associações observadas (SAKAMOTO et al., 2007; SOKOLOVA et al., 2015)

2.5 Fisiologia das células β pancreáticas e o canal de potássio dependente de ATP

As células β do pâncreas são responsáveis por produzir e secretar o hormônio insulina, o qual é armazenado em vesículas dentro das células. No estado pós-prandial a glicose cai na corrente sanguínea e é levada até o pâncreas. As células pancreáticas expressam em sua superfície um transportador proteico, denominado GLUT2 responsável por facilitar a entrada da glicose dentro da célula. A glicose migra para o interior da célula seguindo seu gradiente de concentração. Após sua entrada na célula inicia-se o processo de glicólise e consequente produção de ATP (HEIMBERG et al., 1993; KAPOOR et al., 2011).

Células β pancreáticas também possuem em sua superfície um tipo específico de canal iônico formado por oito subunidades proteicas, sendo quatro do tipo Kir6.2 e quatro SUR1. Cada uma dessas subunidades possui sítios de ligação na região citoplasmática, que são alvos de ligantes fisiológicos e drogas (Figura 2). Esse canal geralmente está aberto e permite um efluxo de K^+ , causando assim uma hiperpolarização da célula. Entretanto, tal canal apresenta uma sensibilidade aos níveis de ATP e ADP dentro da célula (GONEN et al., 2012; SATO et al., 2010).

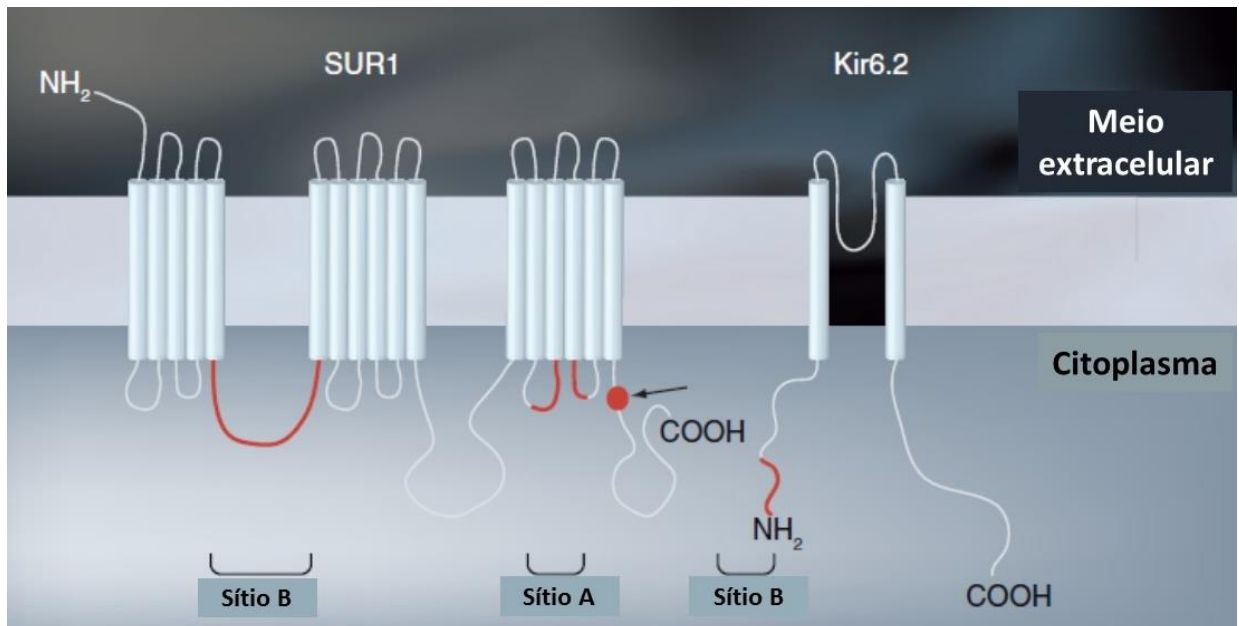


Figura 2: Subunidades Kir6.2 e SUR1 e seus domínios de ligação no meio intracelular. Adaptado de Sato et al. 2010.

As subunidades Kir6.2 formam o canal em si, enquanto SUR1 é responsável pela sensibilidade do mesmo aos níveis de ADP. É necessária a expressão de ambas as unidades para que o canal possa ser expresso nas membranas das células e funcione corretamente. Outros tecidos também expressam canais semelhantes, diferindo nas isoformas das subunidades expressas (HUOPIO et al., 2002; OLSON; TERZIC, 2010).

Situações em que apenas a unidade Kir6.2 seja expressa, será formado um pequeno canal que sofrerá inibição tanto na presença de ATP quanto na presença de ADP. Com a co-expressão de SUR1, a passagem formada por Kir6.2 será maior e perderá sua sensibilidade ao ADP, pois na presença de Mg^{2+} e ADP, ambos se ligarão à subunidade SUR1 em lugar de Kir6.2 e, portanto, o canal permanecerá aberto até que os níveis de ATP estejam aumentados (JOHN; WEISS; RIBALET, 2001; RIBALET; JOHN; WEISS, 2003).

O ATP é capaz de se ligar ao canal de K^+ induzindo seu fechamento. Portanto, com o aumento da relação ATP/ADP causada pela entrada de glicose na célula e consequente inibição do canal iônico ocorre uma despolarização na célula pancreática. Essa despolarização acaba por induzir a abertura de canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem, permitindo assim um influxo desse íon. A entrada de Ca^{2+}

extracelular estimula a exocitose de vesículas contendo insulina, lançada na corrente sanguínea para alcançar seus diversos tecidos alvos. Ao se ligar em seus receptores, esse hormônio promove uma série de reações intracelulares por meio de uma cascata de fosforilação que altera algumas funções celulares (ZOU; GONG; LIANG, 2014).

Como consequência da ação da insulina há uma translocação de receptores do tipo GLUT4 para a superfície celular, que assim como o GLUT2 promove a entrada de glicose (CALLAHAN et al., 2015; HANEY et al., 1991). Outras consequências da ação da insulina são a síntese de proteínas e óxido nítrico, mitogênese e síntese de glicogênio e triglicerídeos para o armazenamento da glicose que não tenha sido utilizada pela célula (MANRIQUE; SOWERS, 2014; MARSHALL; GARVEY; TRAXINGER, 1991; POHER et al., 2015).

Quando o organismo se encontra em um estado de jejum, a relação ATP/ADP está baixa. Enquanto a subunidade Kir6.2 liga-se diretamente ao ATP a subunidade SUR1 contém duas dobras de peptídeos que se ligam ao complexo Mg^{2+}/ADP . Essa ligação ativa o canal, permitindo o efluxo de K^+ e consequente hiperpolarização da célula, impedindo desta forma a ativação de canais de Ca^{2+} e a exocitose de vesículas contendo insulina (GOLAN et al., 2012).

Mutações nos genes responsáveis por codificar as subunidades proteicas que formam o canal de potássio podem afetar sua função normal. Mutações no gene *KCNJ11* (Kir6.2) são relatadas como aumentando a suscetibilidade ao desenvolvimento do DM2 e diminuição da secreção de insulina; alterações na sequência de DNA do gene *ABCC8* (SUR1) estão implicadas também no DM2, assim como na alteração da resposta a drogas hipoglicemiantes orais (GONEN et al., 2012; HAGHVERDIZADEH et al., 2014; PARVIZI et al., 2014; PHANI et al., 2014; SATO et al., 2010).

A ligação droga/receptor ocorre na subunidade SUR1, que recebeu esse nome devido a descoberta do mecanismo molecular de ação das sulfonilureias (SUR; do inglês, *SUlfonilureia Receptor*) (PROKS et al., 2007). O complexo Mg^{2+}/ADP compete com a droga pelo sítio de ligação e o fármaco desloca o complexo impedindo a ativação do canal, causando dessa forma uma despolarização na célula, mimetizando assim o estado pós-prandial. Em seguida, há um consequente influxo de Ca^{2+} e a exocitose de vesículas contendo insulina (ORTIZ et al., 2013).

2.6 *KCNJ11*: a subunidade Kir6.2 e o polimorfismo Glu23Lys

O gene *KCNJ11* (do inglês, *Potassium inwardly-rectifying channel*, subfamília J, membro 11) localizado na região cromossômica 11p15.1 codifica a subunidade Kir6.2 do canal de potássio dependente de ATP altamente expresso em células pancreáticas. Esse gene possui 2kb de tamanho, sendo formado por apenas 1 éxon que codifica 390 aminoácidos (LI, 2013). Até o momento já foram relatados mais de 180 polimorfismos de nucleotídeo simples (SNPs) para o gene *KCNJ11* e muitos deles relacionados ao DM2 (PHANI et al., 2014).

Estudos de genes candidatos associaram o SPN Glu23Lys (rs5219) desse gene com o DM2. Posteriormente, essa correlação foi confirmada pelo GWAS (QI; HU, 2012). Esse polimorfismo é consequência de uma alteração na primeira base do vigésimo terceiro códon do gene *KCNJ11*. Uma substituição de uma guanina (G) do códon selvagem (GAG) por uma adenina (A), leva a formação de uma nova trinca (AAG) que codifica para uma lisina (Lys) em lugar do ácido glutâmico (Glu) na porção N-terminal da sequência de aminoácidos correspondentes à subunidade Kir6.2 (QIU et al., 2014).

A frequência alélica de Lys23 varia bastante de uma população para a outra, ficando entre 13 e 49%. Em populações europeias essa frequência costuma estar entre 30 a 40% (QIN; LV; HUANG, 2013).

Ainda na década de 90, uma meta-análise revelou que o genótipo Lys/Lys é mais frequente em casos, quando comparado aos controles ($p=0,015$) e quando comparado a homocigotos Glu/Glu e heterocigotos Glu/Lys, o homocigoto mutante apresentou uma forte correlação com o desenvolvimento da doença ($p=0,0097$) em uma população europeia (HANI et al., 1998).

Diversos estudos e meta-análises mostraram que portadores do alelo Lys tem maior chance de desenvolverem diabetes (FLOREZ et al., 2004; GONEN et al., 2012; LI et al., 2005; SAKAMOTO et al., 2007). Também foi observado que indivíduos que carregavam esse alelo apresentavam uma significativa redução nos níveis de insulina durante o TOTG. Esse evento pode ser explicado a partir de estudos *in vitro*, os quais revelaram que na presença da variante Lys, a subunidade Kir6.2 necessitaria de uma quantidade três vezes maior de ATP para que o canal fosse inativado (PHANI et al., 2014).

Estudos de construção de sítios de ligação de ATP mostraram que alguns resíduos específicos de aminoácidos com cargas positivas, tanto nas regiões N-terminal quanto C-terminal, tem a capacidade de se ligar ao ATP. Curiosamente, o polimorfismo Glu23Lys substitui um aminoácido de carga negativa (ácido glutâmico) por outro que apresenta uma cadeia lateral positiva (Lys). A proximidade desse polimorfismo com a região de ligação ao ATP sugere que essa alteração diminua a sensibilidade do canal ao ATP, dificultando a ligação do mesmo ao correto sítio de ligação (JOHN et al., 2003; LI, 2013).

A análise desse SNP em diferentes populações revelou que a influência do mesmo na suscetibilidade ao DM2 foi similar em populações europeias (estudos realizados no Reino Unido, Dinamarca, França, Holanda e República Checa) e japonesa. No entanto, em chineses da etnia Han não foi observada associação entre o SNP Glu23Lys e o desenvolvimento dessa patologia, embora a frequência do alelo mutante seja semelhante nas três populações (QIN; LV; HUANG, 2013). Tal contradição pode ser consequência de erros e vieses do estudo, tal como seleção inadequada da amostra ou amostra insuficiente. Por outro lado, esses resultados contraditórios podem estar demonstrando a diversidade étnica e heterogeneidade fenotípica entre essas populações, ou ainda ser consequência da interação com outros genes (QIU et al., 2014).

2.7 ABCC8: a subunidade SUR1 e o polimorfismo Ser1369Ala

O gene *ABCC8* (*ATP binding cassette*, subfamília C, membro 8), assim como *KCNJ11*, está localizado na região cromossômica 11p15.1. A subunidade SUR1 que forma o canal de K⁺ ATP dependente, juntamente com Kir6.2, é codificada por esse gene, composto por 39 éxons e tamanho de mais de 100kb (QIN; LV; HUANG, 2013).

É interessante notar a estreita correlação existente entre o SNP *ABCC8* Ser1369Ala com *KCNJ11*Glu23Lys, que apresentam um forte desequilíbrio de ligação. É relatado que mais de 95% dos indivíduos que carregam duas cópias do alelo Lys23 também são homozigotas para o alelo Ala1369. (HAMMING et al., 2009; QIN; LV; HUANG, 2013)

A subunidade SUR1 possui em sua estrutura dois domínios de ligação de nucleotídeos (NBD1 e NBD2) que se dimerizam para formar um sensor e um sítio

catalítico com atividade MgATPase. Enquanto Mg^{2+}/ATP inibe o canal por interações com Kir6.2, Mg^{2+}/ADP antagoniza esse efeito por interações com NBD1 e NBD2. Parte do Mg^{2+}/ADP é gerado pela ação MgATPase intrínseca do receptor que utiliza Mg^{2+}/ATP como substrato. De forma geral, a atividade do canal é resultado do equilíbrio entre a sua atividade enzimática e o metabolismo celular. Curiosamente, raras mutações em regiões desses domínios aumentam a atividade MgATPase e consequentemente diminuindo os níveis de ATP, dificultando assim a inibição do canal. (FATEHI et al., 2012; HAGHVERDIZADEH et al., 2014).

O haplótipo Lys23/Ala1369 promove uma considerável diminuição da sensibilidade do canal ao ATP. No entanto, a sensibilidade ao ADP permanece inalterada para portadores desse genótipo. Esse haplótipo também pode influenciar o tratamento farmacológico com sulfonilureias no DM2, o qual foi capaz de aumentar a inibição de glicazida, mas não teve efeito inibitórios em glibenclamida ou repaglinida *in vitro* (HAMMING et al., 2009).

Um estudo realizado na Alemanha não encontrou influência do polimorfismo Ser1369Ala e nem do risco de hipoglicemia severa em pacientes que faziam uso de sulfonilureias (glimepirida, glibenclamida e gliquidona). Porém, a glicazida não fazia parte do tratamento de nenhum grupo desse estudo (HOLSTEIN et al., 2012). Essa diferença na resposta das sulfonilureias frente ao SNP pode ser explicada pelo fato de existirem diferentes sítios de ligação na subunidade SUR1 para cada fármaco, como ilustrado na Figura 2. A glicazida liga-se ao sítio A, enquanto glibenclamida liga-se ao sítio AB e repaglidina ao sítio B (HAMMING et al., 2009; KOSTER et al., 1999; SATO et al., 2010). Essa ideia pode ser reforçada por um estudo realizado com duas coortes de pacientes chineses, nas quais foram notadas uma melhor resposta ao tratamento em pacientes *ABCC8* Ala/Ala quando comparados aos que apresentavam o genótipo Ser/Ser. No entanto, esse aumento de resposta pode levar a ocorrência de quadros de hipoglicemia nesses pacientes. Alguns estudos apontaram menores níveis de insulina em pacientes com genótipo *ABCC8* Ala/Ala quando comparados com pacientes *ABCC8* Ser/Ser (FENG et al., 2008). Porém, há resultados que não comprovaram essa diferença (VAN DAM et al., 2005).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Analisar a associação dos SNPs *KCNJ11* Glu23Lys e *ABCC8* Ser1369Ala com a suscetibilidade ao DM 2 em uma amostra da população do Nordeste brasileiro.

3.2 Objetivos específicos

- Determinar as frequências dos SNPs *KCNJ11* Glu23Lys e *ABCC8* Ser1369Ala em casos e controles.
- Estimar a frequência haplotípica dos SNPs *KCNJ11* Glu23Lys e *ABCC8* Ser1369Ala em caso e controles.
- Comparar os genótipos e haplótipos dos SNPs entre as populações caso e controle, na intenção de identificar associações destes genótipos na suscetibilidade ao DM2.
- Estabelecer correlações entre os genótipos encontrados na população com as variáveis IMC, perfil lipídico (colesterol, HDL e triglicerídios) e perfil glicêmico (glicemia em jejum e HbA1c) em cada grupo.

4 REFERÊNCIAS

- ABDULLAH, N. et al. The Architecture of Risk for Type 2 Diabetes: Understanding Asia in the Context of Global Findings. **International Journal of Endocrinology**, v. 2014, p. 1–21, 2014.
- ADEYEMO, A. A. et al. Evaluation of Genome Wide Association Study Associated Type 2 Diabetes Susceptibility Loci in Sub Saharan Africans. **Frontiers in Genetics**, v. 6, 24 nov. 2015.
- ALGOBLAN, A.; ALALFI, M.; KHAN, M. Mechanism linking diabetes mellitus and obesity. **Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy**, v. 7, p. 587, dez. 2014.
- ALMEIDA-PITITTO, B. et al. Type 2 diabetes in Brazil: epidemiology and management. **Diabetes, metabolic syndrome and obesity : targets and therapy**, v. 8, p. 17–28, jan. 2015.
- BERTOLDI, A. D. et al. Epidemiology, management, complications and costs associated with type 2 diabetes in Brazil: a comprehensive literature review. **Globalization and Health**, v. 9, n. 62, p. 1–12, 2013.
- BOGLOU, P. et al. Hypoglycaemia due to interaction of glimepiride with isoniazid in a patient with type 2 diabetes mellitus. **BMJ Case Rep**, v. 2013, p. 2012–2014, 2013.
- BONHAM, G. S.; BROCK, D. B. The relationship of diabetes with race, sex, and obesity. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 41, n. 4, p. 776–783, 1985.
- CALLAHAN, Z. J. et al. Compensatory responses of the insulin signaling pathway restore muscle glucose uptake following long-term denervation. **Physiological Reports**, v. 3, n. 4, p. e12359–e12359, 2015.
- CHADT, A. et al. **Molecular links between Obesity and Diabetes: “Diabesity”**. [s.l.: s.n.].
- DANDONA, P. et al. The potential influence of inflammation and insulin resistance on the pathogenesis and treatment of atherosclerosis-related complications in type 2 diabetes. **The Journal of clinical endocrinology and metabolism**, v. 88, n. 6, p. 2422–2429, 2003.
- DAWN TEARE, M.; BARRETT, J. H. Genetic linkage studies. **Lancet**, v. 366, n. 9490, p. 1036–44, 2005.
- DELLA MANNA, T. Not every diabetic child has type 1 diabetes mellitus. **Jornal de pediatria**, v. 83, n. 5 Suppl, p. S178–S183, 2007.
- DROUIN, P. et al. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. **Diabetes Care**, v. 32, n. Supplement_1, p. S62–S67, 2009.
- ECKEL, N. et al. Characterization of metabolically unhealthy normal-weight individuals: Risk factors and their associations with type 2 diabetes. **Metabolism: clinical and experimental**, v. 64, n. 8, p. 862–71, 2015.
- EGGER, G.; DIXON, J. Beyond Obesity and Lifestyle: A Review of 21st Century

Chronic Disease Determinants. **BioMed Research International**, v. 2014, p. 1–12, 2014.

ENGLER, R. L.; YELLON, D. M. Sulfonylurea KATP blockade in type II diabetes and preconditioning in cardiovascular disease. Time for reconsideration. **Circulation**, v. 94, n. 9, p. 2297–301, 1996.

EVANS, J. L.; BAHNG, M. **NON-PHARMACEUTICAL INTERVENTION OPTIONS FOR TYPE 2 DIABETES: Diets and Dietary Supplements (Botanicals, Antioxidants, and Minerals)**. 4 mar 2014 ed. South Dartmouth (MA): MDTText.com, Inc., 2000.

FATEHI, M. et al. The ATP-sensitive K(+) channel ABCC8 SER1369ALA type 2 diabetes risk variant increases MgATPase activity. **Diabetes**, v. 61, n. 1, p. 241–249, 2012.

FENG, Y. et al. Ser1369Ala variant in sulfonylurea receptor gene ABCC8 is associated with antidiabetic efficacy of gliclazide in Chinese type 2 diabetic patients. **Diabetes Care**, v. 31, n. 10, p. 1939–1944, 2008.

FLOREZ, J. C. et al. Haplotype Structure and Genotype-Phenotype Correlations of the Sulfonylurea Receptor and the Islet ATP-Sensitive Potassium Channel Gene Region. **Diabetes**, v. 53, n. 5, p. 1360–1368, 1 maio 2004.

FOROUHI, N. G.; WAREHAM, N. J. Epidemiology of diabetes. **Medicine**, v. 42, n. 12, p. 698–702, dez. 2014.

GOLAN, D. E. et al. **Principles of Pharmacology. The Pathophysiologic Basis of Drug Therapy**. 3. ed. Philadelphia: LIPPINCOTT WILLIAMS & WILKINS, 2012.

GONEN, M. S. et al. Effects of single nucleotide polymorphisms in K(ATP) channel genes on type 2 diabetes in a Turkish population. **Arch Med Res**, v. 43, n. 4, p. 317–323, 2012.

HAGHVERDIZADEH, P. et al. ABCC8 genetic variants and risk of diabetes mellitus. **Gene**, v. 545, n. 2, p. 198–204, 2014.

HAMMING, K. S. C. et al. Coexpression of the Type 2 Diabetes Susceptibility Gene ATP and Sulfonylurea Sensitivities of the ATP-Sensitive K(+) Channel. **Diabetes**, v. 58, n. 10, p. 2419–24, 2009.

HANEY, P. M. et al. Intracellular targeting of the insulin-regulatable glucose transporter (GLUT4) is isoform specific and independent of cell type. **Journal of Cell Biology**, v. 114, n. 4, p. 689–699, 1991.

HANI, E. H. et al. Missense mutations in the pancreatic islet beta cell inwardly rectifying K⁺ channel gene (KIR6.2/BIR): A meta-analysis suggests a role in the polygenic basis of Type II diabetes mellitus in Caucasians. **Diabetologia**, v. 41, n. 12, p. 1511–1515, 1998.

HEIMBERG, H. et al. Heterogeneity in glucose sensitivity among pancreatic beta-cells is correlated to differences in glucose phosphorylation rather than glucose transport. **The EMBO journal**, v. 12, n. 7, p. 2873–9, 1993.

HIRST, J. A. et al. Estimating the effect of sulfonylurea on HbA1c in diabetes: a

- systematic review and meta-analysis. **Diabetologia**, v. 56, n. 5, p. 973–84, 2013.
- HOLSTEIN, J. D. et al. The Ser1369Ala variant of ABCC8 and the risk for severe sulfonylurea-induced hypoglycemia in German patients with Type 2 diabetes. **Pharmacogenomics**, v. 13, n. 1, p. 5–7, jan. 2012.
- HU, F. B. et al. Diet, Lifestyle, and the Risk of Type 2 Diabetes Mellitus in Women. **New England Journal of Medicine**, v. 345, n. 11, p. 790–797, 13 set. 2001.
- HUOPIO, H. et al. K ATP channels and insulin secretion disorders. **American Journal of Physiology - Endocrinology And Metabolism**, v. 283, n. 2, p. E207–E216, 1 ago. 2002.
- INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION. **International Diabetes Atlas**. 7. ed. Brussels, Belgium: [s.n.].
- JOHN, S. A. et al. Molecular mechanism for ATP-dependent closure of the K⁺ channel Kir6.2. **J.Physiol**, v. 552, n. Pt 1, p. 23–34, 2003.
- JOHN, S. A.; WEISS, J. N.; RIBALET, B. Regulation of cloned ATP-sensitive K channels by adenine nucleotides and sulfonylureas: interactions between SUR1 and positively charged domains on Kir6.2. **J Gen Physiol**, v. 118, n. 4, p. 391–405, 2001.
- JUNG, C.-H. et al. Differential associations of central and brachial blood pressure with carotid atherosclerosis and microvascular complications in patients with type 2 diabetes. **BMC cardiovascular disorders**, v. 14, n. 1, p. 23, 2014.
- KAPOOR, R. R. et al. Hyperinsulinaemic hypoglycaemia and diabetes mellitus due to dominant ABCC8/KCNJ11 mutations. **Diabetologia**, v. 54, n. 10, p. 2575–83, 2011.
- KARPE, F.; DICKMANN, J. R.; FRAYN, K. N. Fatty Acids, Obesity, and Insulin Resistance: Time for a Reevaluation. **Diabetes**, v. 60, n. 10, p. 2441–2449, 2011.
- KIM, T. W.; JEONG, J.-H.; HONG, S.-C. The Impact of Sleep and Circadian Disturbance on Hormones and Metabolism. **International Journal of Endocrinology**, v. 2015, p. 1–9, 2015.
- KING, P.; PEACOCK, I.; DONNELLY, R. The UK prospective diabetes study (UKPDS): clinical and therapeutic implications for type 2 diabetes. **British journal of clinical pharmacology**, v. 48, n. 5, p. 643–648, 1999.
- KLEN, J.; DOLŽAN, V.; JANEŽ, A. CYP2C9, KCNJ11 and ABCC8 polymorphisms and the response to sulphonylurea treatment in type 2 diabetes patients. **European Journal of Clinical Pharmacology**, v. 70, n. 4, p. 421–428, 2014.
- KOSTER, J. C. et al. ATP inhibition of KATP channels: control of nucleotide sensitivity by the N-terminal domain of the Kir6.2 subunit. **The Journal of physiology**, v. 515 (Pt 1), p. 19–30, 15 fev. 1999.
- LEBRÓN-ALDEA, D. et al. Integrated genomic and BMI analysis for type 2 diabetes risk assessment. **Frontiers in genetics**, v. 6, n. March, p. 75, 2015.
- LEY, S. H. et al. Prevention and management of type 2 diabetes: Dietary components and nutritional strategies. **The Lancet**, v. 383, n. 9933, p. 1999–2007, 2014.

LI, L. et al. Single Nucleotide Polymorphisms in KATP Channels: Muscular Impact on Type 2 Diabetes. **Diabetes**, v. 54, n. 5, p. 1592–1597, 1 maio 2005.

LI, Y.-Y. The KCNJ11 Glu23Lys gene polymorphism and type 2 diabetes mellitus in the Chinese Han population: a meta-analysis of 6,109 subjects. **Molecular biology reports**, v. 40, n. 1, p. 141–6, 2013.

LIEBL, A. et al. Health Economic Evaluation of Type 2 Diabetes Mellitus : A Clinical Practice Focused Review. p. 13–19, 2015.

LIU, N.; ZHANG, K.; ZHAO, H. Haplotype-association analysis. **Advances in genetics**, v. 60, p. 335–405, 2008.

MANRIQUE, C.; SOWERS, J. R. Insulin Resistance and Skeletal Muscle Vasculature: Significance, Assessment and Therapeutic Modulators. **Cardiorenal Medicine**, v. 4, n. 3-4, p. 244–256, 2014.

MARSHALL, S.; GARVEY, W. T.; TRAXINGER, R. R. New insights into the metabolic regulation of insulin action and insulin resistance: role of glucose and amino acids. **FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 5, n. 15, p. 3031–6, dez. 1991.

MARTIN, G. M. et al. Pharmacological rescue of trafficking-impaired ATP-sensitive potassium channels. **Frontiers in physiology**, v. 4, p. 1–16, 2013.

MATSUDA, A.; KUZUYA, T. Family history of Japanese patients with non-insulin-dependent diabetes. Different implications of diabetes in parents and in siblings. **Endocrinol Jpn**, v. 31, n. 3, p. 335–341, 1984.

MCINTOSH, B. et al. Choice of therapy in patients with type 2 diabetes inadequately controlled with metformin and a sulphonylurea: a systematic review and mixed-treatment comparison meta-analysis. **Open medicine : a peer-reviewed, independent, open-access journal**, v. 6, n. 2, p. e62–74, 2012.

MORRIS, A. P. et al. Large-scale association analysis provides insights into the genetic architecture and pathophysiology of type 2 diabetes. **Nature Genetics**, v. 44, n. 9, p. 981–990, 12 ago. 2012.

MRAZ, M.; HALUZIK, M. The role of adipose tissue immune cells in obesity and low-grade inflammation. **Journal of Endocrinology**, v. 222, n. 3, p. R113–R127, 2014.

NAIDOO, P. et al. Optimal utilisation of sulphonylureas in resource-constrained settings. **Cardiovascular journal of Africa**, v. 25, n. 2, p. 83–5, 2014.

NG, M. C. Y. et al. Transferability and Fine Mapping of Type 2 Diabetes Loci in African Americans: The Candidate Gene Association Resource Plus Study. **Diabetes**, v. 62, n. 3, p. 965–976, 1 mar. 2013.

NORDBORG, M.; TAVARÉ, S. Linkage disequilibrium: what history has to tell us. **Trends in genetics : TIG**, v. 18, n. 2, p. 83–90, fev. 2002.

ODGEREL, Z. et al. Genetic variants in potassium channels are associated with type 2 diabetes in a Mongolian population. **Journal of Diabetes**, v. 4, n. 3, p. 238–242, set. 2012.

OLSON, T. M.; TERZIC, A. Human KATP channelopathies: Diseases of metabolic

homeostasis. **Pflugers Archiv European Journal of Physiology**, v. 460, n. 2, p. 295–306, 2010.

ONGE, E. S. et al. A review of the treatment of type 2 diabetes in children. **The journal of pediatric pharmacology and therapeutics : JPPT : the official journal of PPAG**, v. 20, n. 1, p. 4–16, 2015.

ORTIZ, D. et al. Reinterpreting the action of ATP analogs on K(ATP) channels. **J.Biol Chem.**, v. 288, n. 26, p. 18894–18902, 2013.

PARVIZI, Z. et al. Association between Glu23Lys variant in KCNJ11 gene and new-onset diabetes after liver transplantation. **Molecular Biology Reports**, v. 41, n. 9, p. 6063–6069, 2014.

PHANI, N. M. et al. Population Specific Impact of Genetic Variants in KCNJ11 Gene to Type 2 Diabetes: A Case-Control and Meta-Analysis Study. **PLoS ONE**, v. 9, n. 9, p. 1–11, 23 set. 2014.

POHER, A.-L. et al. Brown adipose tissue activity as a target for the treatment of obesity/insulin resistance. **Frontiers in Physiology**, v. 6, n. January, p. 1–9, 2015.

PRASAD, R.; GROOP, L. Genetics of Type 2 Diabetes—Pitfalls and Possibilities. **Genes**, v. 6, n. 1, p. 87–123, 2015.

PROKS, P. et al. Mechanism of action of a sulphonylurea receptor SUR1 mutation (F132L) that causes DEND syndrome. **Human molecular genetics**, v. 16, n. 16, p. 2011–9, 2007.

QI, Q.; HU, F. B. Genetics of type 2 diabetes in European populations. **Journal of Diabetes**, v. 4, n. 3, p. 203–212, set. 2012.

QIN, L. J.; LV, Y.; HUANG, Q. Y. Meta-analysis of association of common variants in the KCNJ11-ABCC8 region with type 2 diabetes. **Genetics and molecular research : GMR**, v. 12, n. 3, p. 2990–3002, 2013.

QIU, L. et al. Quantitative assessment of the effect of KCNJ11 gene polymorphism on the risk of type 2 diabetes. **PloS one**, v. 9, n. 4, p. 1–9, 2014.

RACITI, G. A. et al. Understanding type 2 diabetes: from genetics to epigenetics. **Acta Diabetologica**, v. 52, n. 5, p. 821–827, 5 out. 2015.

RIBALET, B.; JOHN, S. A.; WEISS, J. N. Molecular basis for Kir6.2 channel inhibition by adenine nucleotides. **Biophysical Journal**, v. 84, n. 1, p. 266–276, 2003.

SAGREIRA, L. SULFONILUREIAS. **Acta Médica Portuguesa**, v. 1, p. 9–13, 1989.

SAITO-HAKODA, A et al. Nateglinide is effective for diabetes mellitus with reactive hypoglycemia in a child with a compound heterozygous ABCC8 mutation. **Clinical Pediatric Endocrinology**, v. 21, n. 3, p. 45–52, 2012.

SAKAMOTO, Y. et al. SNPs in the KCNJ11-ABCC8 gene locus are associated with type 2 diabetes and blood pressure levels in the Japanese population. **Journal of human genetics**, v. 52, n. 10, p. 781–93, 2007.

SATO, R. et al. ABCC8 polymorphism (Ser1369Ala): influence on severe hypoglycemia due to sulfonylureas. **Pharmacogenomics**, v. 11, n. 12, p. 1743–50,

2010.

SEGULA, D. Complications of obesity in adults: a short review of the literature. **Malawi medical journal : the journal of Medical Association of Malawi**, v. 26, n. 1, p. 20–4, 2014.

SEMIZ, S.; DUJIC, T.; CAUSEVIC, A. Pharmacogenetics and personalized treatment of type 2 diabetes. **Biochemia medica**, v. 23, n. 7, p. 154–71, 2013.

SIGNOROVITCH, J. E. et al. Hypoglycaemia and accident risk in people with type 2 diabetes mellitus treated with non-insulin antidiabetes drugs. **Diabetes, Obesity and Metabolism**, v. 15, n. 4, p. 335–341, 2013.

SINGH, A.; SINGH, R. Metformin in gestational diabetes: An emerging contender. **Indian Journal of Endocrinology and Metabolism**, v. 19, n. 2, p. 236, 2015.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. **Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes: 2013-2014**. São Paulo: AC Farmacêutica, 2014.

SOKOLOVA, E. A. et al. Replication of KCNJ11 (p.Glu23Lys) and ABCC8 (p.SER1369ALA) Association in Russian Diabetes Mellitus 2 Type Cohort and Meta-Analysis. **PloS one**, v. 10, n. 5, p. e0124662, 2015.

SUN, X.; YU, W.; HU, C. Genetics of Type 2 Diabetes: Insights into the Pathogenesis and Its Clinical Application. **BioMed Research International**, v. 2014, p. 1–15, 2014.

TORO, R. et al. Relationship between lipoprotein (a) and micro/macro complications in type 2 diabetes mellitus: a forgotten target. **Journal of geriatric cardiology : JGC**, v. 12, n. 2, p. 93–9, 2015.

UMEGAKI, H. Type 2 diabetes as a risk factor for cognitive impairment: current insights. **Clin Interv Aging**, v. 9, p. 1011–1019, 2014.

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

WANG, Y. et al. Comparison of abdominal adiposity and overall obesity in predicting risk of type 2 diabetes among men. **The American journal of clinical nutrition**, v. 81, n. 3, p. 555–63, mar. 2005.

WOLFFENBUTTEL, B. H.; GRAAL, M. B. New treatments for patients with type 2 diabetes mellitus. **Postgraduate medical journal**, v. 72, n. 853, p. 657–62, 1996.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global Health Estimates : Death by cause, age, sex and country, 2000 -2012**. WHO.

ZOU, C.-Y.; GONG, Y.; LIANG, J. Metabolic signaling of insulin secretion by pancreatic β -cell and its derangement in type 2 diabetes. **European review for medical and pharmacological sciences**, v. 18, n. 15, p. 2215–27, 2014.

ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO DOS POLIMORFISMOS *KCNJ11* Glu23Lys E *ABCC8* Ser1369Ala COM A SUSCETIBILIDADE AO *DIABETES MELITUS* TIPO 2 EM UMA POPULAÇÃO DO NORDESTE BRASILEIRO

Allan T. Silva¹, Jônathas de S. G. Pinheiro¹, Hianny F. Fernandes¹, Hygor Ferreira-Fernandes¹, Valéria Andrade Lima¹, Cristina Rodrigues Martins¹, Tâmisia S. B. Honda¹, Fábio J. N. Motta¹, Renata Canalle¹, Giovanny R. Pinto¹, France K. N. Yoshioka¹

¹Laboratório de Genética e Biologia Molecular, Universidade Federal do Piauí, Av. São Sebastião 2819, Parnaíba PI 64202-020, Brasil

CORRESPONDÊNCIA:

France.K.N. Yoshioka

Laboratório de Genética e Biologia Molecular

Universidade Federal do Piauí, Av. São Sebastião 2819, Parnaíba PI 64202-020, Brasil

Tel.: +55 86 9 8826-1104

e-mail: keiko@ufpi.edu.br

RESUMO

Objetivos: O objetivo deste estudo caso-controle é avaliar a influência dos polimorfismos *KCNJ11* Glu23Lys e *ABCC8* Ser1369Ala, bem como de seus haplótipos, no desenvolvimento do DM2 e suas relações com as variáveis clínicas e bioquímicas em uma população do nordeste brasileiro

Métodos: Foram coletadas amostras de sangue periférico de 235 pacientes não aparentados diagnosticados com DM2 e 206 amostras de controles saudáveis para extração do DNA. A identificação dos genótipos foi feita pela técnica PCR-RFLP. O equilíbrio genético das populações, a análise das frequências genotípicas e alélicas, o risco de chances e a diferença entre as médias das variáveis clínicas entre os genótipos foram avaliadas por métodos estatísticos.

Resultados: As frequências genotípicas de *KCNJ11* Glu23Lys e *ABCC8* Ser1369Ala não diferiram significativamente entre os grupos caso e controle ($p=0,7863$ e $p=0,2145$), bem como as frequências alélicas ($p=0,87$ e $p=0,75$). Em nenhum dos casos foi observada uma maior chance de desenvolver DM2 associada a qualquer dos genótipos ou haplótipos ($p>0,05$). A análise estatística revelou que os níveis colesterol total são mais baixos em indivíduos homozigotos para o alelo *KCNJ11* Lys/Lys ($p=0,0338$). Verificou-se que esses indivíduos ainda possuem níveis de HbA1c mais elevados que portadores do genótipo selvagem *KCNJ11* Glu23 ($p=0,0091$).

Conclusões: Em suma, nosso estudo não aponta correlações significativas entre os polimorfismos *KCNJ11* Glu23Lys e *ABCC8* Ser1369Ala com uma suscetibilidade aumentada para o DM2. No entanto, as diferenças apresentadas por algumas das variáveis analisadas entre os diferentes genótipos sugerem que os polimorfismos abordados desempenham um papel importante no curso dessa doença

INTRODUÇÃO

O *diabetes mellitus* (DM) é uma síndrome metabólica caracterizada pelo aumento da concentração de glicose no sangue, acompanhada de distúrbios metabólicos nas proteínas e ácido graxos [1]. O Brasil é o quarto país no mundo com o maior número de portadores, tendo uma estimativa de 14,3 milhões de adultos vivendo com diabetes [2]. Do total de casos, quase 90% refere-se ao tipo 2 (DM2) [3].

Com o advento de estudos de associação ampla do genoma (GWAS, do inglês *Genome Wide Association Studies*) diversos *loci* foram associados ao DM2 e até o momento são conhecidos 74 [4–6]. Dois genes destacam-se pela função por eles exercida: *KCNJ11* e *ABCC8*, localizados em 11p15.1, que codificam, respectivamente, as subunidades Kir6.2 e SUR1, que juntas formam um canal de potássio (K^+) dependente de ATP expresso em células β pancreáticas diretamente ligado a secreção de insulina [7–9]. Esse canal está constitutivamente aberto e permite um efluxo de K^+ , causando assim uma hiperpolarização celular. Tal canal apresenta sítios de ligação de nucleotídeos que são sensíveis aos níveis de ATP e ADP intracelulares [10]. O ATP é capaz de se ligar ao canal de K^+ induzindo seu fechamento. Com o aumento da relação ATP/ADP, causada pela entrada de glicose na célula no estado pós-prandial e conseqüente inibição do canal iônico, ocorre uma despolarização na célula pancreática. Essa despolarização acaba por desencadear a abertura de canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem, que se abrem permitindo assim um influxo desse íon seguido pela exocitose de vesículas contendo insulina [11].

Mutações nos genes responsáveis por codificar as subunidades proteicas que formam o canal de K^+ podem afetar sua função normal e predispor o portador de tais mutações ao desenvolvimento do DM2 [12]. Os alelos de menor frequência dos polimorfismos *KCNJ11* Glu23Lys (rs5219) e *ABCC8* Ser1369Ala (rs757110) são fatores de risco bem estabelecidos para o DM2 em populações caucasianas e também já foram associados em outras populações, como japoneses e chineses [13–15], embora haja resultados discordantes [16, 17]. No entanto, ao nosso conhecimento, nenhum estudo investigando a influência de polimorfismos desses genes no desenvolvimento de DM2 foi realizado em populações do nordeste brasileiro.

O polimorfismo *KCNJ11* Glu23Lys substitui um aminoácido de carga negativa (ácido glutâmico, Glu) por outro que apresenta uma cadeia lateral positiva (lisina, Lys). A proximidade desse polimorfismo com a região de ligação ao ATP sugere que essa alteração diminua a sensibilidade do canal ao ATP, dificultando sua ligação ao correto sítio [15, 18]. Estudos *in vitro* revelaram que na presença da variante *KCNJ11* Lys23, a subunidade Kir6.2 necessita de uma quantidade três vezes maior de ATP para que o canal seja inativado [19]. A subunidade SUR1 possui em sua estrutura dois domínios de ligação de nucleotídeos (NBD1 e NBD2) que se dimerizam para formar um sensor e um sítio catalítico com atividade MgATPase ($Mg^{+2} + ATP \rightarrow Mg^{+2} + ADP + Pi$). Enquanto MgATP inibe o canal por interações com Kir6.2, MgADP antagoniza esse efeito por interações com NBD1 e NBD2. Parte do MgADP é gerado pela ação MgATPase intrínseca do receptor que utiliza MgATP como substrato. De forma geral, a atividade do canal é resultado do equilíbrio entre a sua atividade enzimática e o metabolismo celular. Curiosamente, raros polimorfismos em regiões desses domínios, como *ABCC8* Ser1369Ala, aumentam a atividade MgATPase e conseqüentemente diminuindo os níveis de ATP, dificultando assim a inibição do canal [10, 20], deste modo o haplótipo Lys23/Ala1369 promove uma considerável diminuição da sensibilidade do canal ao ATP [21, 22].

O objetivo deste estudo caso-controle foi avaliar a influência dos polimorfismos *KCNJ11* Glu23Lys e *ABCC8* Ser1369Ala, bem como de seus haplótipos, no desenvolvimento do DM2 e suas relações com as variáveis clínicas e bioquímicas em uma população do nordeste brasileiro.

MÉTODOS

Seleção dos pacientes, coleta de amostras e aspectos éticos

Para compor o grupo de estudo do presente trabalho foram coletadas amostras de sangue periférico de 235 pacientes não aparentados diagnosticados com DM2, segundo os critérios da OMS e da Sociedade Brasileira de Diabetes [23]. Também foram coletadas 206 amostras de sangue periférico de controles saudáveis provenientes de laboratórios de análises clínicas, sem condições associadas à doença, confirmado por exames clínicos e laboratoriais e sem história familiar de diabetes. Ambos os grupos foram informados da pesquisa e ao concordarem em participar assinaram um Termo de Consentimento, autorizando a coleta das amostras e a realização dos procedimentos necessários. Este estudo teve ser protocolo aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Universidade Federal do Piauí.

Dados laboratoriais (HbA1c, glicemia em jejum, colesterol HDL, colesterol total e triglicerídeos) e grau de obesidade, dado pelo índice de massa corpórea (IMC) foram coletados dos dois grupos, bem como informações sobre o uso de medicamentos. Um resumo das características clínicas de pacientes e controles pode ser visto na Tabela 1.

Tabela 1: Variáveis clínicas e bioquímicas de portadores de DM2 e controles.

Características	Casos n=235	Controles n=206	p
Homens/Mulheres	62/173	62/144	
Idade	63,27 ± 0,85	63,12 ± 0,90	0,9024
IMC (peso[Kg]/altura[m] ²)	26,56 ± 0,28	24,60 ± 0,32	<0,0001
Glicemia em jejum (mmol/L)	9,53 ± 0,29	5,04 ± 0,07	<0,0001
HbA1C (%)	8,16 ± 0,19	4,37 ± 0,08	<0,0001
HbA1C (mmol/mol)	65,70 ± 2,09	24,57 ± 0,85	<0,0001
Colesterol Total (mmol/L)	5,71 ± 0,11	5,14 ± 0,09	<0,0001
Colesterol HDL (mmol/L)	1,25 ± 0,03	1,34 ± 0,02	0,0028
Colesterol LDL (mmol/L)	3,35 ± 0,11	3,14 ± 0,08	0,0606
Triglicerídeos (mmol/L)	2,26 ± 0,08	1,74 ± 0,04	<0,0001

Extração, Amplificação e análise das regiões polimórficas

As amostras de sangue periférico foram submetidas à extração do DNA com o *kit Wizard® Genomic DNA Purification* (Promega Inc., USA), de acordo com as especificações do fabricante. Posterior à extração e para a verificação da qualidade do DNA extraído, as amostras foram submetidas à corrida eletroforética, em gel de agarose a 0,8%, corados com GelRed™ e a quantificação do DNA foi feita no equipamento BioSpec-nano (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan).

As sequências alvos onde se encontram os polimorfismos foram selecionadas utilizando o banco de dados do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI). *Primers* específicos utilizados para flanquear a região dos dois polimorfismos foram desenhados utilizando o programa GeneRunner (*KCNJ11* Glu23Lys *forward primer* 5'-GATGTTCTTGTGGGCCACGTTG-3', *reverse primer* 5'-GACTCTGCAGTGAGGCCCTAG-3' e *ABCC8* Ser1369Ala *forward primer* 5'-GCACCATCGCTGATCCCAA-3', *reverse primer* 5'-CACGAGGTGACTGCGAAGCC-3'). A região de interesse foi amplificada pela técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR, do inglês *polymerase chain reaction*) e a identificação dos genótipos foi feita pela técnica de polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição (RFLP, do inglês *restriction fragment length polymorphism*).

A reação de PCR foi realizada em um volume total de 25 µL, com as seguintes concentrações para ambos os polimorfismos: DNTP 200 µM; Tampão 1X (10 mM Tris-HCl (pH 8.5), 50 mM KCl); MgCl₂ 1,5 mM; primers 0,4 mM; Taq DNA polimerase 1,5 U; DNA 50 ng; completando-se o volume com água destilada. Depois de misturados, os reagentes foram submetidos a diferentes ciclos de temperatura gerados em termociclador (AmpliTherm Thermal Cycler, Madison, WI, USA), começando com uma etapa de desnaturação a 95°C por 5 min, seguido por 35 ciclos de 95°C por 30 seg., anelamento a 56°C por 30 seg. e extensão a 72°C por 1 min. com uma etapa de extensão final a 72°C por 7 min. Os *amplicons* gerados para *KCNJ11* Glu23Lys e *ABCC8* Ser1369Ala foram de 226pb e 224pb, respectivamente.

Posteriormente à amplificação da região de interesse dos genes *KCNJ11* e *ABCC8*, os produtos amplificados foram submetidos à digestão, respectivamente, pelas enzimas *Eco24I* (*BanII*) e *HpyF10VI* (*MwoI*) (Thermo Fisher Scientific Inc.). A enzima *Eco24I* reconhece o sítio catalítico 5'...GRGCY/C...3' presente em duas

regiões do *amplicon*, sendo uma delas no alelo selvagem *KCNJ11* Glu23 gerando três fragmentos de tamanhos diferentes (146 pb, 52 pb e 28 pb), enquanto que o alelo mutante *KCNJ11* Lys23 não apresenta o sítio de restrição da enzima resultando em dois fragmentos (174 pb e 52 pb).

A enzima *HypF10VI* tem sua ação determinada pela presença do sítio catalítico 5'...GCNNNNN/NNCG...3' que está presente no *amplicon*. O alelo selvagem *ABCC8* Ser1369, quando submetido ao corte enzimático, produz três fragmentos (92 pb, 73 pb e 59 pb), enquanto que o alelo mutante *ABCC8* Ala1369 apresenta um sítio de corte a mais gerando quatro fragmentos (73 pb, 59 pb, 51 pb e 41 pb).

Após a digestão, os produtos foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida (10%), em cuba vertical. A corrida eletroforética foi feita sob corrente constante de 140 mV durante 150 min, com tampão TBE 1x (tris + ácido bórico + EDTA) e visualizados por meio de revelação com nitrato de prata, utilizando 5 µL do produto com 5 µL de corante *STOPsolution* (50 mg azul de bromofenol + 50 mg xilencianol + 20 mM EDTA + 1 mL formamida). Posteriormente, foi feita a fotodocumentação, para a identificação dos padrões de banda e discriminação genotípica, de acordo com o tamanho dos fragmentos para cada indivíduo.

Análise estatística

Depois de genotipadas, as populações caso e controle foram testadas pela lei de *Hardy-Weinberg* (HW) para verificar-se o equilíbrio. A análise das frequências genotípicas e alélicas foi realizada utilizando-se o teste do Qui-quadrado (X^2) e o teste exato de Fisher, respectivamente. O *odds ratio* (OR) e o intervalo de confiança (IC) de 95% foram calculados pelo modelo de regressão logística. Essas análises foram realizadas no *software* Bioestat 5.3 (Instituto Mamirauá, Brasil). Para comparar a média das variáveis entre os genótipos aplicou-se o teste *t de Student* e o procedimento de análise de variância (ANOVA) com comparações múltiplas *post hoc* (correção de *Turkey*) ou testes não paramétricos de *Kolmogorov-Smirnov* ou *Mann-Whitney* e *Kruskal-Wallis* com múltiplas comparações de *Dunn*, quando os dados não apresentaram uma distribuição normal. Para a escolha do método estatístico adequado foi aplicado o teste de normalidade de *D'Agostino & Pearson* no rol de dados de cada variável. Os resultados foram apresentados como media \pm erro padrão

da média (SEM, do inglês *standard error of the mean*). Estes testes estatísticos foram realizados no programa *Prism* versão 6.01 (GraphPad Software, Inc.). As estatísticas de desequilíbrio de ligação, as frequências haplotípicas e a correção para múltiplos testes por 1.000 permutações aleatórias foram obtidas por meio do programa *Haploview* 4.2 (Whitehead Institute for Biomedical Research, EUA). A significância estatística foi estabelecida em $p < 0,05$ para todas as análises.

RESULTADOS

Associação dos polimorfismos com o risco de DM2

Para ambos os polimorfismos estudados, a população se encontra em equilíbrio de HW. As frequências genóticas de *KCNJ11* Glu23Lys e *ABCC8* Ser1369Ala não diferiram significativamente entre os grupos caso e controle (*KCNJ11* $p=0,7863$ e *ABCC8* $p=0,2145$), bem como as frequências alélicas ($p=0,87$ e $p=0,75$, respectivamente). Para a realização do OR, os genótipos homozigotos para os alelos *KCNJ11* Glu23 e *ABCC8* Ser1369 foram usados como referência para o OR relativo. Também se utilizou os modelos dominante (soma dos indivíduos homozigotos mutantes e heterozigotos em comparação com homozigotos selvagens), e recessivo (homozigotos mutantes comparados a soma de heterozigotos e homozigotos selvagens). Em nenhum dos casos foi observada uma maior chance de desenvolver DM2 associada a qualquer dos genótipos ($p>0,05$), como pode ser observado na Tabela 2.

Tabela 2: Distribuição das frequências genóticas e alélicas dos polimorfismos *KCNJ11* Glu23Lys e *ABCC8* Ser1369Ala nos grupos caso e controle.

Polimorfismos	Casos	Controles	p^a	OR relativo (IC 95%)	p^b	Modelo dominante ^d	Modelo recessivo ^e
<i>KCNJ11</i>							
Glu23Lys	<i>n=202</i>	<i>n=201</i>					
Glu/Glu	105	110		1			
Glu/Lys	81	78	0,7863	1,09 (0,72 - 1,64)	0,77	1,12 (0,75-1,65)	1,24 (0,58-2,66)
Lys/Lys	16	13		1,29 (0,59 - 2,81)	0,66		
Alelos	Frequência (%)			p^c			
Glu	72,03	74,13		0,87			
Lys	27,97	25,87					
<i>ABCC8</i>							
Ser1369Ala	<i>n=235</i>	<i>n=206</i>					
Ser/Ser	127	111		1			
Ser/Ala	90	87	0,2145	0,90 (0,61 - 1,33)	0,68	0,99 (0,68-1,45)	2,05 (0,87-4,83)
Ala/Ala	18	8		1,97 (0,82 - 4,70)	0,18		
Alelos	Frequência (%)			p^c			
Ser	73,19	75,00		0,75			
Ala	26,81	25,00					

^aTeste Qui-quadrado; ^bOdds Ratio; ^cTeste exato de Fisher; ^dhomozigoto mutante + heterozigoto vs. homozigoto selvagem; ^ehomozigoto mutante vs. heterozigoto + homozigoto selvagem.

Análise comparativa das frequências dos haplótipos

Os polimorfismos *KCNJ11* Glu23Lys e *ABCC8* Ser1369Ala apresentam um forte desequilíbrio de ligação ($D'=0,911$ e $r^2=0,779$). O haplótipo duplo selvagem Glu23/Ser1369 e o haplótipo duplo mutante Lys23/Ala1369 foram os mais frequentes, como apresentado na Tabela 3. Combinações de um alelo selvagem de um gene com um alelo mutante do outro são pouco frequentes. Nenhum dos haplótipos diferiu significativamente entre a população caso e controle ($p>0,05$).

Tabela 3: Frequência haplotípica dos polimorfismos *KCNJ11* Glu23Lys e *ABCC8* Ser1369Ala do grupo de pacientes e controles.

Haplótipos	Casos (%)	Controles (%)	X ²	p	p ^a
Glu23/Ser1369	70,6	71,7	0,129	0,7191	0,983
Lys23/Ala1369	25,7	22,7	1,027	0,3109	0,699
Lys23/Ser1369	2,6	3,3	0,393	0,5309	0,886
Glu23/Ala1369	1,1	2,3	1,68	0,195	0,502
Desequilíbrio					
D'	0,911				
r ²	0,779				

^aValor ajustado após 1000 permutações aleatórias.

Associação dos polimorfismos com as variáveis de risco

Os grupos caso e controle foram subdivididos segundo seus genótipos e suas médias comparadas de acordo com a metodologia descrita, a fim de se verificar a influência de cada polimorfismo sobre as variáveis clínicas e bioquímicas. Nenhuma diferença significativa foi observada no grupo de portadores de diabetes para qualquer das variáveis analisadas em *KCNJ11* Glu23Lys e *ABCC8* Ser1369Ala. Glicose, triglicerídeos, HDL e IMC também não apresentaram diferenças significativas no grupo controle de *KCNJ11* Glu23Lys. A análise estatística revelou que os níveis colesterol total são mais baixos em indivíduos homocigotos para o alelo *KCNJ11* Lys/Lys ($p=0,0338$). Verificou-se que esses indivíduos ainda possuem níveis de

HbA1c mais elevados que portadores do genótipo selvagem *KCNJ11* Glu23 ($p=0,0091$), como observado na Tabela 4. Para *ABCC8* Ser1369Ala não se observou diferença nos níveis de glicose, colesterol, HDL, triglicerídeos e IMC no grupo controle. Como apresentado na Tabela 4, os níveis de HbA1c foram consideravelmente mais elevados apenas em homozigotos Ala1369 quando comparados a homozigotos Ser1369 ($p=0,0306$).

Entre os pacientes que não fazem uso de insulina em combinação com sulfoniluréias o IMC foi significativamente mais baixo naqueles que possuem duas cópias de alelos mutantes para ambos os genes, exceto mutantes de *KCNJ11* Glu23Lys quando comparado a homozigotos (*KCNJ11* Lys/Lys vs. Glu/Lys $p=0,0328$; Lys/Lys vs. Glu/Glu $p=0,0641$; e *ABCC8* Ala/Ala vs. Ser/Ala $p=0,0191$; Ala/Ala vs. Ser/Ser $p=0,0383$).

Tabela 4: Características clínicas e bioquímicas dos diferentes genótipos dos polimorfismos *KCNJ11* Glu23Lys no grupo de pacientes e controles. Dados apresentados como média \pm erro padrão (SEM).

Características	Casos				p	Controles			
	Glu/Glu	Glu/Lys	Lys/Lys			Glu/Glu	Glu/Lys	Lys/Lys	p
Glicemia em jejum (mmol/L)	9,5 \pm 0,41	9,9 \pm 0,51	8,1 \pm 0,95	0,269	5,1 \pm 0,09	5,0 \pm 0,13	5,1 \pm 0,22	0,451	
Colesterol Total (mmol/L)	5,7 \pm 0,15	6,0 \pm 0,22	5,6 \pm 0,35	0,743	5,2 \pm 0,13	5,3 \pm 0,13	4,4 \pm 0,12	0,034*	
Triglicerídeos (mmol/L)	2,3 \pm 0,12	2,5 \pm 0,16	1,9 \pm 0,14	0,427	1,8 \pm 0,06	1,7 \pm 0,07	1,6 \pm 0,15	0,493	
Colesterol HDL (mmol/L)	1,3 \pm 0,04	1,3 \pm 0,04	1,3 \pm 0,08	0,885	1,3 \pm 0,03	1,4 \pm 0,04	1,3 \pm 0,03	0,117	
Colesterol LDL (mmol/L)	3,4 \pm 0,16	3,4 \pm 0,20	3,7 \pm 0,25	0,780	3,2 \pm 0,12	3,2 \pm 0,12	2,7 \pm 0,24	0,066	
HbA1C (%)	8,0 \pm 0,27	8,6 \pm 0,33	7,6 \pm 0,53	0,289	4,3 \pm 0,11	4,5 \pm 0,16	5,1 \pm 0,15	0,046*	
HbA1C (mmol/mol)	64 \pm 2,9	70 \pm 3,7	59 \pm 5,8	0,289	22 \pm 0,95	26 \pm 1,8	34 \pm 1,8	0,009*	
IMC (peso[kg]/altura[m] ²)	26,9 \pm 0,47	26,7 \pm 0,41	24,8 \pm 1,26	0,192	24,8 \pm 0,46	24,4 \pm 0,49	25,1 \pm 0,97	0,645	

* Valores que atingiram significância em ANOVA com múltiplas comparações *post hoc*.

Tabela 5: Características clínicas e bioquímicas dos diferentes genótipos do polimorfismo *ABCC8* Ser1369Ala no grupo de pacientes e controles. Dados apresentados como média \pm erro padrão (SEM).

Características	Casos				p	Controles			
	Ser/Ser	Ser/Ala	Ala/Ala			Ser/Ser	Ser/Ala	Ala/Ala	p
Glicemia em jejum (mmol/L)	9,7 \pm 0,41	9,6 \pm 0,47	7,9 \pm 0,85	0,231	5,1 \pm 0,10	5,2 \pm 0,14	4,9 \pm 0,19	0,915	
Colesterol Total (mmol/L)	5,8 \pm 0,14	5,6 \pm 0,22	5,6 \pm 0,33	0,642	5,2 \pm 0,12	5,2 \pm 0,13	4,5 \pm 0,16	0,064	
Triglicerídeos (mmol/L)	2,3 \pm 0,11	2,4 \pm 0,17	1,9 \pm 0,16	0,669	1,8 \pm 0,06	1,8 \pm 0,06	1,4 \pm 0,20	0,322	
Colesterol HDL (mmol/L)	1,3 \pm 0,04	1,2 \pm 0,05	1,3 \pm 0,08	0,404	1,4 \pm 0,04	1,3 \pm 0,03	1,2 \pm 0,09	0,389	
Colesterol LDL (mmol/L)	3,4 \pm 0,15	3,1 \pm 0,20	3,6 \pm 0,24	0,087	3,1 \pm 0,12	3,2 \pm 0,12	3,0 \pm 0,36	0,711	
HbA1C (%)	8,1 \pm 0,27	8,4 \pm 0,32	7,6 \pm 0,53	0,404	4,2 \pm 0,09	4,5 \pm 0,16	5,0 \pm 0,21	0,031*	
HbA1C (mmol/mol)	65 \pm 3,0	68 \pm 3,5	59 \pm 5,9	0,404	23 \pm 1,0	27 \pm 1,6	31 \pm 2,3	0,021*	
IMC (peso[kg]/altura[m] ²)	26,7 \pm 0,37	26,7 \pm 0,45	24,7 \pm 1,18	0,114	24,6 \pm 0,44	24,5 \pm 0,48	25,2 \pm 1,39	0,820	

* Valores que atingiram significância em ANOVA com múltiplas comparações *post hoc*.

DISCUSSÃO

O presente estudo avaliou a associação dos polimorfismos *KCNJ11* Glu23Lys e *ABCC8* Ser1369Ala com o desenvolvimento de DM2 e suas relações com variáveis clínicas e bioquímicas em uma população do nordeste brasileiro. A população do estado do Piauí é uma população miscigenada, tendo contribuições étnicas de populações africanas, ameríndias e europeias [24]. Ao nosso conhecimento, até o presente momento nenhum estudo avaliou simultaneamente esses polimorfismos e a possibilidade de sua interação em associação com o DM2 em uma população brasileira. Outros estudos avaliaram apenas a influência em casos de hiperinsulinemia congênita, diabetes permanente e transiente em neonatos [25–28].

Apesar da presença do alelo mutante ser mais frequente no grupo de portadores de DM2 em ambos os polimorfismos, essa diferença não se mostrou significativa (*KCNJ11* $p=0,786$ e *ABCC8* $p=0,215$). Ainda que estudos tenham encontrado fortes associações dos alelos *KCNJ11* Lys23 e *ABCC8* Ala1369 com uma suscetibilidade aumentada ao DM2 em populações caucasianas e japonesas [6, 14], nossos resultados não indicaram essa correlação. Da mesma forma, um estudo realizado em uma população da Rússia não conseguiu estabelecer correlação entre os genótipos e a predisposição a desenvolver DM2; no entanto, apontou que o haplótipo Lys23/Ala1369 está associado com a predisposição ao DM2 naquela população (OR = 1,52; IC 95% 1,04–2,24; $p = 0,03$) [13].

Assim como observado em outras populações, em nosso estudo esses dois polimorfismos são geneticamente indistinguíveis devido ao seu forte desequilíbrio de ligação ($D'=0,911$ e $r^2=0,779$), não sendo possível dessa forma, estabelecer qual dos dois teria maior influência sobre as variáveis de risco [13, 14]. Porém, nem mesmo o efeito do haplótipo Lys23/Ala1369, considerado uma variável de risco [21, 29], mostrou-se significativo para o desenvolvimento de DM2 em nossa população ($p=0,3109$). Mesmo em populações caucasianas, onde essa correlação por diversas vezes foi observada, existem estudos com resultados similares ao nosso, onde as variáveis Lys23 e Ala1369 não foram associadas ao risco de DM2 [22, 30, 31]. Tais resultados podem ser reflexo de interações com outros alelos, fatores ambientais ou mesmo pela diversidade étnica [32].

Quanto às variáveis de risco, nenhuma correlação significativa foi encontrada no grupo caso. Entretanto os níveis mais altos de HbA1c observados no grupo controle ($p=0,046$ e $p=0,031$) corroboram com estudos prospectivos anteriormente realizados, os quais foram capazes de identificar que esses polimorfismos são capazes de influenciar a progressão para o estado pré-diabético, sendo que essa influência não é percebida na progressão para o DM2 [16, 17]. Embora nossos controles não sejam considerados pré-diabéticos, fica evidente que esses níveis são influenciados por esses polimorfismos. Por outro lado, foi observado uma diminuição dos níveis de colesterol total em controles que possuem o genótipo *KCNJ11* Lys/Lys quando comparado a Glu/Glu ou Glu/Lys ($p=0,034$).

É possível que parte dos achados relatados sobre esses polimorfismos seja consequência da interação entre *ABCC8* Ser1369Ala e *KCNJ11* Glu23Lys. No entanto, surgem questionamentos sobre qual dos dois teria uma maior influência na suscetibilidade ao DM2. No entanto, estudos recentes com experimentos comparativos *in vitro* apontaram que *ABCC8* Ala1369 e não *KCNJ11* Lys23 seria responsável pela diminuição da inibição do canal por ATP, sugerindo que a função de *ABCC8* no desenvolvimento do diabetes estaria sendo subestimada [33, 34]. Por outro lado, podemos encontrar na literatura estudos que só conseguiram associar *KCNJ11* Lys23, mas não *ABCC8* Ala1369 ao DM2 [31].

A análise estatística mostrou que os níveis de HbA1c são mais elevados em indivíduos que possuem os genótipos *KCNJ11* Lys/Lys e *ABCC8* Ala/Ala quando comparados aos genótipos *KCNJ11* Glu/Glu ($p=0,001$) ou Glu/Lys ($p=0,032$) e *ABCC8* Ser/Ser ($p=0,019$), respectivamente, mas não quando comparados a heterozigotos *ABCC8* Ser/Ala ($p=0,236$). Os homozigotos selvagens *ABCC8* Ser/Ser também não diferiram significativamente do genótipo Ser/Ala ($p=0,080$). Os valores observados nos heterozigotos sugerem que estes genes apresentam uma herança intermediária, o que pode explicar o fato de alguns estudos encontrarem associação quando usam um modelo recessivo para análise, enquanto em outros melhores resultados são obtidos usando modelos dominantes [14, 33].

Dentre os fatores de risco para o diabetes destaca-se a obesidade, já que atualmente, não encontramos discordância quanto à sua associação ao DM2, a qual tem sido mostrada em alguns estudos [35–38]. É bem estabelecido que diversos

medicamentos usados no controle glicêmico levam o paciente a um ganho de peso. É por essa razão que o uso de sulfoniluréias é recomendado a pacientes não-obesos [39, 40]. Estudos prospectivos apontam que cerca de 15 a 20% dos casos de diabetes ocorrem em pessoas com peso normal e IMC < 25 Kg/m². Muitas dessas pessoas não-obesas que apresentam um risco aumentado para DM2 podem ser classificadas como “pessoas metabolicamente obesas de peso normal”. Tal condição sugere fortemente que o desenvolvimento do DM2 possa estar sendo influenciado por fatores genéticos [41]. Apesar de o uso de insulina ser comumente recomendado para pacientes com DM tipo 1 em alguns casos a escolha desta terapia se faz necessário para portadores de DM2 [42]. No entanto, é relatado que o uso de insulina, principalmente em combinação com sulfoniluréias promove ganho de peso, o que não é observado em quando em combinação com metformina [43, 44]. Para verificar se os polimorfismos *KCNJ11* Lys23 e *ABCC8* Ala1369 são mais frequentes em pacientes não-obesos excluimos de nosso rol de dados pacientes que faziam uso de sulfoniluréias em combinação com insulina (n=17) e repetimos as análises. Dessa forma pudemos observar que pacientes com DM2 que possuem os genótipos *KCNJ11* Lys/Lys e *ABCC8* Ala/Ala apresentam um IMC significativamente mais baixo que portadores dos genótipos *KCNJ11* Glu/Glu (p=0,0003) ou Glu/Lys (p=0,0003) e *ABCC8* Ser/Ser (p=0,015) ou Ala/Ser (p=0,008).

Em suma, nosso estudo não aponta correlações significativas entre os polimorfismos *KCNJ11* Glu23Lys e *ABCC8* Ser1369Ala com uma suscetibilidade aumentada para o DM2. No entanto, as diferenças apresentadas por algumas das variáveis analisadas entre os diferentes genótipos sugerem que os polimorfismos abordados desempenham um papel importante no curso dessa doença traçando um caminho mais rápido para o estado pré-diabético ou facilitando o desenvolvimento de DM2 em pacientes não-obesos. Os haplótipos também não parecem afetar a predisposição para o DM2 na população. Os achados precisam ser confirmados em estudos maiores de replicação que compreendem diferentes populações, particularmente em outras populações miscigenadas brasileiras. É importante que outros polimorfismos que estejam em desequilíbrio de ligação com *KCNJ11* e *ABCC8* sejam estudados para que se possa identificar blocos haplotípicos mais robustos capazes de ajudar a esclarecer o papel dos diversos polimorfismos associados ao DM2.

Referencias

1. Drouin P, Blicke JF, Charbonnel B, et al. (2009) Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 32:S62–S67. doi: 10.2337/dc09-S062
2. International Diabetes Federation (2015) *International Diabetes Atlas*, 7th ed. Brussels, Belgium
3. World Health Organization (2014) *Global Health Estimates : Death by cause, age, sex and country, 2000 -2012*. WHO. In: Geneva.
4. Sun X, Yu W, Hu C (2014) Genetics of Type 2 Diabetes: Insights into the Pathogenesis and Its Clinical Application. *Biomed Res Int* 2014:1–15. doi: 10.1155/2014/926713
5. Lebrón-Aldea D, Dhurandhar EJ, Pérez-Rodríguez P, et al. (2015) Integrated genomic and BMI analysis for type 2 diabetes risk assessment. *Front Genet* 6:75. doi: 10.3389/fgene.2015.00075
6. Qi Q, Hu FB (2012) Genetics of type 2 diabetes in European populations. *J Diabetes* 4:203–212. doi: 10.1111/j.1753-0407.2012.00224.x
7. Kapoor RR, Flanagan SE, James CT, et al. (2011) Hyperinsulinaemic hypoglycaemia and diabetes mellitus due to dominant ABCC8/KCNJ11 mutations. *Diabetologia* 54:2575–83. doi: 10.1007/s00125-011-2207-4
8. Phani NM, Guddattu V, Bellampalli R, et al. (2014) Population Specific Impact of Genetic Variants in KCNJ11 Gene to Type 2 Diabetes: A Case-Control and Meta-Analysis Study. *PLoS One* 9:1–11. doi: 10.1371/journal.pone.0107021
9. Qin LJ, Lv Y, Huang QY (2013) Meta-analysis of association of common variants in the KCNJ11-ABCC8 region with type 2 diabetes. *Genet Mol Res* 12:2990–3002. doi: 10.4238/2013.August.20.1
10. Haghverdizadeh P, Sadat Haerian M, Haghverdizadeh P, Sadat Haerian B (2014) ABCC8 genetic variants and risk of diabetes mellitus. *Gene* 545:198–204. doi: 10.1016/j.gene.2014.04.040
11. Zou C-Y, Gong Y, Liang J (2014) Metabolic signaling of insulin secretion by pancreatic β -cell and its derangement in type 2 diabetes. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 18:2215–27.
12. Bonfanti DH, Alcazar LP, Arakaki PA, et al. (2015) ATP-dependent potassium channels and type 2 diabetes mellitus. *Clin Biochem* 48:476–82. doi: 10.1016/j.clinbiochem.2014.12.026
13. Sokolova EA, Bondar IA, Shabelnikova OY, et al. (2015) Replication of KCNJ11 (p.E23K) and ABCC8 (p.S1369A) Association in Russian Diabetes Mellitus 2 Type Cohort and Meta-Analysis. *PLoS One* 10:e0124662. doi: 10.1371/journal.pone.0124662
14. Sakamoto Y, Inoue H, Keshavarz P, et al. (2007) SNPs in the KCNJ11-ABCC8 gene locus are associated with type 2 diabetes and blood pressure levels in the Japanese population. *J Hum Genet* 52:781–93. doi: 10.1007/s10038-007-

0190-x

15. Li Y-Y (2013) The KCNJ11 E23K gene polymorphism and type 2 diabetes mellitus in the Chinese Han population: a meta-analysis of 6,109 subjects. *Mol Biol Rep* 40:141–6. doi: 10.1007/s11033-012-2042-9
16. Cheung CYY, Tso AWK, Cheung BMY, et al. (2011) The KCNJ11 E23K polymorphism and progression of glycaemia in Southern Chinese: A long-term prospective study. *PLoS One* 6:1–7. doi: 10.1371/journal.pone.0028598
17. Florez JC, Jablonski KA, Kahn SE, et al. (2007) Type 2 Diabetes-Associated Missense Polymorphisms KCNJ11 E23K and ABCC8 A1369S Influence Progression to Diabetes and Response to Interventions in the Diabetes Prevention Program. *Diabetes* 56:531–536. doi: 10.2337/db06-0966
18. Ribalet B, John SA, Weiss JN (2003) Molecular basis for Kir6.2 channel inhibition by adenine nucleotides. *Biophys J* 84:266–276. doi: 10.1016/S0006-3495(03)74847-4
19. Schwanstecher C, Meyer U, Schwanstecher M (2002) KIR6.2 Polymorphism Predisposes to Type 2 Diabetes by Inducing Overactivity of Pancreatic β -Cell ATP-Sensitive K^+ Channels. *Diabetes* 51:875–879. doi: 10.2337/diabetes.51.3.875
20. Fatehi M, Raja M, Carter C, et al. (2012) The ATP-sensitive K^+ channel ABCC8 S1369A type 2 diabetes risk variant increases MgATPase activity. *Diabetes* 61:241–249. doi: 10.2337/db11-0371
21. Hamming KSC, Soliman D, Matemisz LC, et al. (2009) Coexpression of the Type 2 Diabetes Susceptibility Gene ATP and Sulfonylurea Sensitivities of the ATP-Sensitive K^+ Channel. *Diabetes* 58:2419–24. doi: 10.2337/db09-0143.K.S.C.H.
22. Gonen MS, Arikoglu H, Erkoc Kaya D, et al. (2012) Effects of single nucleotide polymorphisms in K(ATP) channel genes on type 2 diabetes in a Turkish population. *Arch Med Res* 43:317–323. doi: 10.1016/j.arcmed.2012.06.001
23. Sociedade Brasileira de Diabetes (2014) Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes: 2013-2014. AC Farmacêutica, São Paulo
24. Lopes TR, Santos S, Ribeiro-dos-Santos Â, et al. (2014) Population data of the 46 insertion–deletion (INDEL) loci in population in Piauí State, Northeastern Brazil. *Forensic Sci Int Genet* 9:e13–e15. doi: 10.1016/j.fsigen.2013.07.009
25. Lovisolo SM, Mendonça BB, Pinto EM, et al. (2010) Congenital Hyperinsulinism in Brazilian Neonates: A Study of Histology, KATP Channel Genes, and Proliferation of β Cells. *Pediatr Dev Pathol* 13:375–384. doi: 10.2350/08-12-0578.1
26. Del Roio Liberatore R, Ramos P, Guerra G, et al. (2015) Clinical and molecular data from 61 Brazilian cases of Congenital Hyperinsulinemic Hypoglycemia. *Diabetol Metab Syndr* 7:5. doi: 10.1186/1758-5996-7-5
27. Esquiaveto-Aun AM, De Mello MP, Paulino MFVM, et al. (2015) A new compound heterozygosis for inactivating mutations in the glucokinase gene as

- cause of permanent neonatal diabetes mellitus (PNDM) in double-first cousins. *Diabetol Metab Syndr* 7:101. doi: 10.1186/s13098-015-0101-9
28. Alves C, Flanagan SE, Ellard S, Mackay DJ (2012) Clinical and molecular basis of transient neonatal diabetes mellitus in Brazilian children. *Diabetes Res Clin Pract* 97:e41–e44. doi: 10.1016/j.diabres.2012.05.025
 29. Lang VY, Fatehi M, Light PE (2012) Pharmacogenomic analysis of ATP-sensitive potassium channels coexpressing the common type 2 diabetes risk variants E23K and S1369A. *Pharmacogenet Genomics* 22:206–14. doi: 10.1097/FPC.0b013e32835001e7
 30. Cejková P, Novota P, Cerná M, et al. (2007) KCNJ11 E23K polymorphism and diabetes mellitus with adult onset in Czech patients. *Folia Biol (Praha)* 53:173–5. doi: FB2007A0025 [pii]
 31. van Dam RM, Hoebee B, Seidell JC, et al. (2005) Common variants in the ATP-sensitive K⁺ channel genes KCNJ11 (Kir6.2) and ABCC8 (SUR1) in relation to glucose intolerance: population-based studies and meta-analyses. *Diabet Med* 22:590–8. doi: 10.1111/j.1464-5491.2005.01465.x
 32. Qiu L, Na R, Xu R, et al. (2014) Quantitative assessment of the effect of KCNJ11 gene polymorphism on the risk of type 2 diabetes. *PLoS One* 9:1–9. doi: 10.1371/journal.pone.0093961
 33. Florez JC, Burt N, de Bakker PIW, et al. (2004) Haplotype Structure and Genotype-Phenotype Correlations of the Sulfonylurea Receptor and the Islet ATP-Sensitive Potassium Channel Gene Region. *Diabetes* 53:1360–1368. doi: 10.2337/diabetes.53.5.1360
 34. ODGEREL Z, LGLU/Glu HS, ERDENEBILEG N, et al. (2012) Genetic variants in potassium channels are associated with type 2 diabetes in a Mongolian population. *J Diabetes* 4:238–242. doi: 10.1111/j.1753-0407.2011.00177.x
 35. Toro R, Segura E, Nuñez-Cortes JM, et al. (2015) Relationship between lipoprotein (a) and micro/macro complications in type 2 diabetes mellitus: a forgotten target. *J Geriatr Cardiol* 12:93–9. doi: 10.11909/j.issn.1671-5411.2015.02.001
 36. Ghoshal K, Bhattacharyya M (2015) Adiponectin: Probe of the molecular paradigm associating diabetes and obesity. *World J Diabetes* 6:151–66. doi: 10.4239/wjd.v6.i1.151
 37. Algoblan A, Alalfi M, Khan M (2014) Mechanism linking diabetes mellitus and obesity. *Diabetes, Metab Syndr Obes Targets Ther* 7:587. doi: 10.2147/DMSO.S67400
 38. Locke A, Kahali B, Berndt S, et al. (2015) Genetic studies of body mass index yield new insights for obesity biology. *Nature* 518:197–206. doi: 10.1038/nature14177.Genetic
 39. Naidoo P, Rambiritch V, Butkow N, Saman S (2014) Optimal utilisation of sulphonylureas in resource-constrained settings. *Cardiovasc J Afr* 25:83–5. doi: 10.5830/CVJA-2014-007

40. McIntosh B, Cameron C, Singh SR, et al. (2012) Choice of therapy in patients with type 2 diabetes inadequately controlled with metformin and a sulphonylurea: a systematic review and mixed-treatment comparison meta-analysis. *Open Med* 6:e62–74.
41. Eckel N, Mühlenbruch K, Meidtner K, et al. (2015) Characterization of metabolically unhealthy normal-weight individuals: Risk factors and their associations with type 2 diabetes. *Metabolism* 64:862–71. doi: 10.1016/j.metabol.2015.03.009
42. HAMATY M (2011) Insulin treatment for type 2 diabetes: When to start, which to use. *Cleve Clin J Med* 78:332–342. doi: 10.3949/ccjm.78a.10051
43. John M, Gopinath D, Jagesh R (2016) Sodium-glucose cotransporter 2 inhibitors with insulin in type 2 diabetes: Clinical perspectives. *Indian J Endocrinol Metab* 20:22. doi: 10.4103/2230-8210.172268
44. Yki-Järvinen H, Ryysy L, Nikkilä K, et al. (1999) Comparison of bedtime insulin regimens in patients with type 2 diabetes mellitus. A randomized, controlled trial. *Ann Intern Med* 130:389–96.