

Escola Superior de Tecnologia da Saúde do Porto
Instituto Politécnico do Porto

**Associação entre o polimorfismo
Inserção/Delecção da Enzima Conversora da
Angiotensina na Diabetes *mellitus* tipo 2: estudo
da população portuguesa**

*Association between the Angiotensin Converting Enzyme
Insertion/Deletion polymorphism and type 2 Diabetes: portuguese
population study*

Dissertação submetida à Escola Superior de Tecnologia da Saúde do Porto para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Tecnologia Bioquímica em Saúde, realizada sob a orientação científica de Doutor Ruben Fernandes, Prof. Adjunto, Área das Ciências e das Biomoléculas e Mestre Nuno Silva, Docente Equiparado a Assistente de 1º Triénio, Área das Ciências Químicas e das Biomoléculas.

Ana Luísa Pinto da Silva

Setembro 2011

Agradecimentos

Embora uma tese seja, sobretudo, um trabalho individual há contributos que não podem ser esquecidos, nem deixar de ser realçados. Por essa razão, gostaria de agradecer àqueles que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho. Em particular:

Ao Prof. Doutor Ruben Fernandes, pela compreensão e confiança depositada em todo o grupo, sem a qual a realização deste trabalho não seria possível. Muito obrigada!

Ao Mestre Nuno Silva, co-orientador desta tese de Mestrado, pela inestimável ajuda. Por ter estado sempre presente e pela disponibilidade demonstrada em todas as fases deste trabalho. Obrigada pelo empenho, dedicação e pela boa-disposição, mesmo nos momentos em que precisei de um “empurrãozinho”.

À Ana Karina Lopes pela ajuda imprescindível (e altruísta como sempre) na obtenção da amostra.

Ao Pedro Coelho e à Joana Almeida por todo o apoio e companhia nas infindáveis horas laboratoriais.

À Joana Marisela Sousa por toda a paciência, compreensão e ajuda no desenvolvimento do tratamento estatístico.

Obrigada a todos!

Resumo

A Diabetes *mellitus* tipo 2 (DM2) é uma patologia de etiologia múltipla à qual estão associados vários factores genéticos. A Enzima Conversora da Angiotensina (ECA) tem sido alvo de vários estudos pela sua relação com factores pró-inflamatórios, pró-oxidantes e pró-fibrose, sendo o polimorfismo de Inserção/Delecção o mais estudado. Neste contexto, o objectivo deste estudo é assim verificar a distribuição deste polimorfismo numa amostra de indivíduos de nacionalidade portuguesa e verificar a sua possível associação com a DM2.

Para tal, foram analisadas 87 amostras (controlos n =24 e diabéticos n =63) de indivíduos de nacionalidade portuguesa. As amostras foram submetidas a um processo de extracção de ADN, sendo posteriormente amplificadas por *Polymerase Chain Reaction* e analisadas por eletroforese em gel de agarose a 1%.

Observou-se uma prevalência de 8% (n=7) com genótipo I/I, 38% (n=33) com genótipo I/D e 54% (n=47) com genótipo D/D. A amostra em estudo demonstrou assim estar sob o equilíbrio Hardy-Weinberg. Observou-se também uma associação entre níveis mais elevados de glicemia e o genótipo I/I ($p=0,019$). Na análise da utilização de insulina no controlo dos níveis de glicemia na DM2, observou-se uma maior proporção de indivíduos com genótipo D/D.

Este estudo demonstra a importância do investimento da caracterização genética em patologias metabólicas multifactoriais como a DM2.

Abstract

Type 2 Diabetes (T2DM) is a multiple etiology disease to which are associated several genetic factors. Angiotensin Converting Enzyme (ACE) has been the subject of many studies for its association with pro-inflammatory, pro-oxidant and pro-fibrosis factors. The Insertion/Deletion polymorphism has attracted significant attention being one of the most investigated polymorphisms. In this context, the aim of this study is to investigate the distribution of this polymorphism in a sample of Portuguese citizens and to study the possible association between the I/D polymorphism and T2DM.

Eighty seven samples were analyzed (controls n=24 and diabetics n=63). The collected samples were subjected to DNA extraction and were amplified by *Polymerase Chain Reaction* (PCR). After PCR amplification all samples were analyzed by electrophoresis in agarose gel 1%.

The genotype frequencies were I/I - 8% (n=7), I/D - 38% (n=33), and D/D - 54% (n=47), demonstrating that the study sample is under the Hardy-Weinberg equilibrium. There was an association between higher blood glucose levels and I/I genotype (p=0,019). When analyzed the use of insulin to control blood glucose levels in T2DM there was a higher proportion of individuals with D/D genotype.

This study demonstrates the importance of investment in genetic characterization of multifactorial metabolic diseases like diabetes.

Índice

Introdução.....	3
Capítulo 1: Estado da Arte	9
1.1 A Diabetes <i>mellitus</i>	9
1.2 Enzima Conversora da Angiotensina – do gene à função proteica.....	16
1.3 Polimorfismos da Enzima Conversora da Angiotensina – potenciais efeitos biológicos.....	19
1.4 Objectivos	24
Capítulo 2: Metodologia.....	29
2.1 Amostra.....	29
2.2 Parâmetros Bioquímicos	29
2.3 Extracção de ADN	30
2.4 Amplificação genética em PCR.....	31
2.5 Tampões e Soluções.....	34
2.6 Análise Estatística.....	38
Capítulo 3: Resultados.....	45
3.1 Caracterização da amostra e parâmetros bioquímicos	45
3.2 Amplificação de genes por PCR e electroforese.....	47
3.3 Relação entre Diabetes <i>mellitus</i> e Polimorfismo I/D.....	48
Capítulo 4: Discussão.....	67
4.1 Parâmetros Bioquímicos	67
4.2 Genotipagem.....	68

4.3 Polimorfismo ECA e DM	68
4.3.1 Polimorfismo e níveis de glicemia.....	69
4.3.2 Polimorfismo I/D e insulinoterapia.....	70
4.3.3 Polimorfismo I/D na DM e HTA	71
4.4 Limitações do estudo	72
Capítulo 5: Conclusão	75
Capítulo 6: Referências bibliográficas	81

Índice de Abreviaturas

ADO – Antidiabéticos Orais

ANG I – Angiotensina I

ANG II – Angiotensina II

AVC – Acidente Vascular Cerebral

BRA – Bloqueadores do Receptor da Angiotensina II

DM – Diabetes *Mellitus*

DM1 - Diabetes *Mellitus* Tipo 1

DM2 - Diabetes *Mellitus* Tipo 2

ECA – Enzima Conversora da Angiotensina

EDTA- Acido etilenodiaminotetra-acetico

EtBr - Brometo de Etídio

gECA - Enzima Conversora da Angiotensina germinal

HTA – Hipertensão Arterial

I/D – Inserção/Delecção

IECA – Inibidores da Enzima Conversora da Angiotensina

LD – *Linkage desequilibrium*

PCR - *Polymerase Chain Reaction*

RAAS – Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona

SDS - Dodecil sulfato de sódio

sECA - Enzima Conversora da Angiotensina somática

SNP – *Single Nucleotide Polymorphism*

TAE - TRIS-Ácido acético-EDTA

TE – Tris-EDTA

tECA – Enzima Conversora da Angiotensina testicular

TRIS- Tris(hidroximetil)aminometano

Índice de Quadros

Quadro I - Valores analíticos de referência para a DM.	12
Quadro II – Programas de amplificação utilizados.	33
Quadro III – N° de casos e frequência relativa de cada genótipo na amostra em estudo.	48
Quadro IV - Frequência de cada genótipo nos indivíduos diabéticos e não-diabéticos.	50

Índice de Figuras

Figura 1 - Alterações metabólicas do organismo na DM. Adaptado de: (Dean e McEntyre, 2004).....	10
Figura 2 - Integração dos sistemas renina-angiotensina-aldosterona e cinina-caliceína. Adaptado de: (Sayed-Tabatabaei et al., 2006).....	18
Figura 3 – Reacção de PCR convencional. Legenda: A – Dupla cadeia de ADN. B – Amplificação inicial dos alelos I e D. C – Amplificação específica do alelo I. D – Produto final da amplificação (alelo I).....	32
Figura 4 - Média dos valores de colesterol total para a totalidade dos indivíduos que constituíam a amostra (n=87), controlos (n=24) e diabéticos (n=63).	46
Figura 5 - Média dos valores de colesterol total para os indivíduos com DM1 (n=12) e DM2 (n=51).....	46
Figura 6 - Em cima: Amplificação inicial por para detecção do polimorfismo I/D; Em baixo: Amplificação específica para o alelo I. Legenda: M – Marcador de Peso Molecular; B – Ensaio em Branco; C – Controlo (Polimorfismo ID em ambos os casos); DD – Polimorfismo deleção/deleção; ID – Polimorfismo inserção/deleção; II – Polimorfismo inserção/inserção.	47
Figura 7 – Número de indivíduos em que ocorre cada genótipo na amostra em estudo.	48
Figura 8 - Frequência relativa (%) de cada genótipo em indivíduos diabéticos e não diabéticos.....	49
Figura 9 - Frequência relativa (%) de cada genótipo em indivíduos com DM1 e DM2.	51
Figura 10 - Níveis médios de glicemia nos indivíduos com DM1 e DM2.....	52
Figura 11 - Níveis médios de glicemia em função do genótipo.	53
Figura 12 - Níveis de glicemia e sua relação com o genótipo em indivíduos diabéticos e não-diabéticos. *Sem desvio-padrão (n=1)	54
Figura 13 - Níveis de glicemia e sua relação com o genótipo em indivíduos com DM1 e DM2.....	55
Figura 14 - Frequência relativa (%) de indivíduos insulino-dependentes em DM2.....	56
Figura 15 - Frequência relativa (%) de cada genótipo em indivíduos insulino-dependentes e não-insulino-dependentes.	57
Figura 16 - Frequência relativa (%) de cada genótipo em indivíduos insulino-dependentes e não-insulino-dependentes com DM2.	58

Figura 17 – Frequência relativa (%) de indivíduos onde ocorre co-existência de DM e HTA na amostra em estudo.	59
Figura 18 - Frequência relativa (%) de indivíduos com DM2 onde ocorre co-existência de DM e HTA.	60

INTRODUÇÃO

Introdução

Em Portugal, no ano de 2009, existiam 983 mil indivíduos com Diabetes *mellitus* (DM). A nível mundial este número ascende aos 200 milhões de indivíduos, perspectivando-se que este número duplique até 2030 (SPD, 2010, WHO, 2006).

A DM é uma doença crónica que abrange a população numa larga escala de idades exigindo uma elevada atenção e importantes medidas de educação por parte, quer dos doentes, quer dos profissionais de saúde que com ela lidam diariamente.

Esta patologia acarreta elevados custos devido aos cuidados de saúde continuados necessários na tentativa de redução do número de complicações associadas e que afectam o desempenho social e profissional dos doentes. Só em 2009 morreram 4603 portugueses devido a complicações associadas à DM (SPD, 2010).

Durante anos, várias tentativas têm sido feitas para desvendar a base genética da DM, tentando perceber quais os indivíduos mais susceptíveis de desenvolverem esta patologia. A compreensão da DM a este nível permitiria estabelecer um diagnóstico precoce e implementar estratégias de prevenção mais eficazes. Desta forma, seria possível atenuar ou travar a sua evolução e, assim, aumentar a esperança média de vida destes indivíduos.

O objectivo deste estudo é contribuir para a percepção do envolvimento genético no aparecimento e evolução desta doença.

ESTADO DA ARTE

Capítulo 1: Estado da Arte	9
1.1 A Diabetes <i>mellitus</i>	9
1.2 Enzima Conversora da Angiotensina – do gene à função proteica.....	16
1.3 Polimorfismos da Enzima Conversora da Angiotensina – potenciais efeitos biológicos.....	19
1.4 Objectivos	24

Capítulo 1: Estado da Arte

1.1 A Diabetes *mellitus*

A DM é uma doença metabólica de etiologia múltipla. Esta patologia tem como característica principal a hiperglicemia crónica, sendo esta o resultado de uma deficiente acção ou produção de insulina. Desta forma, os indivíduos com DM possuem uma alteração no metabolismo dos hidratos de carbono, lípidos e proteínas (A.D.A., 2006).

1.1.1 Metabolismo e Patofisiologia

A glicose é uma importante fonte energética, sendo o resultado do catabolismo de hidratos de carbono provenientes maioritariamente da dieta. Quando a ingestão de hidratos de carbono é superior ao gasto energético do indivíduo, a glicose é transformada em glicogénio e triglicéridos sendo armazenada no fígado ou nos adipócitos, respectivamente. Por outro lado, quando o gasto energético é superior à ingestão calórica, há formação de glicose através do catabolismo das reservas energéticas indicadas (Burtis e Ashwood, 2006).

A homeostase dos níveis de glicose, para além de outros factores, pode ser regulada pelas hormonas insulina, glicagina e epinefrina. Estas são responsáveis pelo aumento ou diminuição da produção de glicose e pela captação celular de acordo com as necessidades do organismo. Desta forma, a manutenção dos níveis de glicose depende da capacidade funcional do pâncreas (responsável pela produção das hormonas insulina e glicagina), da correcta utilização da glicose pelos tecidos periféricos e da capacidade inibitória da insulina sobre a produção de glicose pelo pâncreas (Burtis e Ashwood, 2006).

Na DM a deficiente acção/produção de insulina leva ao aumento dos níveis de glicagina, resultando na sobreprodução e subaproveitamento da glicose existente. O

aumento do rácio glicagina/insulina contraria os efeitos hepáticos da insulina, havendo uma estimulação de processos como a glicogenólise e a gliconeogénese que origina o principal sintoma associado à DM – hiperglicemia (Brunton, 2008). Quando a concentração de glicose excede a capacidade de reabsorção dos túbulos renais, esta é excretada juntamente com água pela urina (glicosúria), originando poliúria e sede (Alberti, 1999).

Nos indivíduos saudáveis, a insulina inibe a enzima lipase existente no tecido adiposo, inibindo a hidrólise de triglicérideos. Na DM esta função está comprometida, havendo um catabolismo descontrolado de lípidos e proteínas, originando um aumento da produção de acetil-coA por β -oxidação. Como consequência, ocorre um aumento da cetogénese e da formação de corpos cetónicos que, em elevada concentração, tornam o rim incapaz de manter o equilíbrio ácido-base. Desta forma, há uma diminuição do pH e desidratação (cetoacidose), que em última instância podem levar à letargia, coma ou morte (Berg e Stryer, 2002).

A insulina é também responsável pela estimulação da síntese proteica, pelo que diminui a circulação de aminoácidos livres. Na DM, há uma maior degradação proteica, havendo formação de aminoácidos como a glutamina e alanina, importantes precursores da via da gliconeogénese. Como resultado, além do aumento da conversão de alanina a glicose, há também um aumento da produção e excreção de produtos metabólicos como a ureia e amónia (Brunton, 2008). A figura 1 apresenta as principais alterações metabólicas na DM.

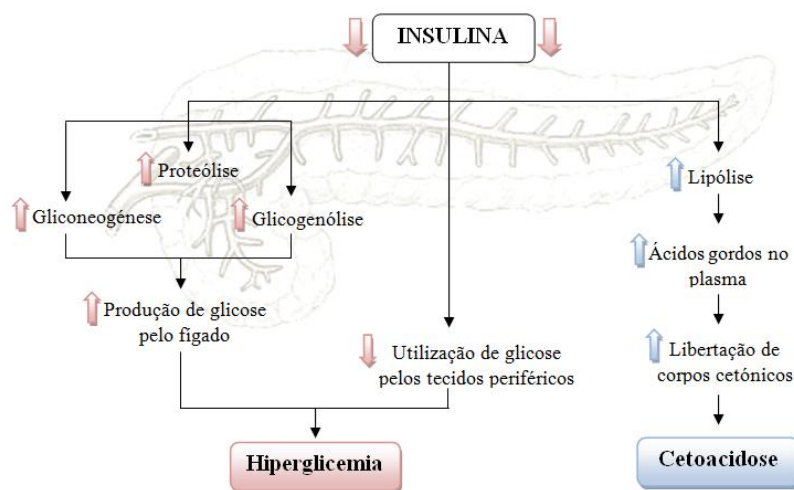


Figura 1 - Alterações metabólicas do organismo na DM. Adaptado de: Dean e McEntyre, 2004

Sendo a DM uma doença metabólica, quando não controlada, pode levar à disfunção e falência de vários órgãos. As complicações associadas a esta doença ocorrem ao nível macro e microvascular através de alterações provocadas no espessamento dos vasos sanguíneos, reduzindo o seu calibre, bem como alterações ao nível da elasticidade e permeabilidade dos vasos. Ao nível macrovascular, as principais complicações são o enfarte do miocárdio e a aterosclerose, podendo levar à ocorrência de acidentes vasculares cerebrais (AVC). Das complicações microvasculares as mais frequentes são a retinopatia que pode levar à cegueira; a nefropatia, que pode originar insuficiência renal; e a neuropatia, que pode levar à formação de úlceras de difícil cicatrização podendo mesmo determinar a amputação de membros (A.D.A., 2006). A nefropatia é uma das complicações mais frequentes, sendo uma das principais causas de insuficiência renal crónica, requerendo em muitos casos diálise renal, hemodiálise ou diálise peritoneal (SPD, 2010).

O controlo dos níveis de glicemia consegue-se por alterações do estilo de vida (ex: prática de exercício físico e reeducação alimentar), pela administração de insulina ou pelo uso de antidiabéticos orais (ADO). Assim, um indivíduo com DM consegue manter a sua glicemia num nível normal (em jejum $\leq 80\text{mg/dL}$) e evitar complicações associadas a esta doença.

1.1.2 Diagnóstico

O diagnóstico desta patologia não é simples, uma vez que provoca sintomas gerais podendo até ser assintomática. Os critérios de diagnóstico deverão então ser diferentes consoante estamos na presença de um indivíduo com sintomatologia acentuada (hiperglicemias acentuadas) ou na presença de um indivíduo assintomático (glicemia ligeiramente acima do limite). A hiperglicemia grave não é, contudo, uma condição limitante, podendo ser provocada por *stress* agudo, como por exemplo: infeccioso, traumático ou circulatório (A.D.A., 2006).

Para o diagnóstico são utilizados testes como a análise dos valores de glicose em jejum, hemoglobina glicada ou prova de tolerância à glicose oral. Nos doentes

assintomáticos deve ser utilizado mais do que um teste analítico (A.D.A., 2006). Os valores de referência para a DM encontram-se no quadro I.

Quadro I - Valores analíticos de referência para a DM.

Valores Analíticos	Classificação
<i>Jejum</i>	
≥126mg/dL (em duas ocasiões)	Diabetes <i>mellitus</i>
≥109 e <126mg/dL	Hiperglicemia
≥70 e <109 mg/dL	Normal
<70mg/dL	Hipoglicemia
<i>Pós-Prandial</i>	
≥140 mg/dL	Tolerância Diminuída à Glicose
<140 mg/dL	Normal

Fonte: Sociedade Portuguesa de Diabetologia (SPD, 2010).

1.1.3 Classificação

A classificação da DM tem sofrido modificações ao longo dos anos. Inicialmente foi dividida em duas categorias relacionadas com a utilização de insulina: Diabetes Insulino-dependente (tipo 1) e Diabetes Não-Insulino-dependente (tipo 2). Esta classificação rapidamente se tornou obsoleta, pelo que foi acordada internacionalmente uma classificação etiológica que considera apenas a origem da doença e não a sua progressão ou tratamento (Alberti, 1999).

1.1.3.1 Diabetes *mellitus* tipo 1

A Diabetes *mellitus* tipo 1 (DM1) ocorre, principalmente, nos primeiros anos de vida e adolescência, frequentemente em indivíduos de constituição magra. Esta é de

origem auto-imune, em que ocorre um ataque das células T do sistema imunitário às células β -pancreáticas, destruindo-as, criando-se assim uma deficiência na produção de insulina (Dean e McEntyre, 2004).

A etiologia desta doença imunológica ainda não foi esclarecida, havendo vários factores que poderão estar associados. Até ao momento, encontram-se descritos dez possíveis genes associados à DM1, entre estes o PTPN22, o IL2RA e o CTLA4. Estes genes são responsáveis pela codificação de proteínas envolvidas no controlo da actividade imunológica e na manutenção da sua homeostasia (Qu et al., 2009a, Qu et al., 2009b). A introdução precoce do leite de vaca (e conseqüente exposição à albumina bovina) em indivíduos geneticamente susceptíveis ou infecções víricas pelo vírus da rubéola, Epstein-Barr ou citomegalovírus, em associação com factores ambientais, são outras das causas associadas ao desencadeamento da resposta imune que culmina no aparecimento desta doença (Todd, 2010).

O tratamento na DM1 incide principalmente na utilização de insulina, podendo em casos excepcionais ser utilizada a terapia com ADO (Garg, 2011).

1.1.3.2 Diabetes *mellitus* tipo 2

A Diabetes *mellitus* tipo 2 (DM2) ocorre principalmente em adultos havendo, no entanto, cada vez mais jovens a desenvolver esta patologia. Esta tendência tem se verificado de forma radical no Japão onde, actualmente, existem mais crianças com DM2 do que DM1 (Dean e McEntyre, 2004). Este facto poderá estar relacionado com a enorme influência que a cultura ocidental teve sobre os hábitos alimentares desta população e com o aumento do sedentarismo. Os Japoneses têm também uma maior prevalência polimórfica em pelo menos três genes responsáveis pela codificação de proteínas-chave no metabolismo dos hidratos de carbono e lípidos, como por exemplo o receptor β -3-adrenérgico, o receptor activado por proliferadores de peroxissoma (PPAR) e a calpaina-10 (Kawamori, 2002).

Uma das principais características da DM2 é a progressiva resistência à insulina que, apesar de produzida em quantidades suficientes, é continuamente “ignorada” pelo organismo, criando uma situação de hiperinsulinemia. É a combinação destes dois factores (resistência insulínica conjugada com hiperinsulinemia) que despoleta uma série de alterações metabólicas que culminam num estado de hiperglicemia crónico e em último caso, DM2. Esta patologia está assim associada a um estilo de vida sedentário, quer pela diminuição do metabolismo da glicose nestes indivíduos, quer pela sua associação à obesidade devido ao aumento dos níveis de glicose como consequência da sobrealimentação (Campbell, 2009).

A disfunção das células β -pancreáticas é também um dos factores associados a esta doença, podendo ocorrer por glicotoxicidade ou hiperestimulação destas células. O pâncreas é um órgão extremamente sensível e por isso altamente perturbado pela elevação dos níveis de glicose. Mesmo as mais pequenas alterações glicémicas, quando exercidas de forma continuada provocam alterações funcionais e estruturais nas células- β (Campbell, 2009). Outros factores como a lipotoxicidade, o *stress* oxidativo e a deposição de placas amilóides (observada em 90% dos indivíduos com DM2) também têm sido considerados como responsáveis por esta disfunção celular (Standl, 2007). As alterações funcionais das células- β na presença destes factores consistem na activação de mecanismos de defesa contra situações de *stress*, perda da resposta insulínica aguda e *upregulation* de genes associados à apoptose (Campbell, 2009).

A DM2 tem sido também considerada como uma doença de origem inflamatória. Factores de *stress* levam ao recrutamento de células inflamatórias provocando inflamação nos ilhéus pancreáticos. Alguns estudos têm demonstrado uma relação entre níveis elevados de proteínas de fase aguda (como a proteína C-reactiva), ácido siálico e citocinas e a DM2. A relação entre esta patologia e as interleucinas pró-inflamatórias (IL-1 β e IL-6) tem sido também alvo de investigação, havendo evidências de um rápido aumento do antagonista do receptor da IL-1 (IL1RA) no período que antecede o aparecimento da DM2 (Donath e Shoelson, 2011).

O tratamento da DM2 incide principalmente sobre a utilização de ADO que são eficazes no aumento da resposta metabólica à insulina endógena. Por vezes é utilizada em simultâneo a insulinoterapia, nos casos em que ocorre disfunção celular por

hiperestimulação das células- β , devido à resistência insulínica crónica (Jain e Saraf, 2010).

1.1.4 Insulinoterapia e Estratégias terapêuticas

A estratégia utilizada para manter os níveis de glicemia controlados de forma eficaz varia consoante a classificação da doença. Se na DM1 a estratégia de primeira linha se baseia fundamentalmente na administração de insulina, na DM2 a insulinoterapia passa para segundo plano, baseando-se na administração de ADO.

A insulina é uma hormona polipéptidica composta por duas cadeias de aminoácidos designadas por cadeia A (21 aminoácidos) e B (30 aminoácidos) ligadas por pontes dissulfureto. Na maioria das espécies, o tamanho e estrutura desta hormona é semelhante, sendo este o motivo pelo qual a insulina porcina é utilizada em indivíduos diabéticos. A insulina utilizada inicialmente era extraída do pâncreas de porco e purificada por cristalização. Actualmente, esta pode ser obtida por tecnologia de ADN recombinante a partir de *E.coli* ou por modificação enzimática (Dean e McEntyre, 2004).

Nos indivíduos com DM2, a terapêutica implementada tem como principal finalidade mediar a utilização de insulina endógena pelos tecidos. Os ADO actuam no controlo glicémico através de diferentes mecanismos de acção: aumento da secreção de insulina pelo pâncreas (sulfonilureias), diminuição da libertação de glicose pelo fígado (biguanidas), redução da absorção gastrointestinal dos hidratos de carbono (inibidores da α -glucosidase) e melhorar a utilização de glicose nos tecidos periféricos (biguanidas e tiazolidonas) (Jain e Saraf, 2010).

Devido à natureza progressiva desta doença, este tipo de terapêutica revela-se muitas vezes insuficiente, sendo por vezes necessário recorrer à insulinoterapia de forma a se obter um controlo adequado dos níveis de glicemia (Jain e Saraf, 2010). Segundo o Relatório Anual do Observatório Nacional da Diabetes, aproximadamente,

89% dos indivíduos com DM2 utiliza apenas ADO para o controlo dos níveis de glicemia e 11% requer a utilização de insulina (SPD, 2010).

Apesar dos avanços tecnológicos no sentido de melhorar o desenvolvimento das formulações de insulina nem sempre os objectivos são alcançados. Um dos principais problemas associados à insulino-terapia continua a ser a hiperglicemia pós-prandial e a hipoglicemia, havendo sempre possibilidade de desenvolvimento de resistência insulínica (no caso dos indivíduos com DM1). Para contrariar esta problemática, têm sido efectuados esforços no sentido de desenvolver novas terapêuticas. Estas vão desde a utilização de agentes imunoterapêuticos (ciclosporina e metotrexato) à transplantação de ilhéus pancreáticos. A utilização de péptidos semelhantes à glicagina tem também sido estudada uma vez que estes promovem a proliferação de células- β (Garg, 2011).

A eficácia destes tratamentos está no entanto dependente de vários factores como o estilo de vida e a base genética, sendo muitas vezes necessária a combinação de duas ou mais estratégias de forma a tentar travar a evolução da doença.

1.2 Enzima Conversora da Angiotensina – do gene à função proteica

O sistema renina-angiotensina-aldosterona (RAAS) é o eixo endócrino que regula a pressão arterial e o equilíbrio electrolítico. Esta cascata, fundamental para a homeostasia cardiovascular, tem como componente-chave a enzima conversora da angiotensina (ECA).

1.2.1 Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona

A cascata RAAS inicia-se pela libertação da renina pelas células justaglomerulares do rim. Esta activação ocorre devido ao aumento da retenção de sódio, perda de volémia ou por activação simpática (Crisan e Carr, 2000).

A renina cliva o péptido inactivo angiotensinogénio (sintetizado no fígado), originando a proteína vasoactiva angiotensina I, a ANG I (Sayed-Tabatabaei et al., 2006). A ANG I sofre posteriormente, por acção da ECA, clivagem do dipéptido His-Leu, convertendo-se em angiotensina II, a ANG II. A ANG II é um potente vasoconstritor que actua no córtex adrenal provocando a libertação de aldosterona. Pode também actuar como mediadora do crescimento e proliferação celular, por estimulação de várias citocinas e factores de crescimento. A aldosterona libertada estimula os túbulos renais, promovendo a reabsorção de sódio e de água e a excreção de potássio, aumentando a volémia e a pressão arterial (Crisan e Carr, 2000).

A ANG II exerce assim um *feedback* negativo sobre a produção de renina, pelo aumento da volémia ou através de um efeito directo nas células justaglomerulares (Crisan e Carr, 2000).

1.2.2 Sistema Cinina-Calicreína

A homeostasia electrolítica é também regulada pelo sistema cinina-calicreína. Este sistema e o sistema RAAS estão ligados pela ECA, sendo muitas vezes considerados sistemas antagónicos.

Nesta cascata, a proteína bradicinina (também denominada por cinina) é gerada através da acção da calicreína plasmática no cininogénio de alto peso molecular. Por sua vez, a calicreína tecidual actua no cininogénio de baixo peso molecular originando a calidina (Lis-bradicinina). A bradicinina e a calidina são dois ligandos naturais dos receptores B₂, cuja activação medeia os efeitos fisiológicos provocados por estas proteínas, i.é. estimulação da excreção de sódio (Chao e Chao, 2005).

A ECA é a enzima responsável pela metabolização da bradicinina, por clivagem do dipéptido Phe-Arg no terminal C, originando a bradicinina 1-5 (péptido inactivo). A inibição da bradicinina impede a estimulação do receptor B₂, com consequente diminuição da libertação de óxido nítrico. Desta forma, há relaxamento do músculo liso vascular e diminuição da pressão arterial (Tschope et al., 2002).

A ECA possui assim dupla acção como componente regulador da pressão arterial, o que lhe confere um elevado interesse como substrato de estudo quer a nível da fisiologia dos sistemas reguladores, da patofisiologia e da farmacogenómica em doenças do foro cardiovascular. A figura 2 demonstra a interacção entre os dois sistemas referidos e a sua ligação através da ECA.

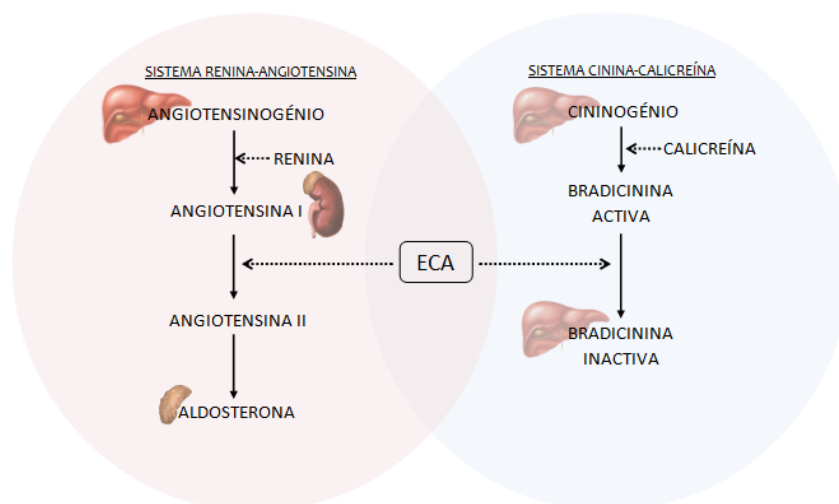


Figura 2 - Integração dos sistemas renina-angiotensina-aldosterona e cinina-caliceína. Adaptado de: Sayed-Tabatabaei et al., 2006

1.2.3 Enzima Conversora da Angiotensina

No *Homo sapiens* o gene da ECA (*DCPI*) está localizado no braço longo do cromossoma 17 (17q23) e compreende 26 exões e 25 intrões. Por *splicing* alternativo, este gene origina duas isoformas de ECA: somática e testicular.

A isoforma somática (sECA) é transcrita por um promotor localizado na extremidade 5' do primeiro exão do gene da ECA (Spro), que leva à transcrição de todos os exões com excepção do exão 13 (Sayed-Tabatabaei et al., 2006). A tradução da sECA origina uma proteína com 1306 aminoácidos e com dois domínios catalíticos (próximos dos terminais N e C). A sECA é expressa em tecidos somáticos como o rim, o intestino e o pulmão, bem como em células endoteliais, epiteliais e neuroepiteliais (Klein, 2001).

A isoforma testicular (tECA) é uma isoforma truncada, com 100KDa, de menor tamanho quando comparada com a sECA de 170 KDa (Niu et al., 2002). A tECA é

também denominada por ECA germinal (gECA), por se encontrar apenas no tecido germinal do sistema reprodutor masculino. A função fisiológica desta proteína com 732 aminoácidos ainda não foi esclarecida (Baudin, 2000). A tECA é transcrita por um promotor interno específico localizado no intrão 12 (Gpro), que transcreve os exões 13 a 26. Esta isoforma contém apenas um domínio catalítico que se encontra junto ao domínio terminal C (Klein, 2001, Sayed-Tabatabaei et al., 2006).

A sECA encontra-se no organismo humano sob a forma tecidual e plasmática. Na forma tecidual esta glicoproteína encontra-se ancorada à membrana plasmática pela região hidrofóbica do terminal C, projectando-se para o espaço extracelular. Esta é a forma predominante, sendo a responsável pela conversão da ANG I a ANG II (Klein, 2001, Esther et al., 1997).

A forma plasmática da ECA é originada por clivagem da ligação peptídica Arg1203-Ser1204 perto do terminal C. Esta forma, tendo uma estrutura semelhante à forma tecidual, não se encontra ancorada à membrana plasmática, podendo ser detectada em vários fluídos corporais, como por exemplo: sangue, urina, líquido cefalorraquidiano, etc. (Niu et al., 2002, Klein, 2001). Os níveis de ECA plasmática mantêm valores individuais constantes, havendo uma grande variabilidade inter-individual, sem qualquer relação com factores hormonais ou ambientais (Baudin, 2000).

A sECA e a tECA partilham 665 aminoácidos junto ao terminal C. No terminal N estas isoformas possuem, respectivamente, 664 e 72 resíduos únicos (Niu et al., 2002).

1.3 Polimorfismos da Enzima Conversora da Angiotensina – potenciais efeitos biológicos

O gene *DCP1* que codifica a proteína ECA é altamente polimórfico, sendo conhecidos aproximadamente 160 polimorfismos neste gene. A maioria destes polimorfismos são *Single Nucleotide Polymorphisms* (SNP), estando a sua maioria em

zonas não-codificantes (apenas 34 se encontram em zonas codificantes). São também conhecidas 18 mutações *missense* no gene *DCPI* (Sayed-Tabatabaei et al., 2006).

1.3.1 Polimorfismo de Inserção/Delecção

O polimorfismo melhor descrito até à actualidade é o de Inserção/Delecção (I/D), tendo sido inicialmente descrito por Rigat e colaboradores em 1990 (Rigat et al., 1990). Este polimorfismo localiza-se no intrão 16, sendo constituído por uma sequência Alu com 287bp (rs1799752). Este polimorfismo origina três genótipos distintos: I/I, I/D e D/D.

A mutação que ocorre no I/D é a de inserção (em detrimento da delecção) do elemento Alu, uma vez que esta sequência é muito semelhante a outros elementos Alu específicos do Homem. Esta hipótese foi também corroborada após genotipagem realizada em chimpanzés ter revelado a falta desta sequência, o que indica que esta mutação tenha ocorrido após a separação evolutiva entre o chimpanzé e o Homem (Rieder et al., 1999).

Têm sido realizados numerosos estudos que tentam descrever a relação entre os polimorfismos da ECA e diferentes patologias, bem como o impacto destas mutações nos níveis plasmáticos desta enzima. Entre as patologias mais estudadas encontram-se a disfunção erétil, DM1, DM2, Alzheimer, enfarte do miocárdio e outras doenças cardiovasculares como a hipertensão arterial (HTA) e a cardiomiopatia hipertrófica (Klein, 2001).

Alguns estudos têm associado os diferentes genótipos com os níveis de ECA plasmática (Nordestgaard et al., 2009, Klein, 2001, Sayed-Tabatabaei et al., 2006). De acordo com o estudo realizado por Nordestgaard e cols. em 2009, os valores de ECA plasmática nos indivíduos com genótipo D/D são 50% superiores aos valores encontrados em indivíduos com o genótipo I/I. O genótipo I/D origina valores intermédios de ECA plasmática, o que indica co-dominância de alelos (Nordestgaard et al., 2009). Este polimorfismo é responsável por 47% da variação fenotípica total da ECA plasmática (Niu et al., 2002). Apesar das alterações observadas nos níveis de

ECA, não foi encontrada alteração nos parâmetros cinéticos desta enzima ou na concentração de ANG II e aldosterona (Baudin, 2000).

A HTA é uma doença multifactorial onde a interacção genética e a interacção genótipo-ambiente tem uma elevada importância. Devido ao papel da ECA na homeostasia electrolítica, a relação entre esta enzima e a hipertensão tem sido amplamente estudada (Gard, 2010). Alguns estudos reportaram uma associação entre o alelo de deleção (D) e a HTA, nomeadamente na população sul-indiana e chinesa (Jiang et al., 2009, Anbazhagan et al., 2009). Noutras populações a mesma associação não foi verificada (Eisenmann et al., 2009, Tascilar et al., 2009). Zee e cols. efectuaram um estudo na população Australiana onde demonstraram haver uma relação positiva entre o polimorfismo I/D e a HTA, ocorrendo uma maior frequência do alelo de inserção (I) nos indivíduos hipertensos, quando comparados com indivíduos normotensos (Zee et al., 1992). A importância do alelo I foi também demonstrada num estudo efectuado em mulheres brasileiras, onde a presença do alelo I estava relacionada com um aumento da pressão arterial sistólica em 11mmHg (Moraes et al., 2008). Esta variação pode estar relacionada com a influência que os factores ambientais exercem sobre as variantes genéticas (Gard, 2010).

Em 1992 foi reportada pela primeira vez uma associação entre o polimorfismo I/D e o risco de doença coronária e enfarte do miocárdio. Cambien e cols. afirmaram existir um aumento do risco em 35% quando na presença do alelo D (Cambien et al., 1992). No entanto, estes resultados são limitados pelo estudo efectuado por Schurks e cols. em 25000 mulheres americanas, onde não foi encontrada associação entre este polimorfismo e o risco de enfarte (Schurks et al., 2009).

Os estudos efectuados na tentativa de encontrar associação entre o polimorfismo I/D e o AVC também têm sido contraditórios. Celiker e cols. demonstraram uma maior incidência de AVC em indivíduos com genótipo D/D, evidência não corroborada pela meta-análise de Kitsios que incluía 58 estudos, onde não foi encontrada qualquer associação entre o alelo D e a incidência de AVC (Celiker et al., 2009, Kitsios e Zintzaras, 2009).

A implicação da ECA a nível neurológico também tem sido amplamente estudada, devido à presença de componentes do sistema renina-angiotensina no cérebro, mas com resultados igualmente contraditórios. O alelo D foi associado a um efeito protector contra a esquizofrenia, sendo este efeito tanto maior quanto maior o número de alelos D (Crescenti et al., 2009). Por outro lado, outro estudo associou a presença do alelo D à doença bipolar, sendo o efeito protector associado ao alelo I (Kucukali et al., 2010). Para a doença de Alzheimer foi encontrado um risco aumentado em indivíduos em heterozigotia (Lehmann et al., 2005).

O polimorfismo I/D tem sido também associado a outras condições patofisiológicas como a inflamação (Benicky et al., 2009), asma (Eryuksel et al., 2009), enxaqueca (Schurks et al., 2009) e hipertrofia ventricular esquerda (Niu et al., 2002).

Como este é um polimorfismo intrónico, é pouco provável que seja uma variante funcional, não estando ainda completamente esclarecido o mecanismo de sobreexpressão em homozigóticos. A hipótese melhor fundamentada é que este polimorfismo esteja em completo/parcial desequilíbrio de ligação (*linkage disequilibrium* - LD) com outros *loci* que são um verdadeiro factor de risco para as patologias em estudo. Rieder e cols. identificaram 78 variantes do gene da ECA, agrupadas em 13 haplótipos. Das variantes encontradas, 17 estavam em completo LD com o polimorfismo I/D. O elevado grau de LD encontrado nos numerosos estudos, revela a importância da obtenção de uma representação clara da variação alélica intragenética (Rieder et al., 1999).

1.3.2 O Polimorfismo I/D e a Diabetes *mellitus*

Existem diversos genes que poderão estar relacionados com o aparecimento de DM. Além disso, existem algumas mutações e polimorfismos que se acredita estarem associados a variações de glicose nos indivíduos diabéticos. O polimorfismo I/D da ECA tem sido particularmente estudado uma vez que se relaciona com muitas outras patologias associadas em parte à DM (Todd, 2010).

Apesar de não existir actividade *in situ* das enzimas do RAAS no pâncreas, a alteração destas enzimas encontra-se relacionada com esta doença. A ANG II provoca vasoconstrição, fibrose, inflamação e apoptose das células- β pancreáticas, levando à alteração da função pancreática na produção de insulina. Esta proteína promove também a expressão do transportador da glicose GLUT-4 e a actividade da hexocinase, actuando no metabolismo da glicose (Bozkurt et al., 2009). A bradicinina, por sua vez, aumenta a sinalização de insulina e a translocação do GLUT-4 para a membrana plasmática das células musculares e adipócitos, estando assim relacionada com a patogénese desta doença. A ECA além de actividade pró-inflamatória e pró-oxidante actua também na regulação da proliferação celular e fibrose. O aumento dos valores da ECA está desta forma associado a um aumento da tolerância à glicose, aumentando assim o risco de desenvolvimento de DM2 (Fiatal et al., 2011).

Os fármacos inibidores da enzima conversora da angiotensina (IECA) e os bloqueadores do receptor 1 da ANG II (BRA) têm se mostrado eficazes na prevenção do desenvolvimento da DM2 através da diminuição da perda renal de potássio, melhoramento do fluxo sanguíneo nos ilhéus pancreáticos e melhoramento da perfusão nas células- β através da diminuição da vasoconstrição provocada pela ANG II (Bozkurt et al., 2009).

Vários autores têm estudado uma possível associação entre o polimorfismo I/D e o desenvolvimento de DM2, bem como a relação deste polimorfismo e a nefropatia associada à diabetes. Os estudos efectuados até agora têm demonstrado resultados contraditórios. Ganesan e cols. num estudo com 520 indivíduos, não encontraram nenhuma associação estatisticamente significativa entre o genótipo D/D e a DM2, contradizendo os estudos efectuados por Baroudi e cols. e Ramachandran e cols. (Ganesan et al., 2011, Baroudi et al., 2009, Ramachandran et al., 2008).

Alguns autores sugerem que os indivíduos com alelo D poderão beneficiar de uma terapêutica preventiva com IECA ou BRA, de forma a diminuir a actividade da ECA e assim diminuir a probabilidade de desenvolvimento de DM2, bem como de todas as complicações associadas a esta patologia (Baroudi et al., 2009).

Os estudos efectuados relativamente à insulino-resistência têm sido igualmente contraditórios. Alguns estudos afirmam existir relação entre o polimorfismo I/D e a insulino-resistência (Akin et al., 2010), enquanto outros refutam esta hipótese com os seus resultados (Moleda et al., 2005). Os mecanismos através dos quais o genótipo pode influenciar a sensibilidade insulínica continuam desconhecidos, podendo estar relacionada com as alterações provocadas no fluxo sanguíneo que, indirectamente, modificam a capacidade de distribuição e utilização de insulina (Bozkurt et al., 2009).

1.4 Objectivos

Este estudo tem como principal objectivo averiguar a possível associação entre a DM e o polimorfismo I/D da ECA e a sua prevalência na população portuguesa. Assim, os objectivos deste estudo são: (1) avaliar a importância da realização da amplificação *primer-específica* na obtenção do genótipo, (2) avaliar a incidência do polimorfismo I/D na população portuguesa através da verificação da distribuição dos diferentes genótipos, (3) analisar a associação entre o polimorfismo I/D e a DM2 verificando (a) se existe relação entre os diferentes genótipos e os níveis de glicemia, (b) se existe relação entre os diferentes genótipos e a utilização de insulina; e por último (4) averiguar se existe relação entre os diferentes genótipos e a co-existência de DM e HTA.

METODOLOGIA

Capítulo 2: Metodologia.....	29
2.1 Amostra.....	29
2.2 Parâmetros Bioquímicos	29
2.3 Extracção de ADN	30
2.4 Amplificação genética em PCR.....	31
2.5 Tampões e Soluções.....	34
2.6 Análise Estatística.....	38

Capítulo 2: Metodologia

2.1 Amostra

A população em estudo consistiu em 87 indivíduos de nacionalidade portuguesa, não havendo qualquer restrição em relação ao género, idade ou etnia. A amostragem foi efectuada em diferentes laboratórios de análises clínicas do Norte e Centro do país, consistindo em 63 indivíduos diabéticos e 24 indivíduos não-diabéticos. A cada participante foi apresentado um termo de consentimento informado e um questionário acerca do seu historial médico. A recolha da amostra biológica foi efectuada por venipunctura para tubos contendo um anticoagulante (ácido etilenodiaminotetra-acético - EDTA), ou quando esta não era possível, através da colheita de sangue capilar para um cartão FTA® (Whatman®).

O grupo experimental era constituído por indivíduos com DM, independentemente do tipo, diagnosticada previamente. O grupo controlo era constituído por indivíduos não diabéticos.

2.2 Parâmetros Bioquímicos

A determinação dos parâmetros bioquímicos é um passo que exige bastante rigor uma vez que estes são elementos fulcrais no diagnóstico e análise do desenvolvimento da patologia. Assim, os parâmetros “glicemia” e “colesterol total” foram analisados através de critérios padronizados pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute*.

2.3 Extracção de ADN

Actualmente existem diferentes métodos para extracção de ADN, cada um com vantagens e desvantagens que os investigadores deverão ponderar, consoante o tipo de amostra obtida. Existem *kits* comerciais que auxiliam na optimização da técnica de extracção. Uma extracção ideal deverá otimizar a quantidade de ADN obtida, diminuir a sua degradação e ser eficiente em termos de custo, tempo e recursos, diminuindo ao máximo a produção de resíduos perigosos (Chen et al., 2010). A extracção de ADN foi realizada segundo dois métodos distintos de acordo com o tipo de amostra em questão. Ambos os métodos são descritos de seguida.

2.3.1 Amostra de sangue periférico

Para as amostras recolhidas por venipunctura foram transferidos 300µL de sangue para dois microtubos. A esse volume foram adicionados 900µL de tampão de eritrócitos (20mM Tris-Cl, pH 7,6). Após homogeneização, as soluções foram incubadas à temperatura ambiente, durante 10 minutos, sob agitação ocasional. Após centrifugação, à velocidade máxima, durante 30 segundos, todo o sobrenadante foi rejeitado, à excepção de 20µL de cada solução. As soluções foram ressuspendidas e combinadas num único tubo. À solução foram adicionados 600µL de tampão de lise celular (10mM Tris-Cl, 1mM EDTA, 0,1% (m/v) SDS, pH 8,0) refrigerado a 2-8°C, seguindo de agitação vigorosa. Ao lisado resultante foram adicionados 3µL de solução de proteinase K (20mg/mL), sendo posteriormente incubado a 55°C durante 3 a 16 horas. Decorrido este tempo, a solução foi arrefecida à temperatura ambiente, sendo-lhe adicionados 3µL de RNase livre de DNase (4mg/mL). Procedeu-se novamente a incubação a 37°C durante 15 a 60 minutos. Após arrefecimento até à temperatura ambiente, foram adicionados 200µL de solução de acetato de potássio (5M acetato, 3M potássio). O conteúdo do tubo foi homogeneizado no vórtex durante 20 segundos. Refrigerou-se a solução até aos 4°C e centrifugou-se à velocidade máxima durante 3 minutos. Após a centrifugação, o sobrenadante foi transferido para um novo microtubo contendo 600µL de isopropanol (v/v). Após ser sujeita a homogeneização e a nova centrifugação à velocidade máxima durante 1 minuto, o sobrenadante foi rejeitado e ao

precipitado foram adicionados 600 μ L de etanol a 70% (v/v). A solução foi novamente centrifugada, em iguais condições à anterior, e o sobrenadante novamente rejeitado. Os microtubos foram deixados a secar ao ar para permitir a evaporação do etanol. O *pellet* de ADN foi posteriormente solubilizado em 100 μ L de tampão Tris-EDTA (pH 7,6) e colocado a incubar durante 1 hora a 65°C. Após a incubação, as amostras foram armazenadas a -4°C até à sua utilização.

2.3.2 Amostra de sangue capilar

Para as amostras recolhidas em cartão FTA®, de cada cartão foi retirado, para um tubo de *Polymerase Chain Reaction* (PCR), um disco de ~1,2mm de diâmetro, utilizando um aparelho de punção. Ao tubo de PCR foram adicionados 200 μ L de reagente de purificação (Whatman®). Procedeu-se à incubação dos tubos durante 5 minutos, à temperatura ambiente, sob agitação ocasional, de forma a aumentar a eficiência da lavagem. Todo o reagente foi posteriormente removido, sendo o processo repetido por mais duas vezes até que o disco perdesse a cor avermelhada, característica do sangue. Após a lavagem foram adicionados 200 μ L de tampão TE (10mM Tris-Cl, 0,1mM EDTA, pH 8,0), deixando-se incubar a solução durante 5 minutos à temperatura ambiente. Todo o tampão foi posteriormente retirado, sendo este passo repetido novamente. O tubo de PCR foi então deixado a secar ao ar durante, aproximadamente, 15 minutos.

2.4 Amplificação genética em PCR

O estudo do polimorfismo I/D foi realizado através da amplificação por PCR convencional, de acordo com o método utilizado por Naresh e cols. (Naresh et al., 2010). A reacção de PCR actua por amplificação exponencial de um segmento específico do gene em estudo. A taxa de sucesso da amplificação é, desta forma, tanto maior quanto mais específico for o *primer* utilizado (figura 3). Este tipo de PCR requer

identificação dos fragmentos amplificados por uma análise posterior como a eletroforese.

Neste estudo foram efectuadas duas reacções distintas de PCR convencional. Na primeira reacção todas as amostras foram amplificadas, tendo sido utilizados *primers* responsáveis pela amplificação do alelo I e D. A segunda reacção de PCR é utilizada para controlo de possível *mistyping*, tendo sido utilizados *primers* específicos para o alelo I.

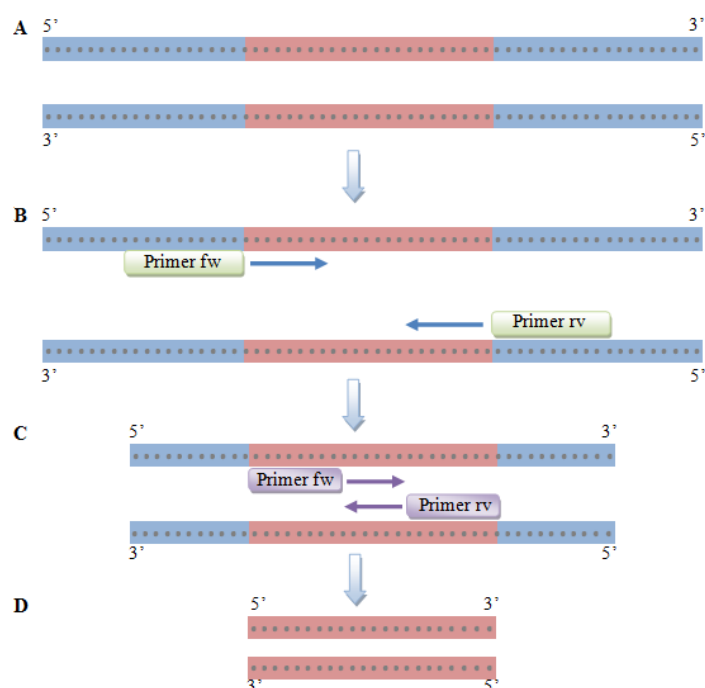


Figura 3 – Reacção de PCR convencional. Legenda: A – Dupla cadeia de ADN. B – Amplificação inicial dos alelos I e D. C – Amplificação específica do alelo I. D – Produto final da amplificação (alelo I)

A reacção de amplificação foi realizada num volume reaccional de 25µL contendo 2µL de ADN, 1,5mM MgCl₂, 0,06mM dNTP (FINNZYMES®), 0,07mM de cada *primer* (METABION®) e 0,5U de Taq polimerase (INVITROGEN®). Para amplificação do polimorfismo em estudo foram utilizados os seguintes *primers forward* 5'-CTG GAG ACC ACT CCC ATC CTT TCT-3' e *reverse* 5'-GAT GTG GCC ATC ACA TTC GTC AGA T-3'. Os ciclos de amplificação efectuados encontram-se

descritos no quadro II. Esta amplificação teve como resultado a formação de produtos de ~490bp e ~190bp correspondentes ao alelo de inserção e deleção, respectivamente.

Quadro II – Programas de amplificação utilizados.

PCR	CONDIÇÕES	PROGRAMA DE AMPLIFICAÇÃO				
		Desnaturação inicial	Desnaturação	Hibridação	Extensão	Extensão final
PCR_ID	T (°C)	94°C	94°C	60°C	72°C	72°C
	Tempo (segundos)	120s	60s	60s	90s	600s
	Ciclos	1		40		1
PCR_DD	T (°C)	94°C	94°C	58°C	72°C	72°C
	Tempo (segundos)	120s	60s	60s	60s	600s
	Ciclos	1		40		1

As amostras foram classificadas em três grupos distintos: I/I, I/D e D/D. Como em heterozigotia ocorre preferencialmente amplificação do alelo D, todas as amostras correspondentes ao genótipo D/D foram novamente amplificadas. Para tal, foram utilizados *primers* específicos para o alelo de inserção: 5'- TGG GAC CAC AGC GCC CGC CAC TAC-3' (*forward*) e 5'-TCG CCA GCC CTC CCA TGC CCA TAA-3' (*reverse*). As condições de PCR utilizadas foram semelhantes às anteriores, havendo apenas modificação da temperatura de hibridação, para 58°C, e da concentração de Taq para 1U. Esta amplificação, na presença do alelo I, origina um produto de ~335bp, não originando qualquer produto na presença de um genótipo D/D permitindo assim a diferenciação entre o genótipo I/D e D/D.

Os produtos resultantes da reacção de PCR foram analisados por eletroforese, em gel de agarose a 1% e revelados com brometo de etídio (EtBr) sobre luz ultravioleta.

2.5 Tampões e Soluções

Para a extracção e amplificação foram utilizadas várias soluções com diferentes finalidades que são de seguida descritas.

2.5.1 Ácido etilenodiaminotetra-acético (EDTA)

O EDTA é um aditivo vulgarmente utilizado em soluções tampão, pois diminui as interacções intermoleculares, sendo muito usado em tampões de lise celular. Esta substância actua por quelação de catiões divalentes que promovem a quebra das ligações fosfodiéster, por acção das DNases, prevenindo assim a desnaturação do ADN. O EDTA é também utilizado na solubilização do ADN para posterior armazenamento. A solução stock é efectuada com 186,1g de EDTA dissódico hidratado dissolvidos em 800mL de água destilada. O pH é posteriormente ajustado a 8,0 e a solução autoclavada a 121°C durante 15 minutos (Sambrook e Russel, 2001).

2.5.2 Tris(hidroximetil)aminometano (Tris)

Actualmente, o tampão Tris é um dos mais usados em biologia molecular. Este tampão é habitualmente utilizado juntamente com o EDTA na realização de eletroforeses em gel de agarose e poliacrilamida, podendo também ser utilizado em associação com outras substâncias como o dodecil sulfato de sódio (SDS) para a elaboração de tampões de lise (Brody e Kern, 2004).

2.5.3 Dodecil Sulfato de Sódio (SDS)

O SDS é um detergente aniónico com função de lise celular por solubilização das membranas celulares, desnaturação proteica e consequente libertação do ADN. É

utilizado como reagente constituinte do tampão de lise celular (Sambrook e Russel, 2001).

2.5.4 Acetato de Potássio

A solução de acetato de potássio tem como principal função a desnaturação proteica. Esta acção é facilitada pela actividade proteolítica da proteinase K. As proteínas da cromatina são posteriormente separadas do ADN por centrifugação. A solução a utilizar foi efectuada a partir de 60mL de uma solução-mãe de acetato de potássio (5M) à qual se adicionou 11,5mL de ácido acético glacial e 28,5mL de água destilada. A solução final foi armazenada à temperatura ambiente, contendo no que respeita ao potássio uma concentração de 3M e no que respeita ao acetato de 5M (Sambrook e Russel, 2001).

2.5.5 Isopropanol

Utilizado na precipitação primária do ADN. A eficiência da precipitação com a utilização de isopropanol é maior quando comparada com o etanol. Contudo, é menos volátil pelo que demora mais tempo a evaporar totalmente e não forma um *pellet* tão aderente ao tubo em comparação com o etanol, o que requer maior cuidado no seu manuseamento (Chen et al., 2010).

2.5.6 Etanol 70%

Utilizado na precipitação secundária do ADN, após utilização do isopropanol. Os ácidos nucleicos precipitam na presença de etanol, são recolhidos por centrifugação e re-dissolvidos numa solução tampão para armazenamento. O etanol provoca a dissolução de catiões, originando ADN praticamente puro no precipitado (Sambrook e Russel, 2001).

2.5.7 Tris-EDTA (TE)

A solução de TE é utilizada para solubilização do ADN precipitado e posterior armazenamento. A solução stock é preparada com 100 mM de Tris-HCl pH 7,6/pH 8,0 e 10 mM de EDTA pH 8,0, sendo a solução posteriormente autoclavada durante 15 minutos a 121°C (Sambrook e Russel, 2001).

2.5.8 Tris-Ácido acético-EDTA (TAE)

O tampão TAE tem maior poder de resolução para o ADN humano, quando comparado com os tampões Tris-Borato-EDTA (TBE) e Tris-Fosfato-EDTA (TPE). Este tampão aumenta a taxa de migração em ~10%. Para a solução stock de TAE 50x são utilizados 242g de base Tris, 57,1mL de ácido acético glacial e 100mL de EDTA 0,5M (pH=8,0). Após obtenção da solução stock efectuou-se a diluição com água destilada até obtenção da concentração desejada - 1x (Sambrook e Russel, 2001).

2.5.9 Tampão de carregamento

Na preparação do tampão de carregamento, é comum utilizar, além do corante, um aditivo denso que, pelo acrescento de peso à amostra, facilita a migração no gel de eletroforese. O tampão utilizado (TAKARA®) foi obtido numa concentração a 10x. Na sua constituição continha 1% de SDS, 50% de glicerol e 0,05% de azul de bromofenol. A solução era posteriormente diluída com água destilada até à concentração de 1x, homogeneizada com a solução de PCR e, por fim, carregada no gel de agarose (Brody e Kern, 2004).

2.5.10 Brometo de Etídio (EtBr)

O EtBr é um corante muito utilizado na técnica de eletroforese, sendo usada para a detecção de pequenas quantidades de ADN em gel de agarose. Esta substância com

propriedades fluorescentes intercala-se entre os pares de base da dupla cadeia de ADN, podendo ser utilizada em pequenas concentrações. O EtBr, sob luz ultravioleta, absorve a 254nm, emitindo uma coloração na região vermelho-laranja do espectro do visível. A presença de EtBr provoca uma diminuição da carga negativa e, em contrapartida, um aumento da rigidez e comprimento da cadeia de ADN, o que retarda o tempo de migração em ~15%.

A solução de EtBr é elaborada com 0,01g de EtBr dissolvidos em 1mL de água destilada, seguida de agitação durante algumas horas, até completa dissolução. A concentração final de EtBr é de 0,5µg/mL (Sambrook e Russel, 2001).

2.5.11 Soluções Enzimáticas

2.5.11.1 Proteinase K

A proteinase K é uma protease de serina altamente activa constituída por 279 resíduos de aminoácidos. Esta enzima é bastante utilizada em protocolos de extracção uma vez que se mantém estável na presença de detergentes como o SDS. A proteinase K digere proteínas nativas, inactivando rapidamente DNases e RNases, facilitando a purificação de ADN. Utilizou-se uma apresentação comercial de 20mg/mL (Sambrook e Russel, 2001).

2.5.11.2 RNase

Esta enzima é utilizada para isolamento de ADN, livre de ARN, uma vez que digere e elimina todo o ARN contaminante. Foi utilizada uma apresentação comercial adquirida na concentração de 4mg/mL (Sambrook e Russel, 2001).

2.6 Análise Estatística

A análise dos dados obtidos foi efectuada através do software estatístico SPSS (versão 19.0 para Windows®).

No presente estudo foram definidas diversas variáveis de forma a cumprir os objectivos propostos. Assim, foram definidas variáveis quantitativas e variáveis qualitativas. Entre as variáveis quantitativas consideraram-se as variáveis “Glicemia” e “Colesterol”, e entre as variáveis qualitativas as restantes: “Diabético”, “Classificação Diabetes”, “Insulinoterapia”, “Genótipo”, “Hipertenso”.

Para a análise dos parâmetros bioquímicos (glicemia e colesterol total) foi analisada a média e desvio padrão de cada variável de forma a caracterizar a amostra em estudo. A análise inferencial foi realizada de acordo com os objectivos em estudo, para as quais foram determinadas as hipóteses em estudo e o teste estatístico a utilizar.

2.6.1 Objectivo 1 - Avaliação da relevância da re-amplificação

Para avaliar a necessidade de realização do PCR *primer*-específico foi realizado o teste de McNemar para amostras emparelhadas. Aqui, foi considerada a hipótese nula (H_0) “*O número de casos em que o genótipo foi alterado é igual ao número de casos em que o genótipo não foi alterado*” e como hipótese alternativa H_1 “*O número de casos em que o genótipo foi alterado é diferente do número de casos em que o genótipo não foi alterado*”. Esta análise inferencial permite assim verificar o interesse experimental desta amplificação.

2.6.2 Objectivo 2 – Distribuição genotípica e Equilíbrio Hardy-Weinberg

Para averiguar a distribuição do polimorfismo I/D, foi elaborado um estudo descritivo onde se procedeu à análise das frequências relativas de cada genótipo no grupo experimental e controlo.

2.6.3 Objectivo 3 – Estudo da associação entre o polimorfismo I/D e a DM

Para avaliar se a incidência de DM depende do genótipo recorreu-se ao teste do Qui-Quadrado de independência considerando como H_0 “A incidência de diabetes é independente do genótipo” e como H_1 “A incidência de diabetes não é independente do genótipo”. Na análise inferencial para os diabéticos tipo 2 foi também realizado um teste Qui-Quadrado, sob as mesmas hipóteses, mas incidindo apenas sobre o grupo de indivíduos com DM2.

2.6.4 Objectivo 3 (a) - Estudo da associação entre o polimorfismo I/D e os níveis de glicemia

Foi também analisada a importância estatística da variação dos níveis de glicemia. Esta variável foi submetida a diferentes testes estatísticos de forma a verificar a sua associação com as variáveis “Genótipo”, “Diabético” e “Classificação da Diabetes”. Para avaliar se existe diferença entre os níveis de glicemia entre os diabéticos tipo 1 e 2 efectuou-se um teste *t de student* para amostras independentes, tendo como H_0 : “A média dos valores de glicemia dos indivíduos com DM1 é igual à média dos valores de glicemia dos indivíduos com DM2” e como H_1 : “A média dos valores de glicemia dos indivíduos com DM1 é diferente da média dos valores de glicemia dos indivíduos com DM2”.

A significância estatística da variação dos valores de glicemia em cada genótipo e, particularmente, nos diabéticos e diabéticos tipo 2 foi analisada através do teste *one-way ANOVA* uma vez que permite a análise simultânea de diferentes grupos. Como complemento a este teste, e de forma a verificar em que grupos ocorria a variação utilizou-se o teste *Post-hoc LSD* de Fisher. As hipóteses consideradas na análise dos valores de glicemia da amostra com o genótipo foram: H_0 “A média dos valores de glicemia dos indivíduos é igual entre todos os genótipos” e H_1 “A média dos valores de glicemia dos indivíduos não é igual entre todos os genótipos”. Na análise efectuada para as outras duas variáveis (“Diabético” e “Classificação da Diabetes”) as hipóteses em estudo foram semelhantes, mas a análise inferencial incidiu apenas sobre os grupos em estudo.

2.6.5 Objectivo 3 (b) – Estudo da associação entre o polimorfismo I/D e a utilização de insulina em indivíduos com DM2.

A significância estatística da associação entre o polimorfismo em estudo e a utilização de insulina foi analisada através dos testes Qui-Quadrado e Binomial. Assim, inicialmente avaliou-se através do teste Binomial a proporção de indivíduos com DM2 insulino-dependentes: H_0 “*A proporção de indivíduos insulino-dependentes é igual a 11%*” e H_1 “*A proporção de indivíduos insulino-dependentes é superior a 11%*”.

Após observação visual dos gráficos obtidos foi analisada a proporção de indivíduos insulino-dependentes em cada genótipo. Assim, considerou-se como H_0 “*A proporção de indivíduos em cada genótipo é igual*” e como H_1 “*A proporção de indivíduos em cada genótipo é diferente*”. Esta análise foi efectuada em todos os indivíduos em insulino-terapia e posteriormente apenas nos que eram diabéticos tipo 2. De seguida, analisou-se a associação entre os três genótipos e a utilização ou não de insulina pelo teste do Qui-Quadrado considerando como H_0 “*A utilização de insulina e o genótipo são independentes*” e como H_1 “*A utilização de insulina e o genótipo não são independentes*”. A mesma análise foi efectuada posteriormente, mas considerando apenas os indivíduos com DM2.

2.6.6 Objectivo 4 – Estudo da associação entre a ocorrência de DM e HTA em simultâneo

Para avaliar se o genótipo se encontra relacionado com a ocorrência simultânea de DM e HTA, efectuiu-se o teste estatístico de independência Qui-Quadrado, considerando como H_0 “*A co-existência das duas patologias e o genótipo são independentes*” e como H_1 “*A co-existência das duas patologias e o genótipo não são independentes*”.

Considerando o tamanho da amostra em estudo, a análise da normalidade foi efectuada através do teste Kolmogorov-Smirnov. A análise das variâncias foi efectuada através do teste de Levene. Todas as análises estatísticas inferenciais foram efectuadas para um nível de significância (α) de 0,05.

RESULTADOS

Capítulo 3: Resultados.....	45
3.1 Caracterização da amostra e parâmetros bioquímicos	45
3.2 Amplificação de genes por PCR e electroforese.....	47
3.3 Relação entre Diabetes <i>mellitus</i> e Polimorfismo I/D.....	48

Capítulo 3: Resultados

Neste capítulo procedeu-se à caracterização dos parâmetros bioquímicos e genéticos de 87 indivíduos em estudo. Inicialmente são descritos os valores obtidos na análise bioquímica, de seguida os obtidos na amplificação genética e por fim a análise estatística que combina os dois parâmetros anteriores.

3.1 Caracterização da amostra e parâmetros bioquímicos

Dos 87 indivíduos (100%) que constituíam a amostra, 63 (72,4%) eram diabéticos, 24 (27,6%) não-diabéticos, 49 (56,3%) hipertensos e 38 (43,7%) normotensos. Dos indivíduos diabéticos, 12 (19,0%) foram classificados como DM1 e 51 (81,0%) como DM2.

Para o estudo da glicemia na amostragem foi calculado o valor médio deste parâmetro obtendo-se o valor de 173 ± 83 mg/dL. Os indivíduos diabéticos possuíam um valor médio de glicemia superior (204 ± 78 mg/dL) ao dos indivíduos não-diabéticos (91 ± 12 mg/dL). Relativamente aos indivíduos diabéticos, os valores de glicemia mais altos encontravam-se nos indivíduos com DM1 (232 ± 74 mg/dL) comparativamente com os indivíduos com DM2 (197 ± 78 mg/dL).

Para os níveis de colesterol total (figura 4) obteve-se uma média de 177 ± 41 mg/dL na generalidade da amostra. Nos indivíduos controlo, para este parâmetro, obteve-se um valor médio de 203 ± 39 mg/dL, enquanto nos indivíduos diabéticos a média dos valores de colesterol foi de 177 ± 41 mg/dL.

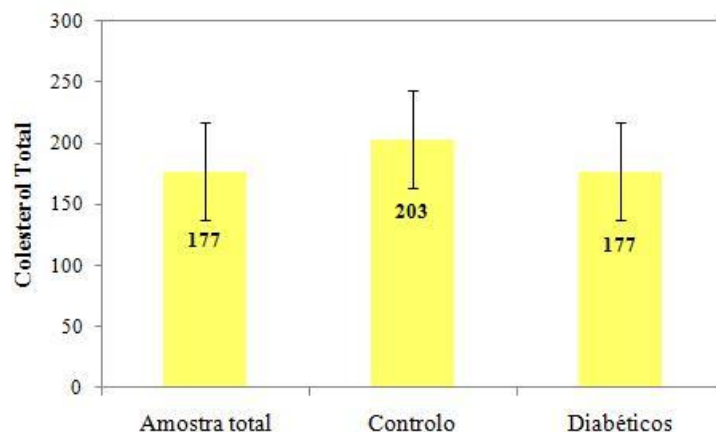


Figura 4 - Média dos valores de colesterol total para a totalidade dos indivíduos que constituíam a amostra (n=87), controlos (n=24) e diabéticos (n=63).

Nos indivíduos com DM1 e DM2, os valores mantiveram-se próximos da média dos diabéticos, com médias de 172 ± 39 mg/dL e 177 ± 43 mg/dL, respectivamente (figura 5).

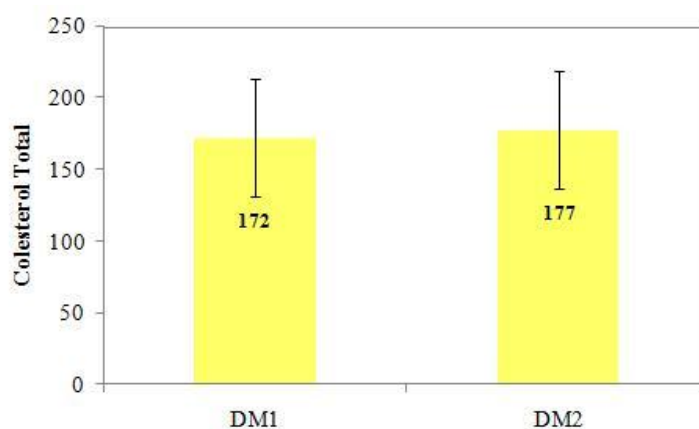


Figura 5 - Média dos valores de colesterol total para os indivíduos com DM1 (n=12) e DM2 (n=51).

Relativamente à média das idades ou sexo dos indivíduos, não está disponível qualquer tipo de informação.

3.2 Amplificação de genes por PCR e electroforese

Numa fase inicial, todas as amostras foram submetidas a amplificação por PCR para identificação do polimorfismo I/D (como descrito no capítulo anterior), sendo apenas 55 submetidas à amplificação específica para o *primer* de inserção (figura 6).

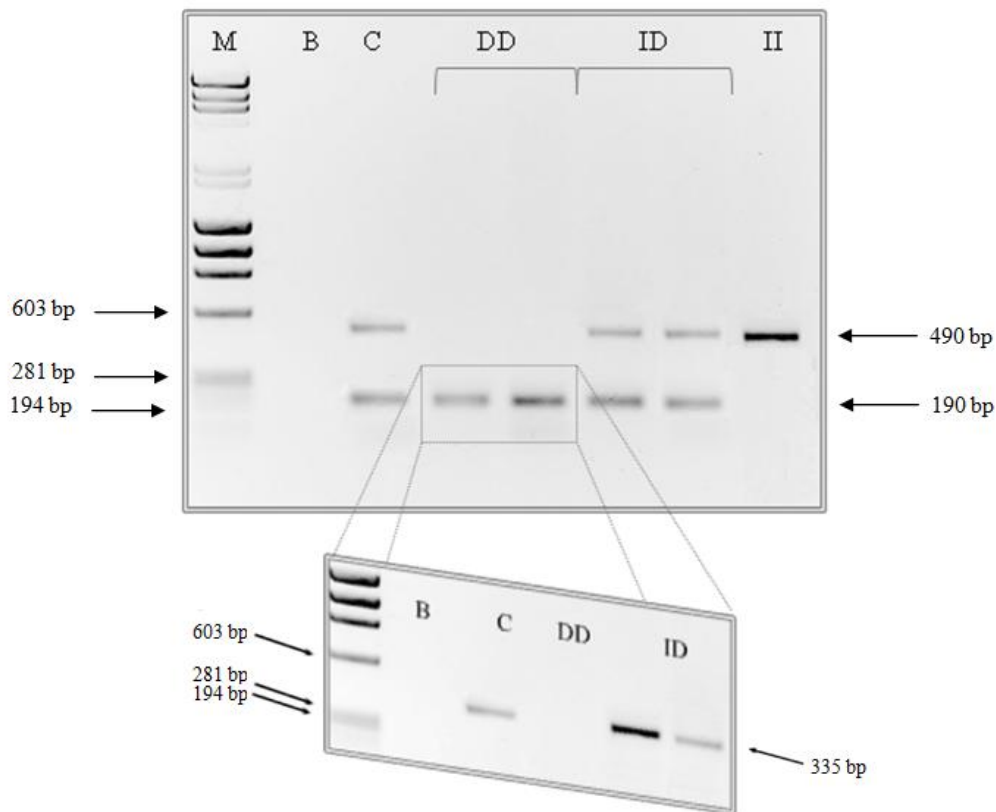


Figura 6 - Em cima: Amplificação inicial por para detecção do polimorfismo I/D; Em baixo: Amplificação específica para o alelo I. Legenda: M – Marcador de Peso Molecular; B – Ensaio em Branco; C – Controlo (Polimorfismo ID em ambos os casos); DD – Polimorfismo deleção/deleção; ID – Polimorfismo inserção/deleção; II – Polimorfismo inserção/inserção.

Das 55 amostras re-amplificadas 8 alteraram o genótipo inicialmente descrito como D/D para I/D. Para um intervalo de confiança de 95% ($p=0,008$) é possível afirmar que existe uma mudança estatisticamente significativa, demonstrando a importância desta segunda amplificação.

3.3 Relação entre Diabetes *mellitus* e Polimorfismo I/D

3.3.1 Distribuição do Polimorfismo I/D

Com o objectivo de avaliar a distribuição do polimorfismo I/D na população portuguesa determinou-se a frequência em que ocorre cada genótipo na amostra em estudo (quadro III e figura 7). A moda desta variável (valor mais frequente) é o genótipo D/D, com 54%.

Quadro III – N° de casos e frequência relativa de cada genótipo na amostra em estudo.

	GENÓTIPO		
	I/I	I/D	D/D
N° de casos	7	33	47
Percentagem (%)	8%	38%	54%

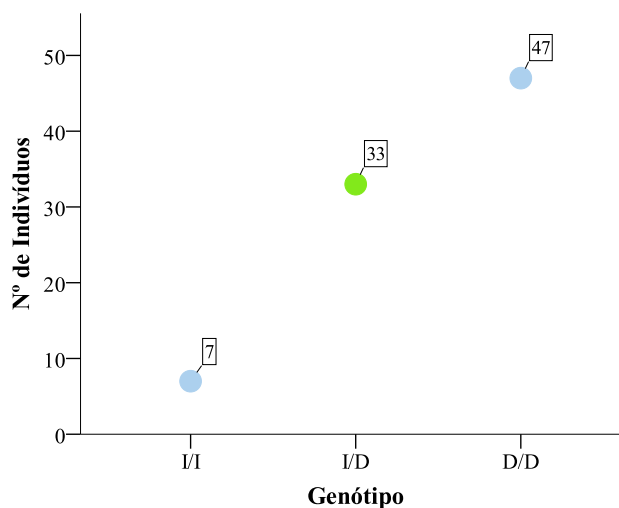


Figura 7 – Número de indivíduos em que ocorre cada genótipo na amostra em estudo.

Observou-se uma frequência alélica de 0,27 para o alelo de inserção e de 0,73 para o alelo de deleção. De acordo com a frequência genotípicas observadas, a população em estudo foi testada pelo Qui-Quadrado, encontrando-se sob o equilíbrio Hardy-Weinberg ($p > 0,05$).

Quando testadas através da análise inferencial Binomial, todas as classes da amostra revelaram uma proporção de indivíduos com genótipo I/I muito inferior à dos genótipos I/D e D/D ($p < 0,05$), demonstrando uma frequência bastante pequena deste genótipo na população.

3.3.1.1 Distribuição do Polimorfismo na Diabetes *mellitus*

De forma a analisar a relação entre o polimorfismo em estudo e a incidência de DM, efectuou-se uma análise descritiva dos dados recolhidos, seguindo-se a análise inferencial sobre os resultados.

Como demonstra a figura 8, para indivíduos não-diabéticos observou-se uma frequência de 4,2% ($n=1$) no genótipo I/I, de 37,5% ($n=9$) no genótipo I/D e de 58,3% ($n=14$) para o genótipo D/D. Para indivíduos diabéticos observou-se uma frequência de 9,5% ($n=6$) para o genótipo I/I, de 38,1% ($n=24$) para o genótipo I/D e de 52,4% ($n=33$) para o genótipo D/D.

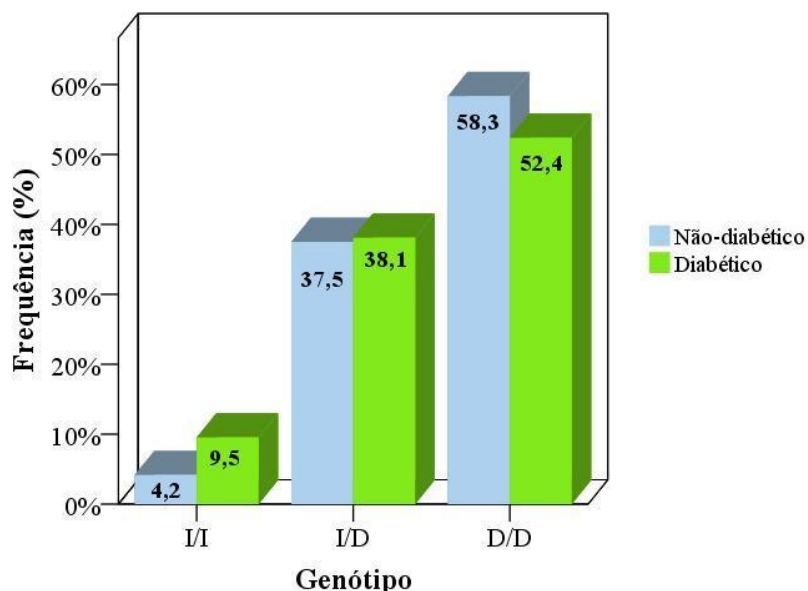


Figura 8 - Frequência relativa (%) de cada genótipo em indivíduos diabéticos e não diabéticos.

Através da análise inferencial Qui-Quadrado, que permite comparar os valores obtidos nos indivíduos diabéticos e controlos, obteve-se um valor $p=0,692$. Este resultado demonstra não haver associação entre a DM e o genótipo obtido.

3.3.1.2 Distribuição do polimorfismo na DM2

Para avaliar se a incidência de DM2 varia consoante o genótipo efectuou-se uma análise estatística inferencial semelhante à apresentada anteriormente, mas focalizada apenas em indivíduos com DM2.

Como se verifica no quadro IV e na figura 9, nos indivíduos com DM1 ($n=12$) observou-se uma frequência de 50,0% ($n=6$) para o genótipo I/D e D/D. Não se observou nenhum caso para o genótipo I/I. Nos indivíduos com DM2 ($n=51$) observou-se uma frequência de 11,8 ($n=6$) para o genótipo I/I, de 35,3% ($n=18$) para o genótipo I/D e de 52,9% ($n=27$) para o genótipo D/D.

Quadro IV - Frequência de cada genótipo nos indivíduos diabéticos e não-diabéticos.

	GENÓTIPO		
	<i>I/I</i>	<i>I/D</i>	<i>D/D</i>
Controlos	1 (4,2%)	9 (37,5%)	14 (58,3%)
Diabéticos	6 (9,5%)	25 (39,7%)	32 (50,8%)
* <i>Tipo 1</i>	0 -	6 (50%)	6 (50%)
* <i>Tipo 2</i>	6 (11,8%)	18 (35,3%)	27 (52,9%)

A figura 9 demonstra a frequência de cada genótipo em indivíduos com DM1 e DM2, não tendo sido encontrados indivíduos com genótipo I/I no grupo de indivíduos com DM1.

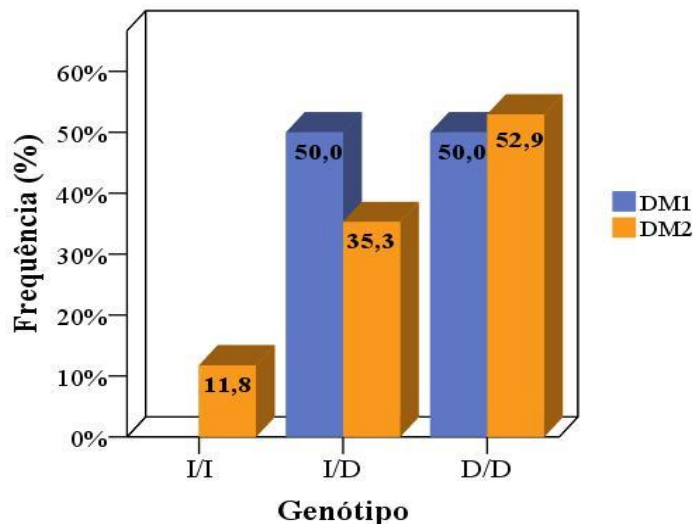


Figura 9 - Frequência relativa (%) de cada genótipo em indivíduos com DM1 e DM2.

A análise do genótipo I/D através do teste binomial, origina um valor $p=0,023$, demonstrando uma maior incidência de indivíduos com DM2 neste genótipo. No entanto, quando comparados os três genótipos, a análise estatística inferencial origina um valor de $p=0,256$ não permitindo a rejeição de H_0 e demonstrando que a DM2 e o genótipo são independentes.

3.3.2 Polimorfismo I/D e níveis de glicemia

Para avaliar a variação dos níveis de glicemia, estes foram analisados em função do genótipo, da presença de DM e do tipo de DM.

3.3.2.1 Glicemia e Classificação da Diabetes

Na comparação entre os níveis de glicemia e a classificação da doença foi possível observar um nível médio de glicemia de 232 ± 74 mg/dL nos diabéticos tipo 1 e de 197 ± 78 mg/dL nos diabéticos tipo 2 (figura 10).

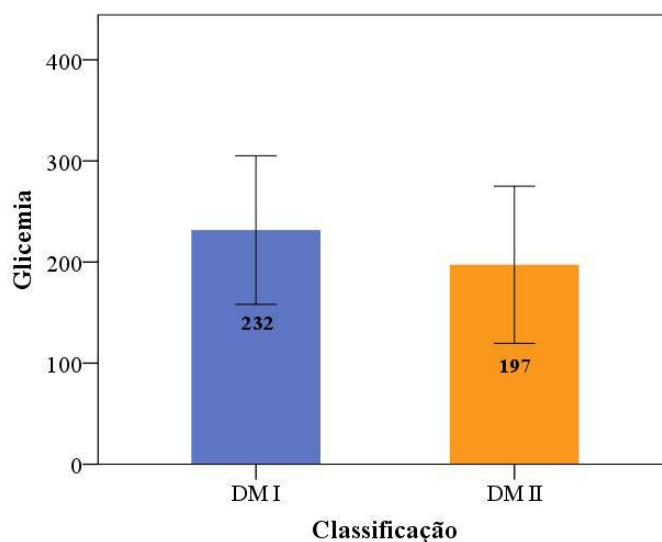


Figura 10 - Níveis médios de glicemia nos indivíduos com DM1 e DM2.

Após realização do teste t para amostras independentes observou-se que, para um intervalo de confiança de 95%, não existem evidências estatísticas que permitam afirmar que a média dos valores de glicemia é diferente consoante o tipo de diabetes ($p=0,171 > \alpha=0,05$).

3.3.2.2 Associação entre Glicemia e Genótipo

Os valores médios de glicemia em cada genótipo foram também analisados, sendo posteriormente estudada a possível relação entre este parâmetro e o genótipo.

Os resultados aqui obtidos revelam que os níveis médios de glicemia são mais elevados no genótipo I/I com 222 ± 81 mg/dL, seguindo-se o genótipo I/D com 190 ± 85 mg/dL e por fim o genótipo D/D com 154 ± 78 mg/dL (Figura 11).

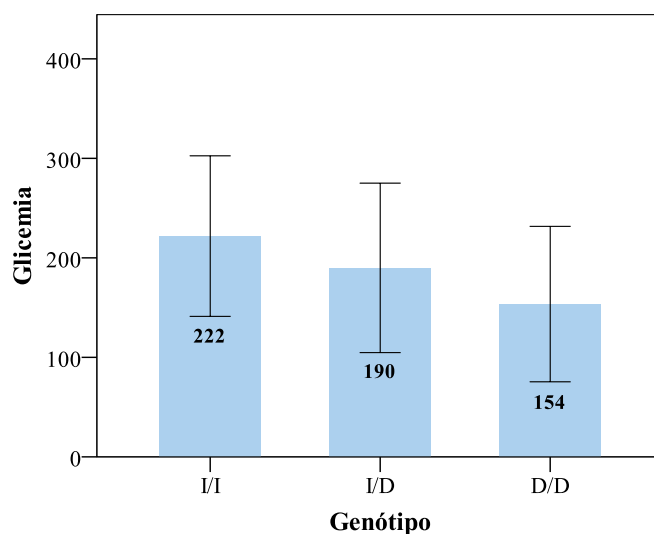


Figura 11 - Níveis médios de glicemia em função do genótipo.

Através do teste estatístico *one-way* ANOVA obteve-se $F(2,84)=3,347$, $p=0,040$ o que, para um nível de significância de 0,05, permite rejeitar H_0 e afirmando assim que a média dos valores de glicemia difere em pelo menos dois dos genótipos. Para esclarecer quais, utilizou-se o teste *Post-hoc* LSD de Fisher onde se observou que os valores de glicemia eram estatisticamente diferentes no genótipo D/D, quando comparado com o genótipo I/I ($p=0,041$). Não foi observada diferença estatisticamente significativa quando efectuadas as restantes comparações.

3.3.2.3 Glicemia e Genótipo em indivíduos diabéticos

Posteriormente, efectuou-se a mesma análise contrastando os indivíduos diabéticos com os indivíduos controlo. Como se pode observar na figura 12 obteve-se para o genótipo I/I valores médios de glicemia de $242\pm 65\text{mg/dL}$ (diabéticos¹); para o genótipo I/D $86\pm 13\text{mg/dL}$ (não-diabéticos) e $229\pm 65\text{mg/dL}$ (diabéticos); e para o genótipo D/D $94\pm 11\text{mg/dL}$ (não-diabéticos) e $179\pm 81\text{mg/dL}$ (diabéticos).

¹ Como apenas um indivíduo abrange as variáveis “não diabético” e “genótipo I/I” ($n=1$) não foram calculadas a média e desvio-padrão.

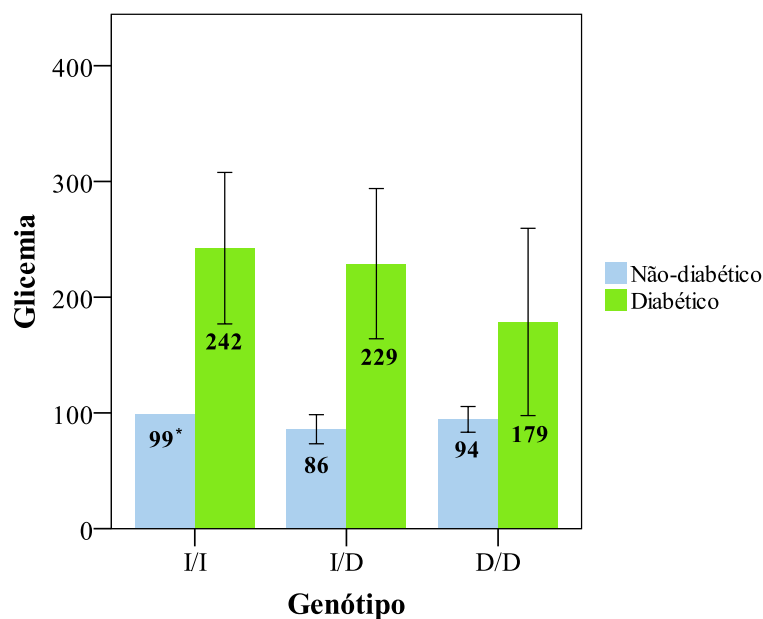


Figura 12 - Níveis de glicemia e sua relação com o genótipo em indivíduos diabéticos e não-diabéticos. *Sem desvio-padrão (n=1)

Através do teste *one-way* ANOVA obteve-se $F(2,60) = 4,122$, $p=0,021$, o que permite rejeitar H_0 e afirmar que a média dos valores de glicemia tem uma variação estatisticamente significativa em, pelo menos, dois genótipos. O teste *post hoc* LSD de Fisher revelou que os valores de glicemia são estatisticamente diferentes entre os genótipos D/D e I/D ($p=0,014$).

3.3.2.4 Glicemia e Genótipo na DM2

Para averiguar se o tipo de DM influencia a distribuição do polimorfismo em estudo em relação aos valores de glicemia, comparou-se a variação dos valores médios de glicemia em cada genótipo nos indivíduos com DM1 e DM2. Para a DM1, observaram-se os seguintes resultados (figura 13): 223 ± 83 mg/dL para o genótipo I/D e 240 ± 70 mg/dL para o genótipo D/D. Na DM2 observaram-se valores médios de glicemia de 242 ± 65 mg/dL para o genótipo I/I, 231 ± 61 mg/dL para o genótipo I/D e 165 ± 78 para o genótipo D/D.

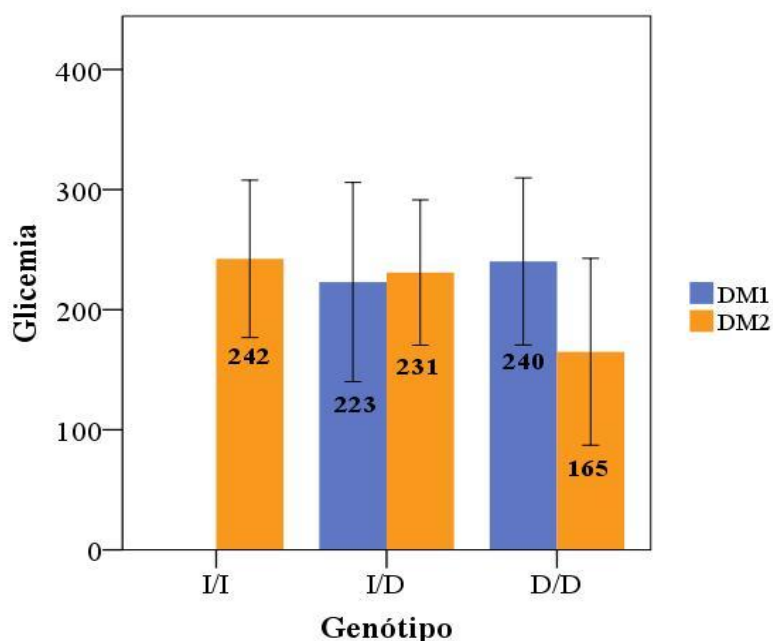


Figura 13 - Níveis de glicemia e sua relação com o genótipo em indivíduos com DM1 e DM2

Nos indivíduos com DM2, através do teste *one-way* ANOVA, obteve-se um valor de $F(2,48)=6,054$, $p=0,005$, o que revela uma diferença estatisticamente significativa entre os genótipos. Através do *post hoc* LSD de Fisher foi possível observar diferenças estatisticamente significativas entre os genótipos I/I e D/D ($p=0,019$) e os genótipos I/D e D/D ($p=0,004$). Este resultado demonstra que o genótipo D/D está associado a valores mais baixos de glicemia nos indivíduos com DM2.

3.3.3 Polimorfismo I/D e Insulinoterapia

A relação entre o polimorfismo I/D e a utilização de insulina como tratamento na DM foi analisada, considerando inicialmente o valor de referência para a população portuguesa e, posteriormente, na amostra em estudo, em particular nos indivíduos com DM2.

3.3.3.1 Insulinoterapia na DM2

No presente estudo, a percentagem de DM2 insulino-dependentes foi de 43,1% (n=22) e a percentagem de DM2 não-insulino-dependentes foi de 56,9% (n=29) (figura 14). A análise estatística inferencial permitiu observar que a percentagem de indivíduos com DM2 insulino-dependentes é superior a 11% (valor referência para a população em estudo).

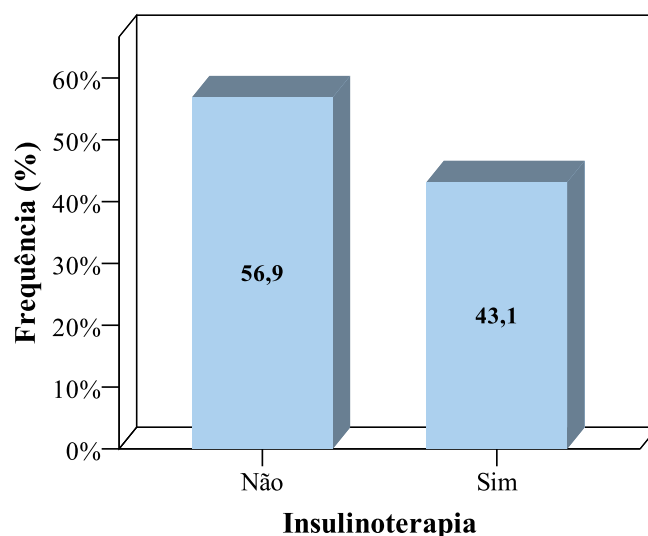


Figura 14 - Frequência relativa (%) de indivíduos insulino-dependentes em DM2.

3.3.3.2 Associação entre Insulinoterapia e Genótipo

Na figura 15 é possível observar o número de casos de insulino-dependentes e a sua relação com o genótipo. Nos indivíduos não-insulino-dependentes obteve-se uma frequência de casos com genótipo I/I de 13,8% (n=2), com genótipo I/D de 34,5% (n=14) e com genótipo D/D de 51,7% (n=18). Nos indivíduos insulino-dependentes obteve-se uma frequência de casos com genótipo I/I de 5,9% (n=4), com genótipo I/D de 41,2% (n=10) e com genótipo D/D de 52,9% (n=15).

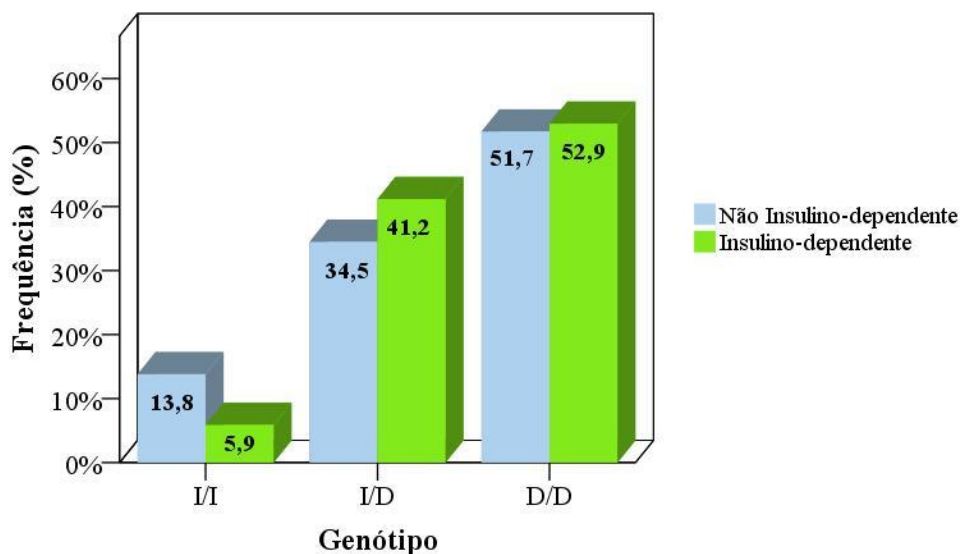


Figura 15 - Frequência relativa (%) de cada genótipo em indivíduos insulino-dependentes e não-insulino-dependentes.

A análise estatística binomial resultou num valor de $p=0,004$ na associação entre o genótipo I/I e I/D e de $p\sim 0$ na associação entre o genótipo I/I e D/D, demonstrando que existe uma maior proporção de indivíduos que utilizam insulina com genótipo I/D e D/D. Contudo, para um intervalo de confiança de 95%, como $p=0,378$, não é possível demonstrar a associação entre a utilização de insulina e o genótipo.

3.3.3.3 Associação entre Insulinoterapia e Genótipo na DM2

A mesma análise estatística foi realizada, mas em particular nos indivíduos com DM2 (figura 16). Nos indivíduos insulino-dependentes com DM2 obteve-se uma frequência de casos com genótipo I/I de 9,1% ($n=2$), com genótipo I/D de 36,4% ($n=8$) e com genótipo D/D de 54,5% ($n=12$).

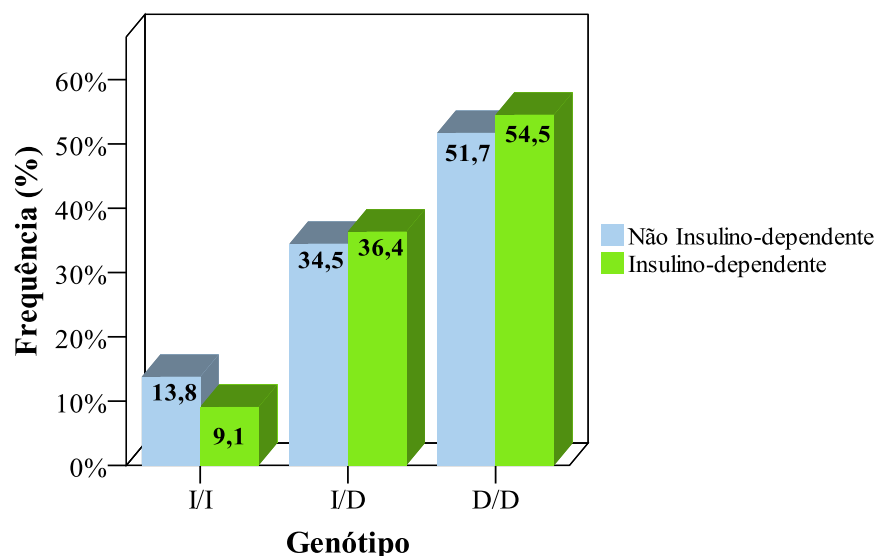


Figura 16 - Frequência relativa (%) de cada genótipo em indivíduos insulino-dependentes e não-insulino-dependentes com DM2.

A análise estatística binomial, nos indivíduos que utilizam insulina, resultou num valor de $p=0,013$ quando comparados os genótipos I/I e D/D, o que permite afirmar que a proporção de indivíduos insulino-dependentes com genótipo D/D é bastante mais elevada, sendo superior a 50%. Contudo, a comparação dos três genótipos através do teste Qui-Quadrado, como $p=0,490$, não permite demonstrar uma associação entre a insulino-terapia e o genótipo, nos indivíduos com DM2.

3.3.4 Associação entre o polimorfismo I/D e Diabetes *mellitus* na Hipertensão arterial

Para analisar a possível associação entre a DM e a HTA na distribuição do polimorfismo I/D, avaliou-se a significância estatística da simultaneidade destas duas patologias.

3.3.4.1 Co-patologia na DM

Na figura 17, nos indivíduos onde não ocorre simultaneidade de patologias é possível observar uma frequência de casos com genótipo I/I de 2,6% (n=1), com genótipo I/D de 47,4% (n=18) e com genótipo D/D 50,0% (n=19). Nos indivíduos onde ocorre simultaneidade de patologias é possível observar uma frequência de casos com genótipo I/I de 12,2% (n=6), com genótipo I/D de 30,6% (n=15) e com genótipo D/D 57,1% (n=28).

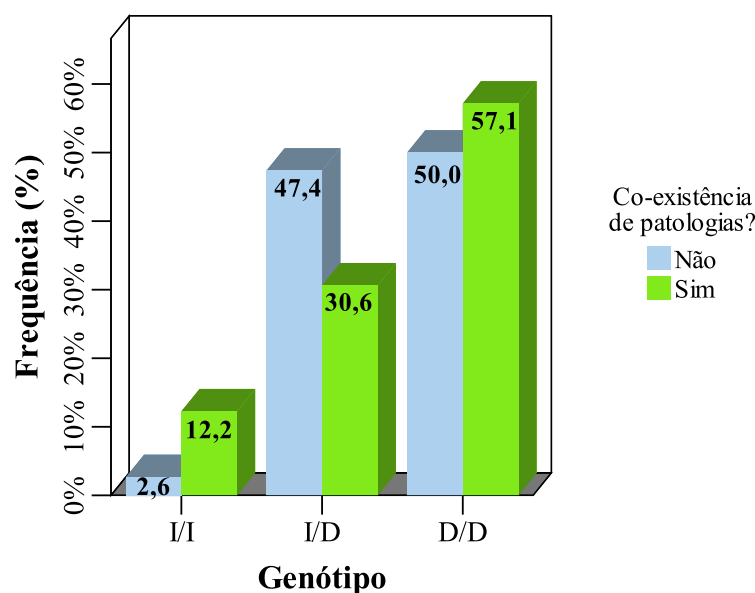


Figura 17 – Frequência relativa (%) de indivíduos onde ocorre co-existência de DM e HTA na amostra em estudo.

Para analisar a proporção de indivíduos onde ocorre co-existência das duas patologias foi utilizado o teste Binomial. Aqui, obteve-se um valor de p aproximadamente zero quando comparados os genótipos I/I e D/D, demonstrando uma proporção bastante mais elevada de indivíduos com genótipo D/D. Contudo, na comparação dos três genótipos através do teste Qui-Quadrado, não foi encontrada diferença estatisticamente significativa. Desta forma, não é possível afirmar que exista uma associação entre a existência, em simultâneo, das duas patologias e o genótipo.

3.3.4.2 Co-patologia na DM2

Na figura 18, referente aos indivíduos com DM2, nos indivíduos onde não ocorre simultaneidade de patologias é possível observar uma frequência de casos com genótipo I/I de 9,1% (n=1), com genótipo I/D de 45,5% (n=5) e com genótipo D/D 45,5% (n=5). Nos indivíduos onde ocorre simultaneidade de patologias é possível observar uma frequência de casos com genótipo I/I de 12,5% (n=5), com genótipo I/D de 32,5% (n=13) e com genótipo D/D 55,0% (n=22).

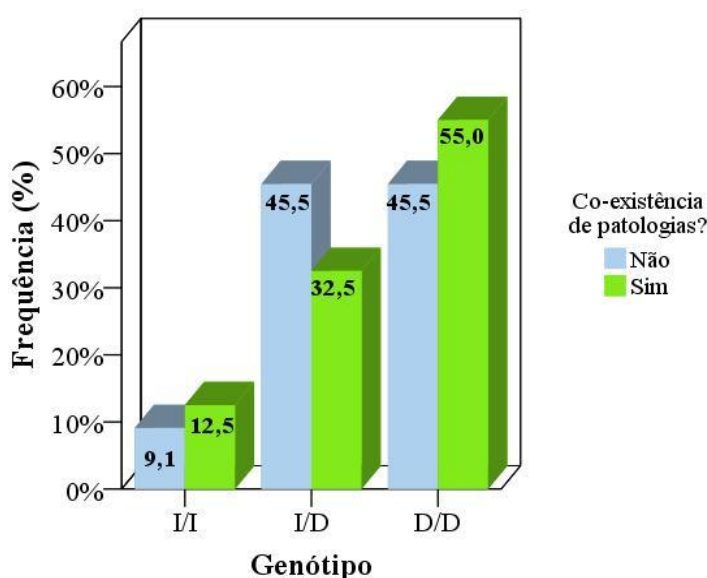


Figura 18 - Frequência relativa (%) de indivíduos com DM2 onde ocorre co-existência de DM e HTA.

Tal como demonstrado anteriormente para a generalidade dos diabéticos, também nos indivíduos com DM2, foi possível observar uma proporção mais elevada de indivíduos com genótipo D/D ($p=0,002$) aquando da ocorrência de DM e HTA concomitantemente. No entanto, também aqui a comparação dos três genótipos pelo Qui-Quadrado revelou não haver associação entre o genótipo e a ocorrência simultânea das duas patologias ($p=0,464$).

Para uma probabilidade de erro de 5% não existem evidências estatísticas que suportem a rejeição da hipótese nula e que desta forma permitam afirmar que existe associação entre a simultaneidade de patologias e o genótipo quer na totalidade da amostra, quer em diabéticos tipo 2.

DISCUSSÃO

Capítulo 4: Discussão	67
4.1 Parâmetros Bioquímicos	67
4.2 Genotipagem	68
4.3 Polimorfismo ECA e DM	68
4.3.1 Polimorfismo e níveis de glicemia.....	69
4.3.2 Polimorfismo I/D e insulino-terapia.....	70
4.3.3 Polimorfismo I/D na DM e HTA	71
4.4 Limitações do estudo	72

Capítulo 4: Discussão

4.1 Parâmetros Bioquímicos

Na análise dos parâmetros bioquímicos foi possível observar níveis de glicemia mais elevados nos indivíduos diabéticos. Este resultado já era esperado, uma vez que a DM tem como principal característica o aumento dos níveis de glicemia. Este valor é, no entanto, mais elevado do que seria desejável ($204 \pm 72 \text{mg/dL}$) podendo sugerir uma elevada falta de controlo dos níveis de glicemia nestes indivíduos. Por outro lado, existem diversos factores que podem alterar os níveis de glicemia que não estão relacionados com a patologia em estudo como as elevações pontuais, o *stress* traumático e infeccioso.

Os valores de glicemia dos indivíduos com DM1 eram mais altos quando comparados com os de indivíduos com DM2. Este resultado pode estar relacionado com o facto de os indivíduos com DM2 poderem mais facilmente melhorar o seu estado de saúde através de alterações no estilo de vida (ex: aumento da actividade física e alteração dos hábitos alimentares), que induzem uma diminuição dos níveis de glicemia.

Os níveis mais baixos de colesterol total foram observados nos indivíduos com DM2. Este resultado poderá estar relacionado com o aumento da educação na saúde dos indivíduos com DM2 e com o facto de estes indivíduos serem sujeitos a um maior controlo médico pelo risco de desenvolverem doenças cardiovasculares. No entanto, esta observação não é consistente com o estudo efectuado por Feng e cols., que demonstraram existirem níveis mais altos de colesterol total em indivíduos com DM2 (Feng et al., 2002).

4.2 Genotipagem

O genótipo de cada indivíduo foi obtido através de amplificação por PCR, tendo sido efectuada uma amplificação mais específica a todas as amostras com genótipo D/D. Esta re-amplificação é utilizada para evitar que ocorra *mistyping*, tendo originado alteração genotípica de 8 amostras de “D/D” para “I/D”. A importância desta re-amplificação foi demonstrada em vários trabalhos. No presente estudo foi verificada a importância desta reacção ($p=0,008$) no sentido de aumentar a sensibilidade da genotipagem (Naresh et al., 2010, Shanmugam et al., 1993).

4.3 Polimorfismo ECA e DM

O principal objectivo deste estudo consistia na análise do padrão de distribuição do polimorfismo I/D da ECA numa amostra de indivíduos portugueses com DM2. Este polimorfismo consiste na inserção de um fragmento Alu de 287bp no intrão 16 do gene DCP1, podendo originar três genótipos distintos: I/I, I/D e D/D.

A amostra em estudo demonstrou estar sob o equilíbrio de Hardy-Weinberg, o que significa que a frequência alélica desta população se manteve constante com o passar das gerações. Este facto demonstra que a população em estudo não se encontra sob influências mutagénicas ou migratórias, não evidenciando o decorrer de um processo de evolução natural (Rodriguez et al., 2009).

O genótipo observado com maior frequência foi o genótipo D/D, não tendo sido encontrada uma significância estatística a este nível. Este resultado vai de encontro aos resultados obtidos em outros estudos onde também foi encontrada uma maior frequência do genótipo D/D nas populações em estudo (Baroudi et al., 2009, Feng et al., 2002).

A possível associação entre a DM e o polimorfismo I/D tem sido alvo de estudo por muitos autores. Esta teoria baseia-se nas alterações patofisiológicas provocadas pela ECA no pâncreas. Esta enzima está associada a vasoconstrição, fibrose e inflamação, que poderão originar disfunção das células β -pancreáticas e, a longo prazo, diabetes.

Neste estudo não foi encontrada associação entre o genótipo e a DM, quer na generalidade dos indivíduos diabéticos, quer nos indivíduos com DM2. Contudo, nos indivíduos heterozigóticos foi observada uma maior proporção de indivíduos com DM2, comparativamente com os indivíduos com DM1. Os estudos efectuados anteriormente demonstraram resultados contraditórios. Lee e cols. não encontraram associação entre a DM e o polimorfismo em estudo mas, no entanto, Zhou e cols., na sua meta-análise onde incluíam 24 estudos e mais de 15 mil indivíduos conseguiram demonstrar uma associação entre a homozigotia para o alelo D e a DM2 (Zhou et al., 2009, Lee e Tsai, 2002). Os estudos efectuados por Al-Harbi e cols. e por Feng e cols. corroboram a teoria de Zhou e cols. uma vez que estes também encontraram uma forte associação entre o alelo D e maior risco de desenvolvimento de DM2 (Feng et al., 2002, Al-Harbi et al., 2011). A importância do alelo I no desenvolvimento desta patologia foi também apresentada no trabalho realizado por Ryan e cols. Nesse estudo, foi demonstrada uma maior resistência insulínica associada à presença do alelo I, indicando uma maior predisponibilidade para o desenvolvimento de DM2 nestes indivíduos (Ryan et al., 2001).

4.3.1 Polimorfismo e níveis de glicemia

Em relação aos níveis de glicemia, estes não se mostraram dependentes do tipo de diabetes ($p=0,171$). No entanto, os valores de glicemia mais elevados foram encontrados nos indivíduos com genótipo I/I, quer na generalidade da amostra ($p=0,04$), quer nos indivíduos com DM2 ($p=0,019$), quando comparados com os controlos. Esta observação é consistente com os resultados obtidos por Ryan e cols. No seu estudo, em mulheres obesas, encontraram associação entre o genótipo I/I e uma menor utilização de glicose (Δ 32%) devido a maior resistência insulínica. As mulheres com genótipo I/I tinham assim níveis de glicemia mais elevados quando comparados com outros genótipos (Ryan et al., 2001). No estudo da população do Rio de Janeiro efectuado por Cardoso e cols. também foram observados níveis mais elevados de glicemia nas mulheres com genótipo I/I. No entanto, quando analisados os indivíduos do sexo masculino, os resultados observados não foram semelhantes, existindo níveis mais elevados de glicemia nos indivíduos com genótipo D/D (Cardoso et al., 2008).

Outros estudos demonstraram resultados contraditórios. Kim e Valkengoed e cols. não encontraram qualquer associação entre os valores médios de glicemia e o genótipo. No entanto, Bonnet e cols. encontraram uma associação entre este parâmetro e o genótipo D/D mas, apenas nas medições efectuadas 2h após ingestão de alimentos (van Valkengoed et al., 2008, Bonnet et al., 2008, Kim, 2009).

4.3.2 Polimorfismo I/D e Insulinoterapia

A insulinoterapia não consta na terapêutica de primeira linha da DM2. Os indivíduos com esta patologia são inicialmente tratados com ADO, na tentativa de aumentar a produção de insulina basal ou melhorar o aproveitamento da mesma. Com o avançar da doença ou até mesmo quando a terapêutica convencional não permite atingir os níveis de glicemia desejados, a insulinoterapia é introduzida.

Como referido no Relatório Anual da Sociedade Portuguesa de Diabetologia, o número de indivíduos com DM2 que utiliza apenas insulina ou ADO e insulina ronda os 11% (SPD, 2010). Neste estudo, este valor parece ser bastante superior ao valor de referência. Este facto pode estar relacionado com diversos factores. Em primeiro lugar, a DM2 é uma patologia que se desenvolve na idade adulta, revelando-se principalmente em indivíduos idosos. Nestes indivíduos, paralelamente ao envelhecimento, há ocorrência de alterações metabólicas, estruturais e funcionais que alteram a evolução da doença e a resposta às terapêuticas implementadas. Desta forma, é possível que a terapia com ADO não responda de forma adequada à regulação dos níveis de glicemia, aumentando a frequência de administração de insulina. Por outro lado, a falta de coordenação dos dados clínicos dos indivíduos entre-instituições e a falta de comunicação, podem muitas vezes levar a uma classificação errónea do tipo de diabetes. Segundo o Relatório Anual do Observatório Nacional da Diabetes, cerca de 24% dos indivíduos com DM1 utiliza além da insulina, ADO (SPD, 2010). Isto demonstra, que o processo de classificação da doença deve ser cuidado e baseado em factos relacionados com a etiologia da doença, uma vez que a correcta classificação é crucial para a correcta implementação do esquema terapêutico.

Neste estudo não foi encontrada associação entre a insulino terapia e o genótipo. Contudo, foi possível observar uma maior utilização de insulina por parte dos indivíduos heterozigóticos e homozigóticos para o alelo D. Esta observação pode sugerir uma possível associação ao alelo D. A mesma observação foi efectuada quando analisados apenas os indivíduos com DM2. Este resultado é suportado pelo estudo efectuado por Bonnet e cols. que evidenciaram uma associação entre o alelo D e uma menor secreção de insulina (Bonnet et al., 2008). Nestes indivíduos, um esquema terapêutico baseado na administração de ADO não terá o efeito desejado nos níveis de glicemia, uma vez que a problemática não se relaciona com a resistência à utilização da insulina endógena, mas sim na falta de produção desta.

Esta observação está também relacionada com a efectuada na associação com os níveis de glicemia. Apesar da falta de associação demonstrada, observou-se uma média inferior de glicemia nos indivíduos com genótipo D/D. Esta observação poderá estar relacionado com o facto de estes indivíduos utilizarem além dos antidiabéticos orais, insulina para controlo dos níveis glicemicos. Contudo, estes resultados contradizem os obtidos por Jeng e cols. que evidenciaram uma maior sensibilidade à insulina endógena nos indivíduos com genótipo D/D. Estes indivíduos possuíam assim valores mais baixos de glucose e de insulina (Jeng et al., 1997).

4.3.3 Polimorfismo I/D na DM e HTA

Quando analisada a relação entre o polimorfismo I/D e a incidência simultânea de DM e HTA, os resultados foram igualmente limitados. Apesar da maior incidência de co-patologia em indivíduos com genótipo D/D, esta não se reflecte como estatisticamente significativa. Estes resultados estão de acordo com o estudo efectuado por Jeng e cols. em que não foi encontrada diferença entre o nível de resistência à insulina nos indivíduos hipertensos, descartando uma possível associação entre a DM2 e a HTA. No entanto, Ramachandrat e cols. encontraram associação entre o genótipo D/D e a presença de DM2 e HTA, demonstrando uma associação significativa nos indivíduos com DM2 e HTA em simultâneo. No estudo efectuado por Cardoso e cols. foram observados níveis mais elevados de glicemia nos indivíduos hipertensos. Neste trabalho

foi também observada uma maior prevalência de microalbuminúria nos indivíduos com genótipo D/D, sendo este um indicador de risco cardiovascular nos indivíduos com DM (Cardoso et al., 2008).

4.4 Limitações do estudo

Neste estudo podem-se referir várias limitações que podem ir desde a recolha dos dados e amostra à própria metodologia de extracção.

Em primeiro lugar, o número de indivíduos que constituem a amostra demonstra ser ainda diminuto, sendo consequência do tempo necessário para a recolha da amostra. A DM é uma patologia com diferentes características em cada indivíduo, sendo que para transpor os resultados para a população portuguesa será necessário aumentar a amostra para que esta se torne representativa da população. Em vários testes foi encontrada uma maior incidência de determinado genótipo, como no caso da variação glicémica ou na utilização de insulina. Contudo, a análise acabou por não revelar associação com o genótipo, o que talvez possa ser explicada por uma pequena amostra.

Por outro lado, os dados clínicos foram fornecidos pelos próprios indivíduos, o que pode por vezes originar erros de interpretação. Muitos indivíduos não têm uma plena percepção da patologia podendo, por vezes, fornecer informação errada, o que limita o estudo na análise de parâmetros como a classificação da Diabetes.

Pelo facto de terem sido utilizadas metodologias distintas para obtenção dos parâmetros bioquímicos a sua interpretação pode estar, de algum modo, limitada. As amostras biológicas foram obtidas por recolha de sangue periférico ou capilar, sendo que a análise dos parâmetros bioquímicos como a glicemia e o colesterol total por diferentes métodos pode originar valores diferentes, devido ao erro de medição associado aos aparelhos em uso.

CONCLUSÃO

Capítulo 5: Conclusão

A DM2 é uma patologia multifactorial com elevada taxa de morbilidade e mortalidade. A esta têm sido associados vários factores de risco, desde a obesidade às mutações genéticas, que podem provocar alterações ao nível da homeostasia metabólica da glicose, levando em último caso ao aparecimento de DM.

A ECA é o componente-chave que interliga as duas cascatas mais importantes no controlo do equilíbrio electrolítico – renina-angiotensina-aldosterona e cininacalicrofina. Desta forma, esta enzima encontra-se relacionada com diversos processos patofisiológicos como a HTA. A sua actividade pró-inflamatória e pró-oxidante, bem como a sua relação no aumento da fibrose pancreática são factores que indicam uma possível associação entre as alterações fisiológicas da ECA e o aparecimento da DM2.

O polimorfismo I/D, presente no intrão 16, é a variação genética mais estudada desta enzima. Apesar dos vários estudos realizados, os resultados são bastante contraditórios em todos os parâmetros estudados.

No presente estudo, não foi encontrada associação entre a DM2 e o genótipo. No entanto, nos indivíduos com genótipo I/D observou-se uma maior incidência de DM2. Isto sugere que, possivelmente, um aumento do tamanho da amostra possa revelar uma associação agora não apresentada. Uma anamnese mais aprofundada poderá também evitar erros de classificação que podem camuflar associações existentes.

Em relação aos níveis de glicemia, também não foi encontrada associação com o genótipo. No estudo deste parâmetro observou-se uma ocorrência semelhante à anterior. Apesar de não haver associação genotípica, observa-se uma tendência para níveis mais elevados de glicose nos indivíduos com genótipo I/I. Desta forma, tal como referido anteriormente, a análise deste parâmetro poderá beneficiar de um aumento amostral e da uniformização da análise laboratorial, de forma a evitar erros associados à medição.

No estudo da insulino-terapia na DM2, também não foi encontrada associação com o genótipo. No entanto, tal como nas restantes análises, observou-se uma maior incidência do genótipo D/D no grupo dos insulino-dependentes.

Considerando a importância da actividade da ECA na hipertensão, analisou-se a possível associação entre o polimorfismo I/D e a ocorrência simultânea de HTA e DM. Aqui, apesar da maior incidência de indivíduos com genótipo D/D não foi encontrada associação entre o genótipo e a ocorrência das duas patologias em simultâneo.

Apesar de não ser demonstrada a associação entre o polimorfismo I/D da ECA e a DM2, este estudo demonstra uma maior ocorrência de alguns genótipos quando analisados face a determinado parâmetro.

Os estudos efectuados até agora têm sido bastante contraditórios, tendo sido referida em vários a elevada importância da interacção gene-gene. O desequilíbrio de ligação a que este polimorfismo estará sujeito, poderá ser a resposta para os resultados contraditórios encontrados. Desta forma, é necessário um estudo mais aprofundado da complexa interacção entre as diversas variações genéticas e ambientais que poderão estar associadas a este polimorfismo. Como referido anteriormente, o aumento da amostra em estudo também demonstra ser essencial para eliminar a incidência tendencial de alguns genótipos ou então demonstrar a associação entre estes e a patologia em estudo.

A DM e a HTA são duas patologias multifactoriais e por isso bastante complexas às quais estão associadas inúmeras variáveis que vão desde os factores que levam ao aparecimento da doença, passando pela evolução desta e pelos esquemas terapêuticos que, de facto, actuam no sentido de controlar os seus efeitos. Assim, qualquer trabalho futuro deverá ter em atenção não só a prevalência da doença, como também as pequenas, mas importantes, variáveis que a rodeiam. A obesidade é um factor de risco que se encontra associado ao aparecimento da DM2, pelo que a sua implicação e associação ao polimorfismo I/D deverá ser estudada considerando vários factores como o perfil lipídico e o perímetro abdominal. Outra das variáveis mais importantes no estudo da DM2 será os níveis de glicose, pelo que, devido à elevada variabilidade circadiana, deverão ser substituídos pelos níveis de hemoglobina glicada. Este parâmetro permitirá o estabelecimento de uma associação mais segura uma vez que reflecte o controlo glicémico durante um período de tempo considerável (~3meses). No que diz respeito à necessidade de adaptação dos esquemas terapêuticos relativamente à utilização de insulina, deverão ser analisados numa perspectiva não só de utilização *per se*, mas também em relação ao grau de utilização e taxa de resposta. No que respeita à

HTA, vários ajustes também deverão ser considerados, na medida em que é uma patologia que está presente na maioria dos indivíduos idosos, pelo que a sua associação com a DM deverá ser considerada com precaução. Aqui, deverão ser considerados factores como a evolução da doença hipertensiva face à evolução da DM, pelo que implica o acompanhamento do indivíduo diabético em estudo.

O estudo sucessivo e aprofundado de polimorfismos associados a estas patologias é cada vez mais importante uma vez que poderão auxiliar na compreensão de quais os indivíduos mais susceptíveis ao desenvolvimento de doença ou de complicações a estas associados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Capítulo 6: Referências bibliográficas

- A.D.A. (2006) Diagnosis and classification of diabetes *mellitus* (American Diabetes Association). *Diabetes Care*, 29 Suppl 1, S43-8.
- AKIN, F., TURGUT, S., BASTEMIR, M., TURGUT, G., KURSUNLUOGLU, R., KARASU, U. & GUCLU, A. (2010) Angiotensin-converting enzyme gene polymorphism in overweight and obese Turkish patients with insulin resistance. *DNA Cell Biol*, 29, 207-12.
- AL-HARBI, E. M., FARID, E. M., GUMAA, K. A., MASUADI, E. M. & SINGH, J. (2011) Angiotensin-converting enzyme gene polymorphisms and T2DM in a case-control association study of the Bahraini population. *Mol Cell Biochem*, 350, 119-25.
- ALBERTI, K. (1999) Definition, Diagnosis and Classification of Diabetes *Mellitus* and its Complications. Part 1: Diagnosis and Classification of Diabetes *Mellitus*. *Report of a WHO Consultation*. World Health Organization.
- ANBAZHAGAN, K., SAMPATHKUMAR, K., RAMAKRISHNAN, M., GOMATHI, P., GOMATHI, S. & SELVAM, G. S. (2009) Analysis of polymorphism in renin angiotensin system and other related genes in South Indian chronic kidney disease patients. *Clin Chim Acta*, 406, 108-12.
- BAROUDI, T., BOUHAHA, R., MORAN-MOGUEL, C., SANCHEZ-CORONA, J., BEN MAIZ, H., KAMMOUN ABID, H. & BENAMMAR-ELGAAIED, A. (2009) Association of the insertion/deletion polymorphism of the angiotensin-converting enzyme gene with type 2 diabetes in two ethnic groups of Jerba Island in Tunisia. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst*, 10, 35-40.
- BAUDIN, B. (2000) Angiotensin I-converting enzyme gene polymorphism and drug response. *Clin Chem Lab Med*, 38, 853-6.
- BENICKY, J., SANCHEZ-LEMUS, E., PAVEL, J. & SAAVEDRA, J. M. (2009) Anti-inflammatory effects of angiotensin receptor blockers in the brain and the periphery. *Cell Mol Neurobiol*, 29, 781-92.
- BERG, J. & STRYER, L. (2002) *Biochemistry*, New York, W. H. Freeman.
- BONNET, F., PATEL, S., LAVILLE, M., BALKAU, B., FAVUZZI, A., MONTI, L. D., LALIC, N. & WALKER, M. (2008) Influence of the ACE gene insertion/deletion polymorphism on insulin sensitivity and impaired glucose tolerance in healthy subjects. *Diabetes Care*, 31, 789-94.
- BOZKURT, O., DE BOER, A., GROBBEE, D. E., KROON, A. A., SCHIFFERS, P., DE LEEUW, P. & KLUNGEL, O. H. (2009) Renin-angiotensin system polymorphisms and the association between use of angiotensin II receptor blockers or angiotensin-converting enzyme inhibitors and the risk of diabetes. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst*, 10, 101-8.
- BRODY, J. & KERN, S. (2004) History and principles of conductive media for standard DNA electrophoresis. *Analytical Biochemistry*, 333, 1-13.
- BRUNTON, L. (2008) *Goodman & Gilman's manual of pharmacology and therapeutics*, Nova Iorque, McGraw-Hill Medical.
- BURTIS, C. & ASHWOOD, E. (2006) *Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics*, Filadélfia, Elsevier Saunders.

- CAMBIEN, F., POIRIER, O., LECERF, L., EVANS, A., CAMBOU, J. P., ARVEILER, D., LUC, G., BARD, J. M., BARA, L., RICARD, S. & ET AL. (1992) Deletion polymorphism in the gene for angiotensin-converting enzyme is a potent risk factor for myocardial infarction. *Nature*, 359, 641-4.
- CAMPBELL, R. K. (2009) Fate of the beta-cell in the pathophysiology of type 2 diabetes. *J Am Pharm Assoc (2003)*, 49 Suppl 1, S10-5.
- CARDOSO, R. L., NOGUEIRA, A. R., SALIS, L. H., URMENYI, T. P., SILVA, R., MOURA-NETO, R. S., PEREIRA, B. B., RONDINELLI, E. & SOUZA E SILVA, N. A. (2008) The association of ACE gene D/I polymorphism with cardiovascular risk factors in a population from Rio de Janeiro. *Braz J Med Biol Res*, 41, 512-8.
- CELIKER, G., CAN, U., VERDI, H., YAZICI, A. C., OZBEK, N. & ATAC, F. B. (2009) Prevalence of thrombophilic mutations and ACE I/D polymorphism in Turkish ischemic stroke patients. *Clin Appl Thromb Hemost*, 15, 415-20.
- CHAO, J. & CHAO, L. (2005) Kallikrein-kinin in stroke, cardiovascular and renal disease. *Exp Physiol*, 90, 291-8.
- CHEN, H., RANGASAMY, M., TAN, S. Y., WANG, H. & SIEGFRIED, B. D. (2010) Evaluation of five methods for total DNA extraction from western corn rootworm beetles. *PLoS One*, 5, e11963.
- CRESCENTI, A., GASSO, P., MAS, S., ABELLANA, R., DEULOFEU, R., PARELLADA, E., BERNARDO, M. & LAFUENTE, A. (2009) Insertion/deletion polymorphism of the angiotensin-converting enzyme gene is associated with schizophrenia in a Spanish population. *Psychiatry Res*, 165, 175-80.
- CRISAN, D. & CARR, J. (2000) Angiotensin I-converting enzyme: genotype and disease associations. *J Mol Diagn*, 2, 105-15.
- DEAN, L. & MCENTYRE, J. (2004) *The Genetic Landscape of Diabetes*, National Center for Biotechnology Information.
- DONATH, M. Y. & SHOELSON, S. E. (2011) Type 2 diabetes as an inflammatory disease. *Nat Rev Immunol*, 11, 98-107.
- EISENMANN, J. C., SARZYNSKI, M. A., GLENN, K., ROTHSCHILD, M. & HEELAN, K. A. (2009) ACE I/D genotype, adiposity, and blood pressure in children. *Cardiovasc Diabetol*, 8, 14.
- ERYUKSEL, E., CEYHAN, B. B., BIRCAN, R., AVSAR, M. & CIRAKOGLU, B. (2009) Angiotensin converting enzyme gene polymorphism in Turkish asthmatic patients. *J Asthma*, 46, 335-8.
- ESTHER, C. R., MARINO, E. M., HOWARD, T. E., MACHAUD, A., CORVOL, P., CAPECCHI, M. R. & BERNSTEIN, K. E. (1997) The critical role of tissue angiotensin-converting enzyme as revealed by gene targeting in mice. *J Clin Invest*, 99, 2375-85.
- FENG, Y., NIU, T., XU, X., CHEN, C., LI, Q., QIAN, R. & WANG, G. (2002) Insertion/deletion polymorphism of the ACE gene is associated with type 2 diabetes. *Diabetes*, 51, 1986-8.
- FIATAL, S., SZIGETHY, E., SZELES, G., TOTH, R. & ADANY, R. (2011) Insertion/deletion polymorphism of angiotensin-1 converting enzyme is associated with metabolic syndrome in Hungarian adults. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst*.
- GANESAN, M., BHASKAR, S., MANI, R., IDRIS, M. M., KHAJA, N., GULLA, S., KUMAR, U., MOOVA, S., VATTAM, K. K., EPPA, K., HASAN, Q. & PULAKURTHY, U. R. (2011) The relationship of ACE and CETP gene

- polymorphisms with cardiovascular disease in a cohort of Asian Indian patients with and those without type 2 diabetes. *J Diabetes Complications*.
- GARD, P. R. (2010) Implications of the angiotensin converting enzyme gene insertion/deletion polymorphism in health and disease: a snapshot review. *Int J Mol Epidemiol Genet*, 1, 145-57.
- GARG, V. (2011) Noninsulin pharmacological management of type 1 diabetes *mellitus*. *Indian J Endocrinol Metab*, 15, S5-S11.
- JAIN, S. & SARAF, S. (2010) Type 2 diabetes *mellitus*—It's global prevalence and therapeutic strategies. *Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews*, 4, 48-56.
- JENG, J. R., SHIEH, S. M., HARN, H. J., LEE, M. M., SHEU, W. H. & JENG, C. Y. (1997) Angiotensin I converting enzyme gene polymorphism and insulin resistance in patients with hypertension. *J Hypertens*, 15, 963-8.
- JIANG, X., SHENG, H., LI, J., XUN, P., CHENG, Y., HUANG, J., XIAO, H. & ZHAN, Y. (2009) Association between renin-angiotensin system gene polymorphism and essential hypertension: a community-based study. *J Hum Hypertens*, 23, 176-81.
- KAWAMORI, R. (2002) Diabetes trends in Japan. *Diabetes Metab Res Rev*, 18 Suppl 3, S9-13.
- KIM, K. (2009) Association of angiotensin-converting enzyme insertion/deletion polymorphism with obesity, cardiovascular risk factors and exercise-mediated changes in Korean women. *Eur J Appl Physiol*, 105, 879-87.
- KITSIOS, G. & ZINTZARAS, E. (2009) ACE (I/D) polymorphism and response to treatment in coronary artery disease: a comprehensive database and meta-analysis involving study quality evaluation. *BMC Med Genet*, 10, 50.
- KLEIN, T. E. (2001) Integrating Genotype and Phenotype Information: An Overview of the PharmGKB Project. *The Pharmacogenomics Journal*, 4.
- KUCUKALI, C. I., AYDIN, M., OZKOK, E., BILGE, E., ZENGİN, A., ÇAKIR, U. & KARA, I. (2010) Angiotensin-converting enzyme polymorphism in schizophrenia, bipolar disorders, and their first-degree relatives. *Psychiatr Genet*, 20, 14-9.
- LEE, Y. J. & TSAI, J. C. (2002) ACE gene insertion/deletion polymorphism associated with 1998 World Health Organization definition of metabolic syndrome in Chinese type 2 diabetic patients. *Diabetes Care*, 25, 1002-8.
- LEHMANN, D. J., CORTINA-BORJA, M., WARDEN, D. R., SMITH, A. D., SLEEGERS, K., PRINCE, J. A., VAN DUIJN, C. M. & KEHOE, P. G. (2005) Large meta-analysis establishes the ACE insertion-deletion polymorphism as a marker of Alzheimer's disease. *Am J Epidemiol*, 162, 305-17.
- MOLEDA, P., MAJKOWSKA, L., SAFRANOW, K., ADLER, G., GORACY, I. & PILARSKA, K. (2005) I/D polymorphism of angiotensin I converting enzyme gene and insulin resistance and some parameters of metabolic syndrome in patients with type 2 diabetes. *Pol Arch Med Wewn*, 114, 1172-9.
- MORAES, C. F., SOUZA, E. R., SOUZA, V. C., MEDEIROS, E. F., GONCALVES, T. F., TOLEDO, J. O., KARNIKOWSKI, M., GOMES, L., KARNIKOWSKI, M. G., CORDOVA, C. & NOBREGA, O. T. (2008) A common polymorphism in the renin angiotensin system is associated with differential outcome of antihypertensive pharmacotherapy prescribed to Brazilian older women. *Clin Chim Acta*, 396, 70-5.
- NARESH, V. V., REDDY, A. L., SIVARAMAKRISHNA, G., SARMA, P. V., VARDHAN, R. V. & KUMAR, V. S. (2010) Angiotensin converting enzyme

- gene polymorphism in type 2 diabetics with nephropathy. *Indian J Nephrol*, 20, 119.
- NIU, T., CHEN, X. & XU, X. (2002) Angiotensin converting enzyme gene insertion/deletion polymorphism and cardiovascular disease: therapeutic implications. *Drugs*, 62, 977-93.
- NORDESTGAARD, B. G., KONTULA, K., BENN, M., DAHLOF, B., DE FAIRE, U., EDELMAN, J. M., ELIASSON, E., FYHRQUIST, F., HILLE, D. A., IBSEN, H., LYLE, P. A., BERG, K., SANDBERG, M., SETHI, A. A., WONG, P. H. & OS, I. (2009) Effect of ACE insertion/deletion and 12 other polymorphisms on clinical outcomes and response to treatment in the LIFE study. *Pharmacogenet Genomics*, 20, 77-85.
- QU, H. Q., BRADFIELD, J. P., BELISLE, A., GRANT, S. F., HAKONARSON, H. & POLYCHRONAKOS, C. (2009a) The type I diabetes association of the IL2RA locus. *Genes Immun*, 10 Suppl 1, S42-8.
- QU, H. Q., BRADFIELD, J. P., GRANT, S. F., HAKONARSON, H. & POLYCHRONAKOS, C. (2009b) Remapping the type I diabetes association of the CTLA4 locus. *Genes Immun*, 10 Suppl 1, S27-32.
- RAMACHANDRAN, V., ISMAIL, P., STANSLAS, J., SHAMSUDIN, N., MOIN, S. & MOHD JAS, R. (2008) Association of insertion/deletion polymorphism of angiotensin-converting enzyme gene with essential hypertension and type 2 diabetes *mellitus* in Malaysian subjects. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst*, 9, 208-14.
- RIEDER, M. J., TAYLOR, S. L., CLARK, A. G. & NICKERSON, D. A. (1999) Sequence variation in the human angiotensin converting enzyme. *Nat Genet*, 22, 59-62.
- RIGAT, B., HUBERT, C., ALHENC-GELAS, F., CAMBIEN, F., CORVOL, P. & SOUBRIER, F. (1990) An insertion/deletion polymorphism in the angiotensin I-converting enzyme gene accounting for half the variance of serum enzyme levels. *J Clin Invest*, 86, 1343-6.
- RODRIGUEZ, S., GAUNT, T. R. & DAY, I. N. (2009) Hardy-Weinberg equilibrium testing of biological ascertainment for Mendelian randomization studies. *Am J Epidemiol*, 169, 505-14.
- RYAN, A. S., NICKLAS, B. J., BERMAN, D. M. & FERRELL, R. E. (2001) The insertion/deletion polymorphism of the ACE gene is related to insulin sensitivity in overweight women. *Diabetes Care*, 24, 1646-52.
- SAMBROOK, J. & RUSSEL, D. (2001) *Molecular cloning: A laboratory manual.*, New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- SAYED-TABATABAEI, F. A., OOSTRA, B. A., ISAACS, A., VAN DUIJN, C. M. & WITTEMAN, J. C. (2006) ACE polymorphisms. *Circ Res*, 98, 1123-33.
- SCHURKS, M., ZEE, R. Y., BURING, J. E. & KURTH, T. (2009) ACE D/I polymorphism, migraine, and cardiovascular disease in women. *Neurology*, 72, 650-6.
- SHANMUGAM, V., SELL, K. W. & SAHA, B. K. (1993) Mistyping ACE heterozygotes. *PCR Methods Appl*, 3, 120-1.
- SPD (2010) Diabetes: Factos e Números 2010. *Relatório Anual do Observatório Nacional da Diabetes (Portugal) - Sociedade Portuguesa de Diabetologia.*
- STANDL, E. (2007) The importance of beta-cell management in type 2 diabetes. *Int J Clin Pract Suppl*, 10-9.
- TASCILAR, N., DURSUN, A., ANKARALI, H., MUNGAN, G., EKEM, S. & BARIS, S. (2009) Angiotensin-converting enzyme insertion/deletion polymorphism has

- no effect on the risk of atherosclerotic stroke or hypertension. *J Neurol Sci*, 285, 137-41.
- TODD, J. A. (2010) Etiology of type 1 diabetes. *Immunity*, 32, 457-67.
- TSCHOPE, C., SCHULTHEISS, H. P. & WALTHER, T. (2002) Multiple interactions between the renin-angiotensin and the kallikrein-kinin systems: role of ACE inhibition and AT1 receptor blockade. *J Cardiovasc Pharmacol*, 39, 478-87.
- VAN VALKENGOED, I. G., STRONKS, K., HAHNTOW, I. N., HOEKSTRA, J. B. & HOLLEMAN, F. (2008) The angiotensin converting enzyme insertion/deletion polymorphism and differences in fasting plasma glucose in Hindustani Surinamese, African Surinamese and ethnic Dutch: the population-based SUNSET-study. *Diabetes Res Clin Pract*, 81, e12-4.
- WHO (2006) Definition and diagnosis of diabetes *mellitus* and intermediate hyperglycemia: report of a WHO/IDF consultation. World Health Organization.
- ZEE, R. Y., LOU, Y. K., GRIFFITHS, L. R. & MORRIS, B. J. (1992) Association of a polymorphism of the angiotensin I-converting enzyme gene with essential hypertension. *Biochem Biophys Res Commun*, 184, 9-15.
- ZHOU, J. B., YANG, J. K., LU, J. K. & AN, Y. H. (2009) Angiotensin-converting enzyme gene polymorphism is associated with type 2 diabetes: a meta-analysis. *Mol Biol Rep*, 37, 67-73.

