



UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIODIVERSIDADE
E BIOTECNOLOGIA DA REDE BIONORTE

**ANÁLISE DO GENE DO SUBSTRATO DO RECEPTOR DA INSULINA
1 (*IRS1*) EM PESSOAS COM DIABETES *MELLITUS* TIPO 2:
IDENTIFICAÇÃO DE VARIANTES DE RISCO.**

LUCIVANA PRATA DE SOUZA MOURÃO

Manaus - AM

2020

LUCIVANA PRATA DE SOUZA MOURÃO

**ANÁLISE DO GENE DO SUBSTRATO DO RECEPTOR DA INSULINA
1 (*IRS1*) EM PESSOAS COM DIABETES *MELLITUS* TIPO 2:
IDENTIFICAÇÃO DE VARIANTES DE RISCO.**

Tese de doutorado apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Rede BIONORTE, na Universidade do Estado do Amazonas, como requisito parcial para a obtenção do Título de Doutor em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Adolfo José da Mota

Coorientador: Prof. Dr. Spartaco Astolfi Filho

Manaus - AM

Março - 2020

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).
Sistema Integrado de Bibliotecas da Universidade do Estado do Amazonas.

929a Mourão, Lucivana Prata de Souza
Análise do gene do substrato do receptor da insulina 1 (IRS1) em pessoas com Diabetes Mellitus tipo 2 : identificação de variantes de risco. / Lucivana Prata de Souza Mourão. Manaus : [s.n], 2020.
121 f.: color.; 30 cm.

Tese - PGSS - Biodiversidade e Biotecnologia (Doutorado) - Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, 2020.
Inclui bibliografia
Orientador: Adolfo José da Mota
Coorientador: Spartaco Astolfi Filho

1. resistência à insulina. 2. gene IRS1. 3. substrato IRS-1. 4. rs1801278. 5. fosforilação em serina. I. Adolfo José da Mota (Orient.). II. Spartaco Astolfi Filho (Coorient.). III. Universidade do Estado do Amazonas. IV. Análise do gene do substrato do receptor da insulina 1 (IRS1) em pessoas com Diabetes Mellitus tipo 2

Elaborado por Jeane Macelino Galves - CRB-11/463

LUCIVANA PRATA DE SOUZA MOURÃO

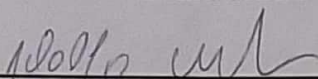
"ANÁLISE DO GENE DO SUBSTRATO DO RECEPTOR DA INSULINA 1 (IRS1) EM PESSOAS COM DIABETES MELLITUS TIPO 2: IDENTIFICAÇÃO DE VARIANTES DE RISCO".

Tese de doutorado apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Rede de Biodiversidade e Biotecnologia da Amazônia Legal, na Universidade do Estado do Amazonas, como requisito para obtenção do título de Doutora em Biotecnologia.

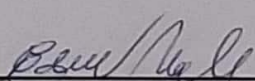
Orientador (a): **Prof. Dr. Adolfo José da Mota**

Coorientador (a): **Prof. Dr. Spartaco Astolfi Filho**

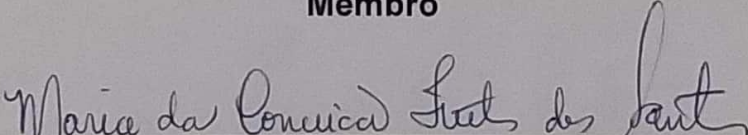
Banca Examinadora:



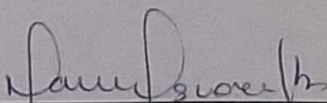
Prof. Dr. Adolfo José da Mota (UFAM)
Presidente da banca



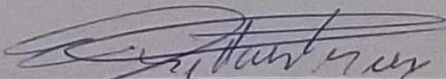
Prof. Dr. Edmar Vaz de Andrade (UFAM)
Membro



Profa. Dra. Maria da Conceição Freitas dos Santos (UEA)
Membro



Profa. Dra. Marne Carvalho de Vasconcelos (UFAM)
Membro



Prof. Dr. José Odair Pereira (UFAM)
Membro

MANAUS-AMAZONAS

Março/2020

“A menos que modifiquemos a nossa maneira de pensar, não seremos capazes de resolver os problemas causados pela forma como nos acostumamos a ver o mundo”.

(Albert Einstein)

DEDICATÓRIA

Luís Ivan (*in memoriam*) e Lúcia, meus pais, fonte de tudo o que sou!

André Gustavo, Paulo Vítor e Larissa, minha família, fonte de toda a minha motivação e alegria.

Prof. Dr. José das Neves Falcão, minha fonte de inspiração profissional.

No princípio, era uma caloura de Biologia da UFAM fazendo uma pesquisa na biblioteca do INPA, fascinada com o novo horizonte. Ao ler os artigos - que em 1994 não eram *on line* - achou um artigo sobre Diabetes Tipo 2. Seu pai tinha a doença. Desejou muito fazer uma pesquisa com a doença. Sonhou... Ela concluiu o curso. Fez mestrado em Genética com aquele que produziu a insulina humana via engenharia genética. Seria um sinal do destino para ela não parar de sonhar? Formou uma linda família. Precisou trabalhar. Distanciou-se da pesquisa. Foi aprovada em um concurso público. Seu pai faleceu devido a complicações clínicas da diabetes. Diante da dor, desejou novamente contribuir para mudar essa realidade.

Nunca deixou de sonhar!

Encontrou um pesquisador maravilhoso que trabalhava com diabetes. Seu coração acelerou. Ele aceitou ser seu orientador. Foi aprovada na seleção do doutorado.

Seu sonho se tornou realidade.

Março de 2020, muito tempo depois, a agora bióloga tem uma tese sobre diabetes. Seu coração encheu de gratidão!

Lembrou da menina sonhadora de 1994. Agora essa menina é protagonista de um momento importante na carreira acadêmica. A menina de 1994 está sorrindo!

Seu sonho se tornou realidade!

Que essa bióloga seja uma inspiração: acredite e nunca desista dos seus sonhos!

Por Lucivana Prata de Souza Mourão

AGRADECIMENTOS

À Deus por me permitir concluir o doutorado, etapa acadêmica tão sonhada por vários anos. Por se concretizar, através dos seus anjos terrestres, nos momentos de adversidades e fraqueza.

Ao meu estimado orientador Prof. Dr. Adolfo José da Mota, da Universidade Federal do Amazonas, meu grande irmão científico que me permitiu vivenciar o doutorado de forma prazerosa. Obrigada por me acolher, compreender meus limites e pela disposição em auxiliar e orientar. Foram quatro anos de grande aprendizagem e conhecimento. De alguma maneira, nossos caminhos se cruzaram e permitiram nossos laços na vida acadêmica. Serás inesquecível para mim, não só pela tese, mas pelo exemplo de ética, companheirismo, sabedoria e sensatez. Muito obrigada!

Ao meu estimado professor Dr. Spartaco Astolfi Filho, da Universidade Federal do Amazonas que me apresentou o mundo da Biologia Molecular. Obrigada por acreditar sempre em mim! Serás sempre um exemplo profissional e de humildade. Uma honra te conhecer e poder compartilhar grandes momentos científicos.

Ao Programa Rede de Biodiversidade e Biotecnologia da Amazônia Legal - BIONORTE pela oportunidade de cursar um doutorado e a todos os professores do programa que com dedicação e zelo permitiram-me refletir e ampliar minha visão dentro do mundo da Biotecnologia.

Ao Prof. Dr. Jair Max Furtunato Maia, coordenador BIONORTE do colegiado estadual do Amazonas, e à secretária do Programa BIONORTE - AM Tânia Lúcia Viana de Souza. Ao professor Jair minha gratidão pela admirável coordenação, humanidade, humildade, ética, compreensão e eficiência na condução de adversidades inerentes ao cargo que ocupa. O senhor é um ser humano incrível. À Tânia minha gratidão pela eficiência na condução de demandas da secretaria do programa.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM) pelo auxílio financeiro que permitiu a execução dessa pesquisa. A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) por consolidar investimentos na formação de recursos humanos em nosso país.

À Universidade do Estado do Amazonas pelo incentivo a qualificação de docentes que permitiu o meu afastamento de minhas atividades docentes para dedicação aos experimentos desenvolvidos no doutorado.

Aos Professores Darlisom Sousa Ferreira, Evandro da Silva Bronzi, Myrian Salles Vieira e Diego Ferreira Regalado da Escola Superior de Ciências da Saúde, da Universidade do Estado do Amazonas, pelo auxílio e compreensão no processo de liberação de minhas atividades acadêmicas para que pudesse me dedicar a pesquisa da tese. Eu sei que não foi fácil! Obrigada pelo profissionalismo e apoio.

À Universidade Federal do Amazonas (UFAM) nas suas estruturas organizacionais e pessoal que oportunizaram aprendizagem e experiências fundamentais para a realização dessa etapa acadêmica em minha vida.

À Dra. Isabel da Mota Pontes, da Universidade Federal do Amazonas, por permitir parte da pesquisa no Laboratório de Diagnóstico Molecular da UFAM, me dando todo o suporte necessário para o desenvolvimento da primeira parte da tese.

Ao professor Dr. Jerônimo Lameira, da Universidade Federal do Pará, que me recebeu em seu laboratório para um treinamento muito proveitoso sobre os conceitos da modelagem molecular.

Ao Dr. Marcos Pessoa pela importante colaboração e apoio científico no processamento da modelagem molecular permitindo-nos a análise e discussão dos resultados.

Ao Professor Dr. José Pereira Moura Neto, da Universidade Federal do Amazonas, pelo auxílio no processamento dos dados estatísticos.

À Plataforma de Bioensaios da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ). Agradeço as pesquisadoras Dra. Ani Beatriz Jackish Matsuura, Dra. Patrícia Orlandi e a responsável técnica M.Sc. Ivanildes dos Santos Bastos que autorizaram o uso do equipamento, essencial para a análise final da tese.

À Maria Eduarda Grisolia pela amizade e disponibilidade em viabilizar o acesso a plataforma de Bioensaios da FIOCRUZ. À Diene Costa Lima, do Laboratório Carlos Borborema, Tropical – FIOCRUZ, por gentilmente me receber na Plataforma de Bioensaios.

À Simone Brüggemann Mota e Leda Carla Mar da Costa pela disponibilidade em auxiliar na coleta de amostras biológicas dos pacientes da amostra dessa pesquisa.

Aos pacientes com Diabetes tipo 2, amostra dessa pesquisa, que aceitaram doar material biológico permitindo a análise e os resultados que compõem essa tese.

Às médicas Kettyuscia Coelho e Oliveira e Larissa Figueiredo que se disponibilizaram na seleção das pessoas com Diabetes tipo 2. Muito obrigada pela estimada parceria!

Ao Francisco Neto pela parceria, apoio técnico, disponibilidade para esclarecer dúvidas e metodologia, além é claro, da amizade. À Danielle Santos pelos conselhos e amizade.

Aos pesquisadores que fizeram parte da banca do exame de qualificação, Dra. Silvia Regina Sampaio Freitas, Dra. Isabelle Cordeiro e Dr. Allyson Guimarães da Costa, e contribuíram muito com suas correções e sugestões para a elaboração dessa tese.

Às minhas queridas amigas do Laboratório, minhas Luluzinhas: Marjory (musa da PCR), Cláudia (rainha dos SNPs), Suelen (musa da extração de DNA de fungos), Alessandra (rainha dos fungos), Sabrina (abelha rainha), Lorena (musa da química). Incluo, nessa turma, meu querido Felipe Guedes (mestre dos vírus). Vocês tornaram meu doutorado mais leve! Obrigada pelas risadas, maluquices, pelo apoio, choro, riso, pela motivação, torcida, terapia e todas as vibrações emanadas. Vocês foram fundamentais para a minha saúde mental! Obrigada!

À Samara, aluna de doutorado e gerente do laboratório. Obrigada por estar sempre disposta a nos tirar do sufoco. Valeu nosso reencontro em um outro momento profissional.

Ao Ricardo Cordeiro Lyra Júnior pela parceria no início desse projeto, com inúmeras PCRs para a melhor amplificação do gene. Uma honra ter sido sua orientadora de Trabalho de Conclusão de Curso.

A Obed Garcia Barros e Tânia Moura Pinheiro, pela fraterna e maravilhosa amizade e por todo o apoio quando precisei de auxílio na tradução dos textos para o inglês.

À Eliane Campos Alves pela amizade e incentivo a fazer a seleção do doutorado. Agradeço por nossos caminhos terem se cruzados. Nossas conversas nos ajudaram muito!

Ao prof. Dr. José das Neves Falcão, professor aposentado da Universidade Federal do Amazonas, minha inspiração desde 1994. Obrigada por acreditar naquela menina, caloura de Biologia, cheia de sonhos. Obrigada pelos conselhos, direcionamentos profissionais e de vida, pelo apoio incondicional em todos os momentos e por vibrar com as minhas vitórias. Segui o seu caminho dentro da genética com muito orgulho e espero poder fazer por alguém o que o senhor fez por mim. A sua grandeza e humildade me fascinam. Tudo o que sou hoje profissionalmente, devo ao senhor, meu querido e estimado pai científico.

Às Amigas Rozana, Themis, Luciana, Josiley, Concy, Laryssa e Márcia Rúbia por se fazerem presentes sempre com motivação, palavras de apoio e esperança. Vocês foram fundamentais nessa caminhada.

À minhas amigas “miguchas forever” Doriane, Roseane, Cristiany, Karina que estão comigo desde 1994 (e contando). Elas aguentam meus surtos, desesperos, me carregam no colo, não me deixam desistir, me puxam para a realidade, me fazem rir, me motivam, melhoram minha autoestima e estão comigo em todos os momentos. Amo nossa amizade!

Ao meu pai Luís Ivan (*in memoriam*) e minha Mãe Lúcia por sempre acreditarem em mim e me permitirem uma educação de qualidade, mesmo diante de tantos sacrifícios financeiros. Pelos exemplos de humildade e perseverança. Por me ensinarem a fé e o verdadeiro sentido da vida e, ainda, que diante das adversidades, Deus caminha conosco e Maria nos carrega no colo. Sem a Fé eu nada seria! Olha pai... tua filha... doutora com doutorado! Aplauda de onde estiveres! Sinto falta de ter ver na minha plateia.

Aos meus irmãos, cunhada e sobrinhos. Sei que minha ausência nesse tempo foi compreendida. Agradeço a paciência. Sei que torcem por mim!

Ao meu esposo André Gustavo meu companheiro de vida e de luta. Só nós dois sabemos o verdadeiro valor desse momento. Nada nunca foi fácil em nossa vida. Seguimos escolhendo nos apoiar e se alegrando com a realização do sonho do outro. Foram muitos momentos de sacrifícios, cessão e mudança de planos. Esse doutorado é seu também, pois sem o seu apoio desde o meu mestrado jamais conseguiria chegar a esse momento. Sou muito feliz por tê-lo ao meu lado. Você torna a minha vida mais leve!

Aos meus filhos Paulo Víctor e Larissa. Obrigada pelo que são. Tenho muito orgulho das pessoas que se tornaram. Vocês me ensinaram a ser uma pessoa melhor. Foram quatro anos de pouca atenção... eu sei. Obrigada por compreenderem. Fiz doutorado muito tarde para a média de meus colegas e isso para mim, pouco importa, pois tenho a dádiva de dividir esse momento com vocês. Que alegria os ter em minha plateia. Que alegria os ter em minha vida!

A todos que participaram direta ou indiretamente desse momento, rezando, vibrando e torcendo para que tudo isso se tornasse realidade!

Gratidão.

RESUMO

Diabetes *Mellitus* Tipo 2 (DM2) é uma doença crônica multifatorial caracterizada pela hiperglicemia e de grande importância para a saúde pública, devido sua alta incidência. Dentre os mecanismos desencadeantes, a resistência periférica à insulina (RI) é de grande relevância e caracteriza-se por uma resposta insuficiente de células alvo de tecidos periféricos aos níveis normais de insulina circulante, relacionada a defeitos na sinalização celular da insulina. Os mecanismos determinantes da RI ainda são pouco compreendidos e estudos baseiam-se na estrutura molecular e funcionamento dos componentes da via de sinalização da insulina. O presente estudo teve como objetivo analisar o gene *IRS1*, cujo produto, o substrato IRS-1, é importante para a transdução do sinal insulínico em tecidos periféricos. Buscou-se identificar e estudar variantes de risco no gene *IRS1* para o desencadeamento da DM2. Participaram da pesquisa pessoas clinicamente diagnosticadas com DM2. Para a caracterização da amostra aplicou-se um questionário obtendo-se dados sobre os aspectos socioambientais e prevalência de comorbidades, complicações clínicas, condições e comportamentos de risco associadas a DM2. A análise molecular processou-se a partir da amplificação e sequenciamento da região codificante do gene *IRS1* dos indivíduos da amostra. Para a identificação de sequências variantes comparou-se as sequências obtidas com o banco genômico humano. Variante de nucleotídeo único (SNV) identificado foi confirmado com a técnica de PCR-RFLP e avaliado quanto a herança familiar. Para a análise do valor aditivo da variante, verificaram-se alterações em genes associados a via de sinalização de insulina com uso do sequenciamento do exoma e programas de predição de variantes. Testes de modelagem molecular e fosforilação foram aplicados para se conferir o impacto do variante na fosforilação do substrato IRS-1. A amostra teve maior prevalência do sexo feminino, média de idade de $61,11 \pm 14,573$, com faixa etária predominante de 65 a 74 anos de idade. Observou-se elevada frequência de hipertensão arterial, complicações oftalmológicas, sobrepeso, obesidade e agregação familiar. Quanto as variáveis comportamentais observou-se o uso do tabaco e consumo de bebidas alcóolicas em algum momento da vida e baixa prática de atividade física regular. Houve associação estatística significativa entre as variáveis: tempo de diagnóstico e complicações clínicas, comorbidades e complicações clínicas, dislipidemia e mais de uma complicação clínica, IMC e complicações oftalmológicas e IMC e mais de uma complicação clínica. O rastreio de mutações no gene *IRS1* identificou o SNV *rs1801278* (c.2911G>A; p.Gly971Arg), confirmado com a técnica de PCR-RFLP, em um indivíduo da amostra, cuja análise familiar revelou esse variante em quatro gerações, em indivíduos sintomáticos e assintomáticos. A análise do exoma desse indivíduo mostrou seis variantes não sinônimas em genes associados a via de sinalização da insulina, no entanto, programas de predição de variantes mostraram que somente *rs1801278* é prejudicial. Análise do substrato IRS-1 mutante (Arg⁹⁷¹) revelou na modelagem molecular baixa interação com PI3K e no ensaio *in silico e in vitro* aumento da fosforilação em serina. Os resultados apresentados nessa pesquisa confirmam a associação de risco do variante *rs1801278* a resistência à insulina e DM2. A pesquisa mostra ainda a relevância desse variante em estudos direcionados a medicina personalizada e aconselhamento genético para DM2.

Palavras-chaves: resistência à insulina; gene *IRS1*; substrato IRS-1; *rs1801278*; fosforilação em serina.

ABSTRACT

Type 2 Diabetes *Mellitus* (DM2) is a multifactorial chronic disease characterized by hyperglycemia and due to its high incidence is of great importance for public health. Among the triggering mechanisms, the peripheral insulin resistance (RI) is highly relevant and it is characterized by an insufficient response of peripheral tissues target cells at normal circulating insulin levels, which is related to defects in cellular insulin signaling. The RI determining mechanisms are not fully understood yet, so the studies are based on the molecular structure and the functioning of insulin signaling pathway components. Therefore, the present study aimed to analyze the *IRS1* gene, whose product, the IRS-1 substrate, is important for insulin signal transduction in peripheral tissues. The study sought to identify and evaluate risk variants for the triggering of DM2 present in the *IRS1* gene. It included patients clinically diagnosed with DM2 and a questionnaire was applied to characterize each sample, obtaining data on socio-environmental aspects and the prevalence of comorbidities, clinical complications, conditions and risk behaviors associated with DM2. The molecular analysis was performed from the amplification and sequencing of the *IRS1* gene coding region of the individuals of the sample. For the variant sequences identification, the sequences obtained from the human genomic bank were compared. The identified single nucleotide variant (SNV) was confirmed with the PCR-RFLP technique and evaluated according to family inheritance. For the analysis of the variant additive value, changes in genes associated with the insulin signaling pathway were verified using exome sequencing and variant prediction programs. Molecular modeling tests and phosphorylation were applied to check the impact of the variant on the IRS-1 substrate phosphorylation. The sample had a higher prevalence of females, with a mean age of 61.11 ± 14.573 and a predominant age ranging from 65 to 74 years old. High frequency of arterial hypertension, ophthalmic complications, overweight, obesity and family aggregation were observed. Regarding the behavioral variables, tobacco and alcoholic beverages consumption at some point in life and low practice of regular physical activity were noted. There was a significant statistical association between the variables: diagnosis time and clinical complications, comorbidities and clinical complications, dyslipidemia and more than one clinical complication, body mass index (BMI) and ophthalmic complications and BMI and more than one clinical complication. The screening for mutations in the *IRS1* gene, which was confirmed with the PCR-RFLP technique, identified the SNV rs1801278 (c.2911G>A; p.Gly971Arg) in an individual of the sample whose family analysis revealed this variant in four generations, in symptomatic and asymptomatic individuals. The exome analysis of this individual revealed six non-synonymous variants in genes associated with the insulin signaling pathway, however variants prediction programs showed that only rs1801278 is harmful. The analysis of the mutant IRS-1 substrate (Arg971) revealed low interaction with PI3K in the molecular modeling and increased phosphorylation in serine in the *in silico and in vitro* assay. The results presented in this research confirm the risk association of the rs1801278 variant with insulin resistance and DM2. This research also shows the relevance of this variant in studies targeted to personalized medicine and to genetic counseling for DM2. **Keywords:** insulin resistance; *IRS1* gene; IRS-1 substrate; rs1801278; serine phosphorylation.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Etiologia da Diabetes *Mellitus* Tipo 2: interação entre os fatores genéticos, ambientais e epigenéticos. -----26
- Figura 2 - Estrutura molecular da insulina humana.-----31
- Figura 3 - Etapas do processamento proteolítico na síntese da insulina. A pré-pró-insulina sofre clivagem liberando a pró-insulina que sofre nova clivagem para liberar a insulina funcional. -----31
- Figura 4 - Vias de sinalização da insulina. A ligação da insulina ao seu receptor (A) promove a transdução do sinal ao fosforilar proteínas intracelulares conhecidas como substratos do receptor da insulina (IRS) (B). Após a fosforilação, essas proteínas ligam-se a outras moléculas sinalizadoras como a PI 3-quinase (C) no domínio SH2, cujos produtos ativam a PKB/Akt (D) promovendo a liberação da proteína GLUT-4 (E) para a membrana celular (F) regulando o transporte de glicose para dentro da célula. -----32
- Figura 5 – Esquema da estrutura do receptor da insulina (A) e a ativação do receptor tirosina-quinase (B). O receptor da insulina possui duas subunidades α , localizadas fora da membrana celular (I), e duas subunidades β transmembrana (II) com domínio intracelular tirosina quinase (III). A ligação à molécula sinalizadora extracelular (insulina) vai induzir a aproximação de duas subunidades do receptor (IV), formando um dímero (V), promovendo a autofosforilação de resíduos de tirosina (VI) e conseqüentemente sua ativação.-----33
- Figura 6 - Estrutura esquemática das proteínas IRS. Observa-se os domínios PH, PTB e sítios de reconhecimento para moléculas com domínio SH2: Fosfatidilinositol-3'-OH quinase (PI3K), proteína adaptadora Grb2, Proteína Tirosina fosfatase SHP2.-----35
- Figura 7 - Substratos IRS do receptor da insulina. Os domínios PH e PTB possuem homologia entre os substratos enquanto a região em que se localizam os sítios de reconhecimento para moléculas com domínio SH2 são diferentes entre os substratos IRS-1/IRS-2, IRS-3 e IRS-4. Observa-se múltiplos sítios de fosforilação em resíduos de tirosina localizados na cauda terminal (vermelho) e os pesos moleculares de cada substrato. -----35
- Figura 8 - Translocação da proteína GLUT – 4 para a membrana celular a partir da transdução de sinal insulínico em células de tecidos sensíveis a insulina. Esse processo permite a entrada de glicose na célula. -----36
- Figura 9: Estrutura do substrato IRS-1 mostrando múltiplos sítios de fosforilação em resíduos de tirosina, serina e treonina.-----38
- Figura 10 - Esquema da estrutura molecular do substrato 1 do receptor da insulina. Observa-se os domínios PH (magenta), PTB (verde) e vários sítios de fosforilação em resíduos de tirosina (Y) e serina (S). São indicados os resíduos de tirosina fosforilados pelo receptor da insulina, cujo processo provoca a ligação e ativação de PI3K, Grb2 e SHP2. Também são indicados os resíduos de serina e as proteínas quinases responsáveis pelas respectivas fosforilações. Círculo em azul representam fosforilação positiva, vermelho regulação negativa e combinados em azul e vermelho representam locais que podem ter tanto regulação positiva ou negativa. Círculos brancos a fosforilação ainda não é conhecida. -----38
- Figura 11 - Localização do gene IRS1 no cromossomo 2 (barra vermelha) -----40
- Figura 12: Localização dos SNVs identificados no gene IRS1 associados a resistência à insulina e Diabetes *Mellitus* tipo 2. -----41
- Figura 13- Método sequenciamento dideoxi automatizado. Método que consiste na adição de dideoxinucleotídeos, que interrompem a síntese de uma sequência de DNA. O analisador genético identifica os dideoxinucleotídeos no

final da cadeia interrompida e gera um eletroferograma registrando a sequência de bases da amostra em análise. -----	43
Figura 14 - Esquema da técnica de PCR. (A) Cada ciclo de amplificação tem três etapas: (etapa 1) desnaturação do DNA genômico analisado, (etapa 2) anelamento do oligonucleotídeos sintetizados a região de interesse do genoma, e (etapa 3) síntese enzimática da região de interesse do DNA. (B) A repetição dos ciclos aumenta de forma exponencial o número de cópias da região de interesse.-----	45
Figura 15 - Esquema da técnica de PCR-RFLP na identificação de variante de base única em um <i>amplicon</i> . (A) Por meio da PCR, obteve-se o <i>amplicon</i> de Bob e Joe. (B) Os <i>amplicons</i> foram tratados com enzimas de restrição. (B) A endonuclease de restrição clivou o <i>amplicon</i> de Bob, mas não clivou o <i>amplicon</i> de Joe devido a presença de uma mutação de ponto que alterou o sítio de restrição da endonuclease. (C) O padrão de restrição de Bob revelou a presença de três bandas (sem mutação) e o de Joe, duas bandas (com mutação).-----	46
Figura 16 - Etapas da abordagem investigativa para o diagnóstico e tratamento de doenças genéticas. -----	47
Figura 17 – Fluxograma com as principais etapas da pesquisa. -----	49
Figura 18 - Etapas de extração de DNA Mini Spin (Kasvi) - Tecnologia de membrana de sílica em coluna Spin. -----	51
Figura 19 - Localização de anelamento dos oligonucleotídeos desenhados para a análise do éxon 1 do gene IRS1. -----	52
Figura 20 –Esquema da Semi-Nested PCR utilizada para o sequenciamento do éxon 1 do gene IRS1. -----	54
Figura 21 – Etapas para purificar produtos de PCR usando o PureLink® PCR Purification Kit, conforme indicação do fabricante.-----	54
Figura 22 – Estratégia para a obtenção da sequência completa do gene IRS1. Será realizado o sequenciamento com oligonucleotídeos externos e internos para a obtenção de reads (1) que serão alinhadas em regiões de sobreposição (2) para a formação de contigs (3). -----	55
Figura 23: Mapa do <i>amplicon</i> após a digestão com identificação dos sítios de restrição para SmaI. N – Mapa de restrição do <i>amplicon</i> sem a mutação, observando-se a obtenção de cinco fragmentos (347bp, 232bp, 153bp, 114bp e 28bp); A – Mapa de restrição do <i>amplicon</i> com a mutação (347bp, 260bp, 153bp, 114bp). Indivíduos heterozigotos apresentam fragmentos referentes ao padrão normal e ao padrão com mutação.-----	57
Figura 24: Princípio do KIT ADP-Glo™ Kinase Assay (Promega Corporation). O ensaio é realizado em duas etapas: 1) após a reação de fosforilação, é adicionado o reagente ADP-Glo™ para interrupção da reação de fosforilação e eliminação do ATP restante; 2) Em seguida, o reagente de detecção de quinase é adicionado para converter ADP em ATP. O ATP recém-sintetizado será medido pela reação luciferase/luciferina. A luz emitida na reação da luciferase é proporcional a quantidade de ADP gerado na reação de fosforilação. -----	60
Figura 25: Distribuição dos participantes da pesquisa por classes de faixa etária. -----	61
Figura 26: Distribuição dos participantes da pesquisa de acordo com a escolaridade. -----	61
Figura 27: Distribuição dos participantes da pesquisa de acordo com o tempo de diagnóstico para DM2.-----	62
Figura 28: Distribuição de comorbidades associadas a DM2. -----	62
Figura 29: Distribuição de complicações clínicas associadas a DM2. -----	63
Figura 30: Frequência de variáveis comportamentais associadas a DM2. -----	64

Figura 31 – Imagem representativa do perfil eletroforético do DNA genômico obtido a partir do método de extração proposto para a presente pesquisa. M – Marcador Lambda 20 ng; 1-11 – amostras da pesquisa. Gel de agarose 1% corado com brometo de etídio.-----65

Figura 32 - Perfil eletroforético dos produtos amplificados com os oligonucleotídeos FW1/RV3 (2557bp) e FW3/RV1 (2569bp), com uso da técnica de Semi Nested-PCR. M = marcador de peso molecular 1 Kb (KASVI); 1 e 2 = *amplicon* FW1/RV3; 3 e 4 = *amplicon* FW3/RV1. Gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. --65

Figura 33 – Eletroferogramas obtidos de parte da sequência codificante do gene *IRS1*. Análise realizada no programa SeqMan - DNASTAR.-----66

Figura 34 - Eletroferograma da sequência codificante do gene *IRS1* da amostra 12 (P12). Observa-se um variante de base única na posição 2911, em heterozigose, que caracteriza o variante *rs1801278* está representado pela letra R, que indica a ocorrência de dois picos na mesma posição, correspondentes às bases A e G (seta).-----66

Figura 35 - Alinhamento local de 21 nt da sequência codificante do gene *IRS1* do indivíduo 12, evidenciando a mutação de sentido trocado G971R (seta). P12 *rs1801278* – sequência com SNV *rs1801278* da amostra 12; NG_015830.1 – acesso NCBI para a sequência de referência do gene *IRS1* de *Homo sapiens*. Os nucleotídeos foram separados em códon para facilitar a visualização da mutação de sentido trocados. Os aminoácidos correspondentes a cada códon estão representados pelo código de três letras. -----67

Figura 36: Heredograma de quatro gerações para a família em estudo. A genealogia de 13 indivíduos é apresentada. O indivíduo P12 é o probando do heredograma identificado com seta e indicado como I-2. Símbolos escuros representam indivíduos clinicamente diagnosticados com DM2 e símbolos não escuros representam indivíduos sem o diagnóstico clínico para DM2. A pesquisa do variante *rs1801278* pela técnica de PCR-RFLP foi realizada com os indivíduos 1, 2 (P12), 5, 7, 8, 12 e 13 do heredograma. Indivíduos com asteriscos foram positivos para o variante *rs180127*.-----68

Figura 37: Perfil de restrição da análise familiar obtido por meio da técnica de PCR-RFLP para *rs1801278*. M – marcador de peso molecular 100 bp (INVITROGEN). Indivíduos identificados com o variante *rs1801278*: 2 (P12), 5, 7, 10 e 14. Gel de agarose 2% corado com brometo de etídio. -----69

Figura 38: (A) Sobreposição dos substratos IRS-1 selvagem e mutante. A seta azul indica a posição da mutação entre os substratos selvagem (glicina) e mutante (arginina) (B) Detalhe da sobreposição com a região 971 que contém a mutação.-----70

Figura 39: Simulação de ancoramento molecular entre IRS-1 selvagem (A) e mutante (B) com o domínio SH2 de PI3K (resíduo de arginina 19), com distância em Å. Os domínios SH2 são formados por uma cadeia lateral de arginina e a interação da Ser⁹⁷⁴ do substrato IRS-1 interage com a Arg¹⁹ de PI3K. Observa-se baixa interação molecular entre IRS-1 mutante e PI3K.-----71

Figura 40: Análise *in silico* comparativa do potencial de fosforilação do substrato IRS-1 selvagem (A) e mutante (B). Observa-se aumento na fosforilação do substrato mutante (A2) em comparação com o substrato selvagem (A1) e maior potencial de fosforilação na serina (8) no substrato IRS-1 mutante (B1 e B2). Fonte: NetPhos 3.1 Server.-----72

Figura 41: Gráfico comparativo mostrando os valores médios do sinal de luminescência entre as amostras com o uso de ADP-Glo™ Kinase Assay. Quanto maior o sinal de luminescência maior a conversão de ATP-ADP e, portanto, maior atividade da kinase.-----74

Figura 42: Modelo de transdução do sinal insulínico via fosforilação do substrato IRS-1 selvagem e mutante: (A) Funcionamento da via de sinalização da insulina considerando o gene *IRS1* sem a sequência variante *rs1801278* (selvagem). A expressão do gene sintetiza o substrato IRS-1 cuja fosforilação transcorre normal. Ao ser fosforilado pelo receptor da insulina, o substrato IRS-1 desencadeia a transdução do sinal insulínico a jusante, ativando a

translocação do transportador de glicose 4 (GLUT-4) para a membrana plasmática, garantindo a entrada de glicose para a célula e, portanto, o controle da glicemia. (B) Funcionamento da via de sinalização da insulina considerando o gene IRS1 com a sequência variante rs1801278 (mutante). Nesse caso, a expressão do gene produz o substrato IRS-1 com alteração na fosforilação, afetando a transdução do sinal insulínico a jusante. Devido a essa condição, a translocação de GLUT-4 para a membrana plasmática é diminuída, caracterizando a resistência à insulina e desencadeando o acúmulo de glicose plasmática. -----83

Figura 43: Mapa geográfico do Brasil e da Europa ilustrando a imigração da região norte do Brasil, com predominância da população portuguesa. Dados obtidos a partir da plataforma Ensemble Home mostram a maior frequência do variante *rs1801278* na Europa (EUR). -----85

Figura 44: Parte da sequência de aminoácidos do substrato IRS-1. (A) Substrato IRS-1 selvagem, onde observa-se o resíduo de glicina (G) na posição 971 (vermelho) e o resíduo de serina (S) na posição 974 (lilás). Adjacentes a serina e glicina, observa-se sítios de reconhecimento (YMXM e YXXM*) (em verde) para moléculas com domínio SH2 que quando fosforilados em resíduos de tirosina (Y) permitem a interação entre IRS-1 e PI3K. (B) No substrato IRS-1 mutante, a glicina (G) é substituída por arginina (R) na posição 971. Observou-se que no IRS-1 mutante há aumento de fosforilação em serina. Segundo a literatura, a fosforilação em resíduos de tirosina (Y) é bloqueada ou reduzida quando ocorre a fosforilação em resíduos de serina adjacentes. Por isso, no IRS-1 mutante, a PI3K, molécula que contém domínio SH2, não reconhece IRS-1 e transdução do sinal da insulina é bloqueado. -----88

Figura 45: Modelo sobre o impacto da transdução do sinal insulínico devido o desequilíbrio na fosforilação do substrato IRS-1 selvagem e mutante: (A) Funcionamento da via de sinalização com o substrato IRS-1 selvagem (971G). Não há aumento de fosforilação para o substrato IRS-1 selvagem e a transdução do sinal da insulina desencadeia a translocação de GLUT 4 para a membrana plasmática, havendo a entrada de glicose e controle da glicemia plasmática. (B) Funcionamento da via de sinalização da insulina com o substrato IRS-1 mutante (971R). Há aumento da fosforilação em serina (974S), desencadeando prejuízos para a transdução do sinal da insulina, contribuindo para o desencadeamento da resistência à insulina e aumento da glicemia plasmática. -----89

Figura 46: Localização dos variantes de nucleotídeo único (SNV), não sinônimos, identificados na análise do sequenciamento do exoma do indivíduo P12 da pesquisa. Em vermelho o variante rs1801278, único variante cuja análise do impacto previu efeito prejudicial/deletério na estrutura e funcionamento do produto do gene, isto é, o substrato IRS-1. ----- **Erro! Indicador não definido.**

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Classificação etiológica da Diabetes <i>Mellitus</i>	22
Tabela 2: Critérios laboratoriais para diagnóstico de DM, adotados pela SBD (diretrizes 2019-2020).	25
Tabela 3 - SNVs identificados no gene <i>IRS1</i> associados a resistência à insulina e Diabetes <i>Mellitus</i> tipo 2.	40
Tabela 4 - Oligonucleotídeos desenhados e sintetizados para a análise do éxon 1 do gene <i>IRS1</i>	52
Tabela 5 - Concentração final dos reagentes utilizados na PCR otimizada para o par de oligonucleotídeos FW1 e RV1.	53
Tabela 6: Genes analisados nos dados obtidos pelo sequenciamento do exoma cujos produtos participam da via de sinalização da insulina.	58
Tabela 7: Sequência dos peptídeos IRS-1 selvagem e mutante sintetizados para a presente pesquisa. Observa-se na posição 971 uma mutação missense entre os peptídeos selvagem e mutante e na posição 974 uma serina.	60
Tabela 8: Associação entre tempo de diagnóstico para DM2 e complicações clínicas associadas a DM2.	63
Tabela 9: Associação entre comorbidades e complicações clínicas associadas a DM2.	64
Tabela 10 - Caracterização dos participantes da etapa de análise familiar.	68
Tabela 11: Resultado de variantes em genes relacionados a via de sinalização da insulina obtido a partir da análise do sequenciamento total do exoma do indivíduo P12. A tabela contém dados sobre o score obtido de cada variante gerado pelos programas Polyphen2 e SIFT e a classificação da predição de acordo com o score obtido.	69
Tabela 12: Comparação do sinal de luminescência com o uso de ADP-Glo™ Kinase Assay entre as amostras selvagem, mutante, kemptide, controle negativo. A luminescência foi medida usando GloMax® 20/20 Luminometer (PROMEGA Corporation). As amostras foram analisadas em quadruplicatas e apresentados os cálculos referentes a média e desvio padrão.	74

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μg – micrograma
 μM – micromolar
A – adenina
ADA - Associação Americana de Diabetes
ADP - Adenosina difosfato difosfato de adenosina
Arg – arginina
ATP - adenosina trifosfato
AVE - acidente vascular encefálico
bp – pares de bases
C – citosina
CAAE - Certificado de Apresentação para Apreciação Ética
DATASUS - Departamento de Informática do SUS
DCNT - Doenças crônicas não transmissíveis
ddNTP - dideoxynucleotídeos trifosfatados
ddNTPs dideoxynucleotídeos
DM – Diabetes *Mellitus*
DM2 – Diabetes *Mellitus* Tipo 2
DMSO - dimetil sulfóxido
DNA – ácido desoxirribonucleico
dNTP - Desoxirribonucleotídeos trifosfatados
EFC – Ensino Fundamental Completo
EFI – Ensino Fundamental Incompleto
EMC – Ensino Médio Completo
ESC – Ensino Superior Completo
FINDRISC - *Finnish Diabetes Risk Score*
FW – *Forward*
G – guanina
GESAU - Gerência de Gestão da Educação na Saúde
GLUT-4 -Transportador de glicose tipo 4
Gly ou G – glicina
Grb2 - proteína adaptadora Grb2 (*Growth Factor Receptor-Bound Protein 2*)
GWAS - *Genome-Wide Association Study*
H₂O – água
HbA1c – Hemoglobina glicada
HF - *Platinum™ Taq DNA polimerase High Fidelity*
HIRS – gene do substrato do receptor da insulina
HOMA - *homeostasis model assessment*
IFD - *International Diabetes Federation*
IMC - Índice de Massa Corporal
INSR – gene do Receptor da insulina
IRS-1 – Substrato do receptor da insulina 1
IRS1- gene do substrato do receptor da insulina 1

IRS-2 - Substrato do receptor da insulina 2
IRS-3 - Substrato do receptor da insulina 3
IRS-4 - Substrato do receptor da insulina 4
JNK - *C-Jun NH2-terminal kinase*
Kb – Kilobases
kDa – Kilodalton
M – Marcador de peso molecular
MAPK - Proteína-quinases ativadas por mitógenos
Mg – Magnésio
MgSO₄ – Sulfato de Magnésio
mL – mililitro
mM – milimolar
MODY - *Maturity-Onset Diabetes of the Young*
NCBI - *National Center for Biotechnology Information*
ng – nanograma
NR - Norma Regulamentadora
°C – grau Celsius
PCR – Reação em cadeia de polimerase, do inglês *Polimerase Chain Reaction*
PG – Pós-Graduação
PH domínio NH₂-terminal da homologia *pleckstrin*
PI3K - Fosfatidilinositol-3'-OH quinase
PIK3R1 – gene do fosfatidilinositol-3'-OH quinase (PI3K)
PIP2 - fosfatidilinositol-3-fosfato, fosfatidilinositol-3,4-difosfato
PIP3 - fosfatidilinositol- 3,4,5-trifosfato
PKB/Akt - Proteína quinase B Akt
PKC - proteína quinase C
PTB - Domínios de ligação à tirosina fosforilada (*phosphotyrosine binding*)
R – Aminoácido arginina
RFLP - Polimorfismos do Comprimento dos Fragmentos de Restrição
RI – Resistência à insulina
RV – *Reverse*
SBD – Sociedade Brasileira de Diabetes
SEMSA - Secretaria Municipal de Saúde
SER - Serina
SIM - Sistema de Informações de Mortalidade
SLC2A4 - gene do transportador de glicose 4 (GLUT 4)
SNP – Polimorfismo de base única
SN-PCR - Semi *Nested* PCR
SNV – Variante de nucleotídeo único
SUS - Sistema Único de Saúde
T – timina
Ta – Temperatura de anelamento
Taq – *Thermus aquaticus*
TBC1D4 – gene da proteína quinase B Akt (PKB/Akt)
THR - treonina

U – unidade enzimática

UFAM – Universidade Federal do Amazonas

UniProt - *Universal Protein Resource*

VIGITEL - Vigilância de Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico

VLDL - lipoproteína de densidade muito baixa

YMXM – tirosina, metionina, qualquer aminoácido, metionina

YXXM – tirosina, qualquer aminoácido, qualquer aminoácido, metionina

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	21
1.1 OBJETIVOS	24
1.1.1 Objetivo geral.....	24
1.1.2 Objetivos específicos.....	24
2 REVISÃO DE LITERATURA	25
2.1 DIABETES <i>MELLITUS</i> TIPO 2: UM PROBLEMA IMINENTE DE SAÚDE PÚBLICA	25
2.2 SINALIZAÇÃO DA INSULINA	30
2.3 SUBSTRATO DO RECEPTOR DA INSULINA 1 (IRS-1).....	37
2.4 GENE DO SUBSTRATO DO RECEPTOR DA INSULINA 1	39
2.5 SEQUENCIAMENTO E PCR-RFLP PARA O DIAGNÓSTICO MOLECULAR.....	42
3 MATERIAIS E MÉTODOS	49
3.1 OBTENÇÃO DA POPULAÇÃO	50
3.2 CARACTERIZAÇÃO DA POPULAÇÃO.....	50
3.3 COLETA DAS AMOSTRAS BIOLÓGICAS	51
3.4 EXTRAÇÃO DO DNA GENÔMICO	51
3.5 ANÁLISE DO ÉXON 1 DO GENE <i>IRS1</i>	52
3.6 CONFIRMAÇÃO DO VARIANTE <i>rs1801278</i>	56
3.7 ANÁLISE FAMILIAR DO VARIANTE <i>rs1801278</i>	57
3.8 SEQUENCIAMENTO DO EXOMA.....	57
3.9 MODELAGEM MOLECULAR.....	58
3.10 ESTUDO DO IMPACTO DO VARIANTE <i>rs1801278</i> NA TRANSDUÇÃO DO SINAL INSULÍNICO.....	59
4. RESULTADOS	61
4.1 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA	61
4.2 ANÁLISE DO ÉXON 1 DO GENE <i>IRS1</i>	65
4.3 IDENTIFICAÇÃO DO VARIANTE <i>rs1801278</i>	66
4.4 ANÁLISE FAMILIAR DO VARIANTE <i>rs1801278</i>	67
4.5 SEQUENCIAMENTO DO EXOMA.....	69
4.6 ANÁLISE DA MODELAGEM MOLECULAR	70
4.7 ANÁLISE DA FOSFORILAÇÃO.....	72
5 DISCUSSÃO	75
5.1 COMORBIDADES, COMPLICAÇÕES CLÍNICAS E VARIÁVEIS COMPORTAMENTAIS DE RISCO.....	75
5.2 ESTUDO DA AGREGAÇÃO FAMILIAR PARA <i>rs1801278</i> : UM VARIANTE ASSOCIADO A DM2.	80

5.3 ESTUDO DO IMPACTO DO VARIANTE <i>rs1801278</i> NA TRANSDUÇÃO DO SINAL INSULÍNICO.....	86
6 CONCLUSÕES	92
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	93
8 APÊNDICE	104
APÊNDICE A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE.	104
APÊNDICE B – Instrumento para a obtenção de dados dos participantes da Pesquisa.	106
APÊNDICE C – Artigos	107
APÊNDICE D – Apresentação em congressos	108
APÊNDICE E – Orientação de iniciação científica, trabalho de conclusão de curso e apoio em orientação de mestrado.....	109
9 ANEXO	110
ANEXO A – Autorização da Secretaria Municipal de Saúde – SEMSA.....	110
ANEXO B – Parecer de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Amazonas.....	111
ANEXO C – Sequência de referência do gene <i>IRS1</i> , disponível na plataforma NCBI.....	117
ANEXO D – Declaração de publicação.....	121

1 INTRODUÇÃO

Diabetes *Mellitus* (DM) é considerada uma doença epidêmica na atualidade. Trata-se de uma condição metabólica crônica e caracteriza-se como um estado de hiperglicemia persistente, *i. e.*, aumento excessivo da concentração plasmática de glicose (FERREIRA et al. 2011).

Dados da Federação Internacional de Diabetes (INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION, 2019) registraram 463 milhões de casos no mundo em 2019 e estima-se que em vinte e oito anos esse número supere os 700 milhões de diabéticos. A situação agrava-se, pois avalia-se que mais de 19 milhões de diabéticos não tem o conhecimento de seu estado patológico. Quanto à mortalidade, aproximadamente 4 milhões de pessoas com idade entre 20 e 79 anos morreram em 2017, devido a consequências clínicas da diabetes. Esses números colocam esta patologia como uma das principais causas de morte no mundo.

O Brasil possui 16,8 milhões de diabéticos e ocupa a quinta posição mundial em número de adultos entre 20 e 79 anos com diabetes. Esse número pode ser maior, pois estima-se que 7,7 milhões de pessoas no país ainda não foram diagnosticadas. Os custos anuais com cuidados médicos em diabéticos ultrapassam 52,3 bilhões de dólares (INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION, 2019; COSTA et al., 2017). Dados divulgados pela Sociedade Brasileira de Diabetes (2019) obtidos a partir do sistema de Vigilância de Fatores de Risco para doenças crônicas não transmissíveis (DCNT) do Ministério da Saúde (VIGITEL), mostraram que entre 2006 e 2017 o percentual de casos de diabetes passou de 5,5% para 8,9% e ainda um aumento de casos de 54% entre homens e 28% entre as mulheres. Um rastreamento com 17.580 pessoas de todas as regiões do país realizado durante a Campanha do Novembro Diabetes Azul 2018 mostrou que 18,4% apresentaram glicemia capilar elevada, estimando-se que um em cada cinco brasileiros têm risco de ter diabetes (CORRER et al., 2019).

Com esse cenário alarmante, é preciso reconhecer que apenas as políticas públicas, atualmente adotadas, são insuficientes para deter o avanço da síndrome diabética, o que torna imprescindível um esforço conjunto de pesquisadores e equipes de saúde para as medidas diagnósticas, preventivas, de tratamento e orientação.

A classificação da DM é atualmente baseada em sua etiologia (Tabela 1), no entanto, devido a sua heterogeneidade, estudos recentes apontam a necessidade de uma classificação mais refinada da diabetes para identificação, no momento do diagnóstico, de pessoas com alto risco para complicações sendo possível um tratamento personalizado. Estudo realizado por Ahlqvist et al., (2018) sugere a classificação da diabetes em grupos baseados na análise de variáveis comumente medidas: anticorpos para glutamato descarboxilase, idade ao

diagnóstico, IMC, HbA1c (hemoglobina glicada), índice HOMA (*homeostasis model assessment*)¹. Segundo os autores do estudo esses dados permitem estimar riscos relacionados ao prognóstico dos pacientes, facilitando o tratamento e monitoramento da doença.

Na atual classificação, a Diabetes *Mellitus* Tipo 2 (DM2) o tipo mais frequente de diabetes na população, correspondendo por mais de 90% dos casos (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2019). É de grande relevância para a saúde pública, porque além da elevada incidência e prevalência, compromete a produtividade, qualidade de vida e sobrevida da pessoa com DM2 (SANTOS; BEÇA; MOTA, 2015). No contexto clínico, é a principal causa de amputação de membros inferiores, complicações microvasculares (CECILIO et al., 2015; SANTOS et al., 2015) e cardiovasculares (KREUZBERG; AGUILAR; LIMA, 2016) e compromete gravemente as funções renais, pois grande parte da demanda de diálise é de pacientes diabéticos (VIANA; RODRIGUEZ, 2011).

Tabela 1: Classificação etiológica da Diabetes *Mellitus*.

TIPOS DE DIABETES	
	DM tipo 1:
1	- Tipo 1A: deficiência de insulina por destruição autoimune das células β comprovada por exames laboratoriais; - Tipo 1B: deficiência de insulina de natureza idiopática.
2	DM tipo 2: perda progressiva de secreção insulínica combinada com resistência à insulina
3	DM gestacional: hiperglicemia de graus variados diagnosticada durante a gestação, na ausência de critérios de DM prévio
	Outros tipos de DM:
4	- Monogênicos (Maturity-Onset Diabetes of the Young - MODY); - Diabetes neonatal; - Secundário a endocrinopatias; - Secundário a doenças do pâncreas exócrino; - Secundário a infecções; - Secundário a medicamentos.

DM: diabetes *mellitus*

Fonte: Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes, 2019-2020, adaptado de *American Diabetes Association*, 2019.

Diferente dos outros tipos de diabetes, como o tipo 1 ou as formas monogênicas do terceiro grupo (MODY), o DM2 possui uma heterogeneidade de fatores predisponentes que resultam de uma complexa interação entre genes, ambiente e condições de risco o que torna o entendimento da fisiopatologia difícil, bem como os mecanismos moleculares subjacentes (PARK, 2011; POTTIE et al., 2012).

¹ Método utilizado para quantificar a resistência à insulina e a função das células beta do pâncreas.

A hiperglicemia observada em DM2 é resultante de defeitos na secreção ou ação do hormônio insulina. No primeiro, ocorre uma deficiência na produção dos níveis de insulina pelas células beta pancreáticas, enquanto no segundo ocorre uma resistência celular aos níveis normais desse hormônio (KAHN et al., 2012).

A resistência celular à insulina (RI) é o principal fator fisiológico determinante para o aparecimento da DM2 (DERAKHSHAN et al., 2015; GOLDSTEIN, 2002) e está relacionada a defeitos na sinalização celular da insulina, especialmente relacionados à ligação desse hormônio ao seu respectivo receptor nos tecidos alvos, bem como a alterações pós receptor e redução da atividade quinase na transdução do sinal insulínico (GUO, 2014; SCHOFIELD; SUTHERLAND, 2012).

Estudos buscam identificar sequências variantes em genes envolvidos na via de sinalização da insulina, cujos produtos variantes potencialmente alteram a transdução dos sinais moleculares da insulina prejudicando a resposta celular para a entrada da glicose e consequentemente a manutenção da glicemia (KAHN et al., 2012). Nesse contexto, destaca-se o gene do substrato do receptor da insulina 1 (*IRS1*), foco da presente pesquisa, cujo produto é o substrato do receptor da insulina 1 (IRS-1). Esse substrato é imediatamente fosforilado após a ativação do receptor da insulina e, por isso, importante para a transdução da sinalização da insulina em tecidos periféricos (SALTIEL; KAHN, 2001a).

No contexto biotecnológico, o maior conhecimento de genes variantes associados a doenças genéticas permite o desenvolvimento de testes genéticos, uma importante ferramenta para a medicina preventiva no que tange as doenças complexas como a DM2, pois permite o estudo genético preditivo para a antecipação nas medidas de prevenção, segurança nos processos de aconselhamento genético dentro de famílias, individualização do tratamento e ações de controle para pacientes e familiares (HU; JIA, 2018).

Todo esse esforço científico permite melhorar ações implementadas nos sistemas de saúde, tanto para o indivíduo sintomático, quanto para o assintomático, visando garantir o controle efetivo sobre a glicemia, com redução de custos referentes a hospitalização devido a complicações clínicas da DM2 e consequentemente uma melhoria na qualidade de vida da população.

1. 1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

- Investigar variantes no gene *IRS1* para análise de fator genético de risco para o desencadeamento de Diabetes *Mellitus* Tipo 2 em uma amostra de pessoas com diagnóstico clínico da doença em Manaus (AM).

1.1.2 Objetivos específicos

- Caracterizar a população em estudo sobre aspectos socioambientais e a prevalência de comorbidades, complicações clínicas, condições e comportamentos de risco associadas a Diabetes *Mellitus* Tipo 2.

- Identificar, na amostra inicial da presente pesquisa, variantes de base única ou outros tipos de mutações que comprometam a expressão do gene *IRS1*.

- Pesquisar, em outros membros da família, a presença do variante identificado no gene *IRS1*;

- Verificar, no indivíduo portador do variante, outras sequências variantes em genes relacionados a via de sinalização da insulina em tecidos periféricos.

- Investigar o impacto do variante identificado na transdução do sinal insulínico e suas possíveis implicações no desencadeamento da DM2.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 DIABETES *MELLITUS* TIPO 2: UM PROBLEMA IMINENTE DE SAÚDE PÚBLICA

Diabetes *Mellitus* Tipo 2 (DM2) tem sido amplamente estudada devido a sua alta prevalência na população mundial, fato esse que a caracteriza como uma epidemia do século XXI e um iminente problema de Saúde Pública, pois se prevê um aumento da incidência ao longo dos próximos anos (INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION, 2019). No contexto social e econômico é preocupante, pois compromete a produtividade, qualidade de vida e sobrevivência dos pacientes, e possui altas taxas de mortalidade no mundo (SANTOS; BEÇA; MOTA, 2015).

É uma doença metabólica crônica cuja principal característica é o aumento da concentração de glicose plasmática, distúrbio denominado de hiperglicemia. A glicose é um importante monossacarídeo com papel central no metabolismo energético celular. A hiperglicemia crônica provoca danos em longo prazo ao funcionamento de vários órgãos originando um complexo quadro clínico ao que possui a doença. Medidas de controle devem ser efetivamente adotadas visando normalizar a taxa da glicemia para garantir uma melhor qualidade de vida ao diabético.

Segundo as Diretrizes da SBD (2019-2020) (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2019), o diagnóstico laboratorial da hiperglicemia são realizados a partir dos exames: glicemia de jejum, glicemia 2 horas após teste oral de tolerância à glicose (TOTG) e hemoglobina glicada (HbA1c). A confirmação do diagnóstico para DM requer repetição dos exames alterados. Os valores adotados para o diagnóstico são descritos na tabela 2.

Tabela 2: Critérios laboratoriais para diagnóstico de DM, adotados pela SBD (diretrizes 2019-2020).

	Glicose em jejum (mg/dL)	Glicemia 2 horas após TOTG com 75g de glicose (mg/dL)	Glicose ao acaso	Hemoglobina glicada (HbA1c) (%)
Normal	< 100	< 140	-	< 5,7
Pré-Diabetes ou risco aumentando para DM	≥ 100 e < 126	≥ 140 e < 200	-	≥ 5,7 e < 6,5
Diabetes estabelecido	≥ 126	≥ 200	≥ 200 com sintomas inequívocos de hiperglicemia	≥ 6,5

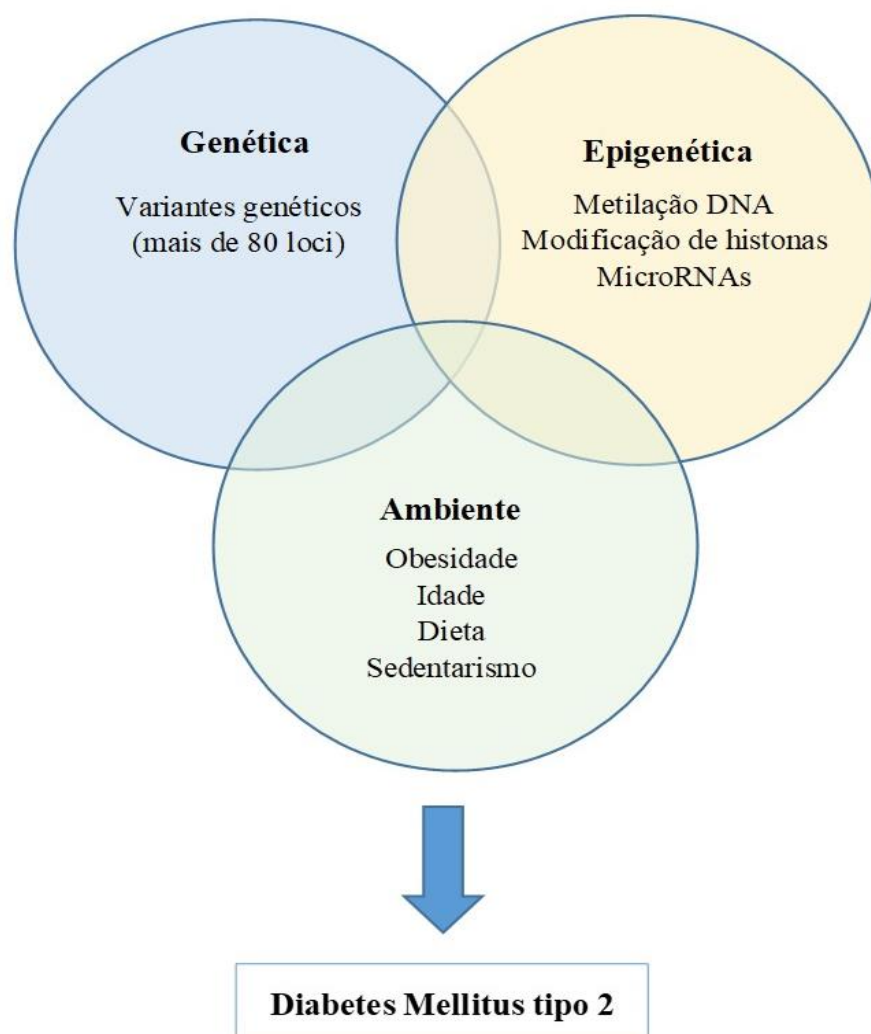
TOTG: Teste Oral de Tolerância à Glicose

Fonte: Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes 2019-2020.

A hiperglicemia observada na DM2 é decorrente de alterações na ação ou secreção da insulina, um hormônio polipeptídico secretado pelas células β pancreáticas, essencial para a homeostase da glicose sanguínea, crescimento e diferenciação celular e metabolismo dos lipídios. A regulação da glicemia pela ação da insulina ocorre a partir da redução da gliconeogênese hepática e aumento da captação periférica da glicose nos tecidos muscular e adiposo (LUCBS, 2006). Em condições normais, a insulina secretada pelas células β pancreáticas atinge rapidamente os tecidos periféricos e interage com um complexo sistema de sinalização molecular que promove a entrada de glicose para as células (GUO, 2014).

A etiologia da DM2 é multifatorial com uma heterogeneidade de fatores predisponentes em uma complexa interação entre genes, ambiente e fatores epigenéticos associados a condições de risco (Figura 1) (HU; JIA, 2018).

Figura 1: Etiologia da Diabetes *Mellitus* Tipo 2: interação entre os fatores genéticos, ambientais e epigenéticos.



Fonte: HU; JIA (2018), com adaptações

Estudos genéticos e a forte agregação familiar observada evidenciam, cada vez mais, o papel dos genes na determinação da patologia. Quanto à herança, a DM2 classifica-se como poligênica, em que variantes de genes predisponentes podem desencadear alterações bioquímicas e fisiológicas que culminarão na hiperglicemia (SLADEK et al., 2007). Estudos de associação em genoma completo (*Genome-Wide Association Study* – GWAS) identificaram mais de 100 genes que conferem suscetibilidade para DM2, entre diferentes etnias (PARK, 2011). Genes que codificam proteínas envolvidas na sinalização da insulina, secreção da insulina e metabolismo intermediários são os mais envolvidos na herança da DM2 (SALTIEL; KAHN, 2001a).

Fatores ambientais como obesidade, idade, dieta, sedentarismo também contribuem para o desencadeamento de DM2 na população, especialmente em pessoas com suscetibilidade genética (HU; JIA, 2018).

Estudos recentes sobre mecanismos epigenéticos evidenciam a associação desses ao desencadeamento de DM2, notadamente reprimindo a expressão de genes relacionados ao metabolismo da glicose (NILSSON et al., 2014; YONAMINE, 2017).

A gravidade em DM2 é consequência de comorbidades, a coexistência de doenças, sendo as mais comuns a hipertensão arterial, dislipidemia e obesidade (GRILLO; GORINI, 2007). Em geral, essas comorbidades estão presentes no momento do diagnóstico da hiperglicemia.

Vários estudos relatam a alta prevalência da hipertensão arterial em pessoas com DM2, observada, sobretudo no sexo feminino (FERRANNINI; CUSHMAN, 2012; MENGESHA, 2007; NILSSON; CEDERHOLM, 2011), e é um dos principais fatores de risco para doenças cardiovasculares e eventos cerebrovasculares (NILSSON; CEDERHOLM, 2011). Caracteriza-se pelo aumento da resistência vascular periférica, o que eleva a pressão sanguínea nas artérias. Essa fisiopatologia interliga-se com DM2, especialmente, devido à resistência à insulina, cujo estado de hipersulinemia reduz a vasodilatação (FERRANNINI; CUSHMAN, 2012). As alterações vasculares são naturais ao processo de envelhecimento, no entanto, a incidência de hipertensão com o aumento da idade é maior em pessoas diabéticas do que pessoas não diabéticas (SPENCER, 2010).

A dislipidemia é a elevação das taxas normais de lipídios e de lipoproteínas na corrente sanguínea. A resistência à insulina, em pessoas com DM2, predispõe a alterações no metabolismo das lipoproteínas circulantes, ocorrendo hipertrigliceridemia (aumento de triglicerídeos) e aumento na produção hepática de VLDL, uma lipoproteína de densidade muito baixa (MULLUGETA et al., 2012; PEREIRA, 2011; PINHO et al., 2015). Essas alterações contribuem para o desenvolvimento de aterosclerose (formação de placas de ateroma sobre a

parede das artérias) e doenças cardiovasculares. No caso de pessoas diabéticas o risco do desenvolvimento das condições supracitadas se eleva de 2 a 4 vezes (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2019).

É observada uma alta prevalência de pessoas com diabetes tipo 2 e obesas ou com sobrepeso, sugerindo uma associação entre essas duas patologias (ARSA et al., 2009; GRILLO; GORINI, 2007; LIMA et al., 2010; ROCHA et al., 2017). Na obesidade, ocorre o aumento da massa de adipócitos estimulando o aumento de adipocinas, fatores inflamatórios expressos pelo adipócito inflamado, que influenciam negativamente no reconhecimento da insulina aos respectivos receptores, desregulando a resposta celular a esse hormônio e promovendo a resistência à insulina e a hiperglicemia. Em pessoas com DM2 e obesas, essa situação agrava o estado crônico de hiperglicemia, aumentando as probabilidades de complicações clínicas (FREITAS; CESCHINI; RAMALLO, 2014).

O aumento da mortalidade entre pessoas com DM2 está associado ao desenvolvimento de complicações agudas (KLAFKE et al., 2014), devido à hiperglicemia crônica que causa alterações fisiológicas e metabólicas no decorrer dos anos (FERREIRA et al., 2011). São comuns as complicações macrovasculares, que comprometem as artérias coronarianas, de membros inferiores e cerebrais, e microvasculares que causam neuropatia, retinopatia, nefropatia e isquemia (CECILIO et al., 2015; GRILLO; GORINI, 2007; LIMA et al., 2010). As complicações diferem em frequência e níveis de gravidade.

Entre as principais complicações, destacam-se a nefropatia diabética, responsável pela insuficiência renal e alta frequência de hemodiálise, e as doenças cardiovasculares, importante causa de morte em pessoas com DM2 (FERREIRA et al., 2011; GRILLO; GORINI, 2007; VIANA; RODRIGUEZ, 2011). Kreuzberg, Aguilar e Lima (2016) analisaram o risco para complicações vasculares em pessoas com Diabetes por meio da análise do escore de Framingham² e observaram alto risco para doença cardiovascular no sexo masculino e risco intermediário para o sexo feminino.

Outra frequente complicação, é o chamado pé diabético resultado da destruição do tecido mole associada à neuropatia diabética e doença arterial periférica, cuja gravidade leva a amputações incapacitantes (GUTIÉRREZ; MONTALVO, 2012; HORIZONTE, 2011; LIMA et al., 2010; SANTOS et al., 2013).

Para se evitar as complicações decorrentes da hiperglicemia, é imprescindível o controle apropriado da glicemia. No entanto, estudo realizado por Moreira (2016) com 3.726

² Método que avalia o risco de doença cardiovascular de acordo com a presença ou não de certos fatores de risco como: faixa etária, sexo, valores de pressão arterial sistólica, valores da razão entre o colesterol total e a fração HDL, presença de tabagismo e diagnóstico de diabetes.

pacientes com DM2 no Brasil e Venezuela mostra que o controle glicêmico inadequado foi elevado no grupo de estudo, o que denota a necessidade políticas públicas imediatas e medidas efetivas quanto à orientação dos pacientes e acompanhamento clínico adequado.

A DM2 e as suas complicações geram elevado índice de hospitalização e, portanto, alto custo aos sistemas de saúde. De acordo com dados sobre internação hospitalar do DATASUS (Departamento de Informática do SUS), no ano de 2015 a morbidade hospitalar por Diabetes *Mellitus* no Brasil foi de 137.631 internações (BRASIL.MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2016). As despesas decorrentes de DM nas Américas do Sul e Central foram estimadas em aproximadamente 35 bilhões de dólares no ano de 2015, configurando uma despesa duas vezes mais elevada com pessoas com DM em comparação a pacientes não diabéticos (INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION, 2019). Em estudo realizado por Saraiva et al. (2016), em 4 (quatro) centros do Sistema Único de Saúde, foi calculado um custo médio de R\$ 931,88 por paciente diabético sem complicações vasculares e de R\$ 1.212,37 para aqueles com complicações. É notório que os custos envolvidos no tratamento da diabetes e das complicações relacionadas à doença são altos, tanto ao paciente que pode arcar com suas despesas quanto para aqueles que necessitam do acesso ao sistema público de saúde.

Dados obtidos por meio do acesso ao Ministério da Saúde - Sistema de Informações de Mortalidade (SIM) revelam que em 2011 foram notificados 57.876 óbitos por Diabetes *Mellitus* em nosso país, o que dimensiona a magnitude da doença. As taxas de mortalidade por DM2 (por 100 mil habitantes) correspondem a 30,1 para a população geral, 27,2 nos homens e 32,9 nas mulheres, com acentuado aumento no progredir da idade, que varia de 0,50 para a faixa etária de 0 a 29 anos a 223,8 para a de 60 anos ou mais, ou seja, um incremento de 448 vezes e uma notável tendência ascendente da taxa de mortalidade. Cerca de 85% dos óbitos por diabetes ocorrem a partir dos 40 anos de idade, em ambos os sexos (BRASIL.MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2016).

As alterações metabólicas do DM2 são passíveis de prevenção por meio da educação em saúde associada à abordagem multiprofissional na atenção básica. Dessa forma, é importante o investimento tanto na atenção primária, para reduzir a incidência, quanto na prevenção secundária, para redução das complicações da DM2 (ARAÚJO; MOREIRA, 2019; SILVA, 2009).

Mudanças de hábitos, como dieta adequada, redução de peso e a prática de atividade física devem ser realizadas por todas as pessoas com DM2, visando manter a glicemia e a pressão arterial dentro da normalidade evitando-se as complicações clínicas. (ALMEIDA; ALMEIDA, 2016; LINDSTRO et al., 2010).

Releva-se a importância de exames periódicos, principalmente em pessoas com casos na família. Muitos casos de DM2 na população não são diagnosticados, pois os sintomas manifestam-se de forma gradual e lenta e somente após muitos anos de hiperglicemia (CORRER et al, 2019). Quando não é feito o diagnóstico no início do aparecimento da patologia, as complicações decorrentes da hiperglicemia crônica avançam, causando a falência de órgãos importantes (INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION, 2019).

Foram desenvolvidos modelos baseados em fatores de risco como o *Finnish Diabetes Risk Score* (FINDRISC), que visa identificar ou triar indivíduos na população com potencial para o desenvolvimento de DM2 (LINDSTRÖM; TUOMILEHTO, 2003; NOBLE et al., 2011). Esse modelo tem sido aplicado em estudos, com resultados satisfatórios e validade para a prática clínica (AEKPLAKORN et al., 2006; GOMEZ-ARBELAEZ, 2015; JANGHORBANI; ADINEH; AMINI, 2013).

Devido à expectativa de aumento de portadores da DM2 em nível mundial, é necessário o investimento em pesquisas, visando uma atenção primária mais eficiente e preventiva. A identificação precoce de indivíduos com alto risco para DM2 pode retardar o início da patologia com intervenções farmacológicas e no estilo de vida (LYRA et al., 2006).

Em se tratando de uma patologia que possui uma contribuição genética importante, o mapeamento de marcadores moleculares para a DM2 pode trazer contribuição importante para a medicina preventiva, acompanhamento clínico do paciente e melhorias a programas de saúde familiar, pois vai potencializar o desempenho preditivo para a doença na população (FERRAZ-DE-SOUZA, 2015; VASSY; MEIGS, 2012).

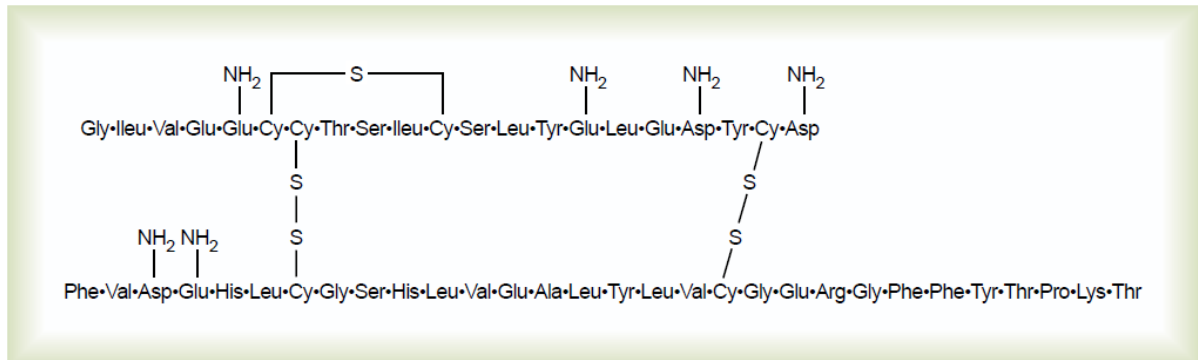
2.2 SINALIZAÇÃO DA INSULINA

A insulina é um hormônio polipeptídico que regula a homeostase glicêmica estimulando a captação periférica da glicose em tecidos sensíveis à insulina, isto é, aqueles que aumentam intensamente a capacidade de transportar glicose para dentro da célula sob estímulo hormonal, em especial muscular e adiposo. Esse hormônio também age inibindo a liberação de glicose pelo fígado, estimulando a síntese proteica, de ácidos graxos livres e glicogênio e bloqueando a proteólise, lipólise e produção hepática de glicose (PAIVA, 2014; SPRAGUE; ARBELÁEZ, 2011).

A estrutura tridimensional do monômero da insulina foi descrita primeiramente por Abel em 1946, por estudo de cristalografia de Raio X. É constituída por duas cadeias polipeptídicas denominadas alfa (α) e beta (β), que respectivamente possuem 21 e 30 resíduos

de aminoácidos e se ligam por meio de duas pontes dissulfeto. A cadeia alfa possui também uma ligação dissulfeto intrafilamentar (PAIVA, 2014) (Figura 2).

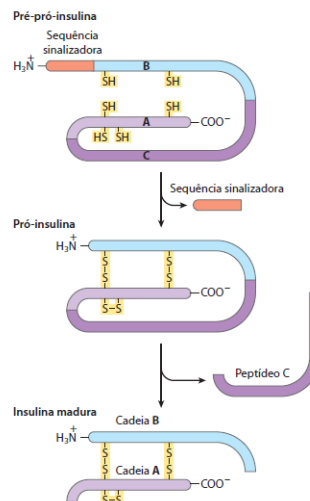
Figura 2 - Estrutura molecular da insulina humana.



Fonte: Hall; Guyton (2017).

Embora a síntese de insulina seja controlada por vários fatores metabólicos, um aumento rápido na concentração de glicose sanguínea é o principal evento que estimula a sua síntese e secreção pelas células β (beta) presentes nas Ilhotas de Langerhans do pâncreas (MONTENEGRO; CHAVES; FERNANDES, 2016). Após a síntese, o polipeptídeo pré-pró-insulina sofre clivagem no Aparelho de Golgi, libera a pró-insulina e após a proteólise forma a insulina (FU; GILBERT; LIU, 2013). Após a síntese, o pré-hormônio é armazenado em hexâmeros (uma conformação de seis moléculas organizadas em três dímeros), em um processo dependente de alta concentração dos monômeros, zinco e pH favorável (CISZAK; SMITH, 1994). A secreção dos hexâmeros, no sangue, pelas células β reduz o gradiente de concentração favorecendo a dissociação dos hexâmeros e a formação de sua forma ativa em monômero (Figura 3) (FU; GILBERT; LIU, 2013).

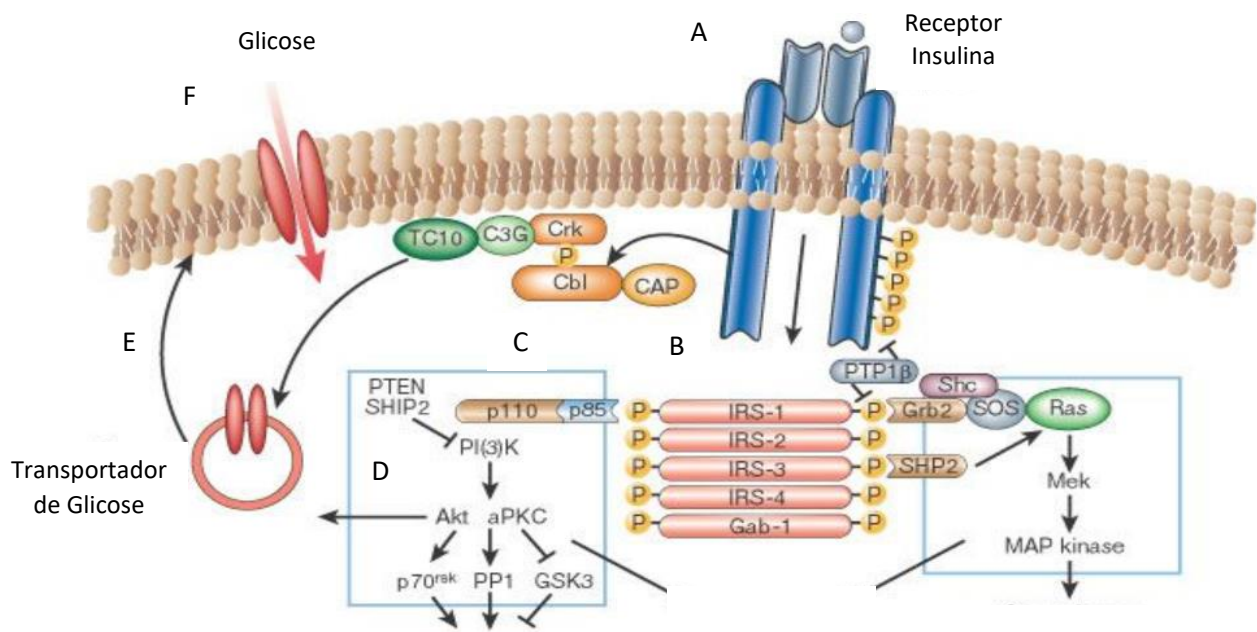
Figura 3 - Etapas do processamento proteolítico na síntese da insulina. A pré-pró-insulina sofre clivagem liberando a pró-insulina que sofre nova clivagem para liberar a insulina funcional.



Fonte: Nelson; Cox (2014).

Vários estudos aplicam-se a compreender o mecanismo molecular de ação da insulina, pois é o principal fator desencadeante em diversas enfermidades endócrinas, em especial a Diabetes *Mellitus* tipo 2. Esse mecanismo envolve uma série de proteínas de membrana e citoplasmáticas responsáveis pela sinalização e resposta celular ao sinal insulínico, conforme esquematizado na figura 4.

Figura 4 - Vias de sinalização da insulina. A ligação da insulina ao seu receptor (A) promove a transdução do sinal ao fosforilar proteínas intracelulares conhecidas como substratos do receptor da insulina (IRS) (B). Após a fosforilação, essas proteínas ligam-se a outras moléculas sinalizadoras como a PI 3-quinase (C) no domínio SH2, cujos produtos ativam a PKB/Akt (D) promovendo a liberação da proteína GLUT-4 (E) para a membrana celular (F) regulando o transporte de glicose para dentro da célula.

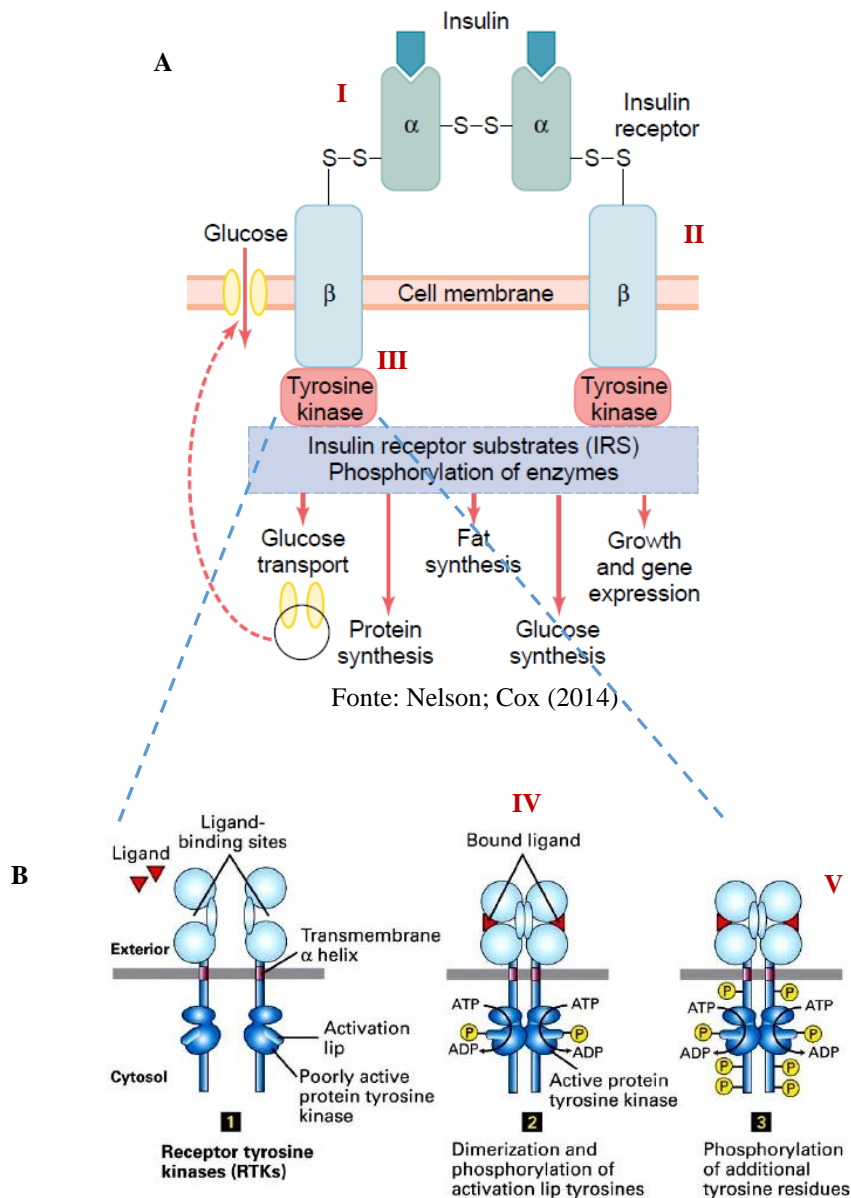


Fonte: Saltiel; Kahn (2001a)

A insulina, secretada pelas células beta pancreáticas, liga-se a um receptor de membrana denominado Receptor de Insulina, uma proteína heterotetramérica composta por duas subunidades α , localizadas fora da membrana celular e duas subunidades β transmembrânicas com domínio intracelular tirosina quinase (figura 5A). A subunidade α tem efeito inibitório sobre a subunidade β , quando na ausência da insulina. Com a ligação da insulina, a subunidade α sofre uma mudança conformacional perdendo a capacidade de inibição e ativando a atividade quinase da subunidade β , permitindo autofosforilação de resíduos de tirosina (Figura 5B) e a fosforilação de proteínas citosólicas. Substratos do receptor da insulina (IRS) são as principais proteínas fosforiladas após a estimulação da insulina desencadeando a

transdução de sinais pós-receptor. Destacam-se os substratos IRS-1, IRS-2, IRS-3 e IRS-4 (CARVALHEIRA; ZECCHIN; SAAD, 2002; LUCHS, 2006).

Figura 5 – Esquema da estrutura do receptor da insulina (A) e a ativação do receptor tirosina-quinase (B). O receptor da insulina possui duas subunidades α , localizadas fora da membrana celular (I), e duas subunidades β transmembrana (II) com domínio intracelular tirosina quinase (III). A ligação à molécula sinalizadora extracelular (insulina) vai induzir a aproximação de duas subunidades do receptor (IV), formando um dímero (V), promovendo a autofosforilação de resíduos de tirosina (VI) e conseqüentemente sua ativação.



As funções fisiológicas dessa família de substratos sobre a homeostase da glicemia foram estudadas por diferentes autores. Araki et al. (1994) realizaram um clássico experimento com camundongos sem a expressão do gene que codifica o substrato IRS-1, obtidos por meio de mutação dirigida. Os resultados mostraram que esses camundongos apresentaram resistência à insulina com diminuição na captação de glicose estimulada por insulina. Os mesmos autores destacaram em seus resultados a existência de um substrato alternativo, posteriormente denominado IRS-2. Resultados obtidos por Withers et al. (1998) mostraram que camundongos sem a expressão de IRS-2 também apresentaram resistência à insulina, com descontrole da homeostase da glicose. Pesquisas posteriores corroboram com os autores citados indicando que a ausência dos substratos IRS-1 e IRS-2 são importantes contribuintes para a fisiopatologia da diabetes tipo 2 em humanos e que camundongos que não expressam os genes dos substratos IRS-3 e IRS-4 não apresentaram alteração notável no metabolismo da glicose (FANTIN et al., 2000).

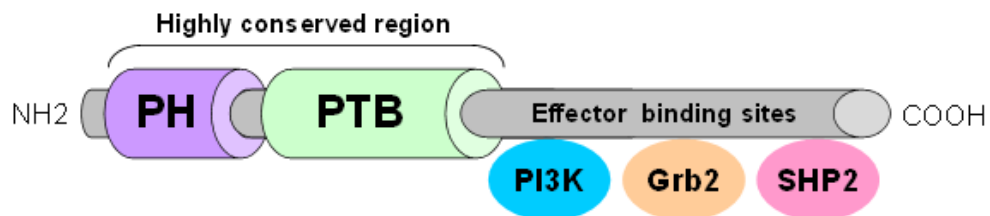
Estudos mostram diferenças na distribuição tecidual dos substratos IRS e, portanto, uma associação funcional tecido-específica. O IRS-1 tem alta expressão e papel funcional importante no músculo esquelético, enquanto IRS-2 regula principalmente a ação da insulina hepática e o desenvolvimento e sobrevivência das células beta do pâncreas (PREVIS et al., 2000; TANIGUCHI; EMANUELLI; KAHN, 2006). O IRS-3 é expresso em adipócitos e possui o menor peso molecular das proteínas IRS (LAVAN et al., 1997). Considerando-se que a expressão do IRS-4 é praticamente restrita à glândula pituitária e ao cérebro, é possível que esse substrato esteja menos associado ao receptor de insulina, mas ser potencialmente importante na transdução de sinal de outros receptores presentes nesses tecidos (LUCHS, 2006).

Estruturalmente, proteínas IRSs possuem dois domínios denominados PH e PTB, importantes para a interação dessas ao receptor da insulina. O domínio NH₂-terminal da homologia *pleckstrin* (PH) liga-se a fosfolipídios das membranas, permitindo que o receptor fosforile de forma eficiente determinados resíduos de tirosina do substrato. O domínio ligante a fosfotirosina – PTB (*phosphotyrosine binding*) - interage com regiões NPEY (onde, N = asparagina; P = prolina; E = glutamato; Y = tirosina) fosforiladas na região da subunidade β do receptor da insulina, estabilizando o complexo de ativação do receptor e garantindo a transdução de sinal. Além dos domínios, proteínas IRS possuem ainda uma cauda terminal COOH, conhecida como domínio não PTB, de tamanho variado nos diferentes IRSs com múltiplos sítios para fosforilação em resíduos de tirosina pelo receptor da insulina. A fosforilação dessas proteínas cria sítios de reconhecimento para moléculas com domínio SH2, como a fosfatidilinositol 3-quinase (PI 3K), Grb2 e SHP-2 (Figura 6 e 7) (BOURA-HALFON; ZICK, 2009; BRUMMER; SCHMITZ-PEIFFER; DALY, 2010; LUCHS, 2006).

Apesar da similaridade estrutural, as proteínas IRSs possuem diferentes padrões de fosforilação em resíduos de tirosina pelo receptor da insulina e diferentes padrões de associação com proteínas contendo domínio SH2 distintos. Outro fato a se considerar, é a localização dentro da célula dos diferentes IRS: IRS-1 e IRS-2 estão associados a estruturas intracelulares, enquanto IRS-3 e IRS-4 à membrana plasmática (LUCBS, 2006).

Conhecidas como ‘proteínas de atracamento’, os substratos da família IRS funcionam como pontos de recrutamento de moléculas sinalizadoras à jusante da via em resposta a ativação do receptor da insulina, e aumentam a complexidade e flexibilidade regulatória da sinalização e amplificação do sinal (BOURA-HALFON; ZICK, 2009).

Figura 6 - Estrutura esquemática das proteínas IRS. Observa-se os domínios PH, PTB e sítios de reconhecimento para moléculas com domínio SH2: Fosfatidilinositol-3'-OH quinase (PI3K), proteína adaptadora Grb2, Proteína Tirosina fosfatase SHP2.



Fonte: Machado-Neto; Traina (2013)

Figura 7 - Substratos IRS do receptor da insulina. Os domínios PH e PTB possuem homologia entre os substratos enquanto a região em que se localizam os sítios de reconhecimento para moléculas com domínio SH2 são diferentes entre os substratos IRS-1/IRS-2, IRS-3 e IRS-4. Observa-se múltiplos sítios de fosforilação em resíduos de tirosina localizados na cauda terminal (vermelho) e os pesos moleculares de cada substrato.

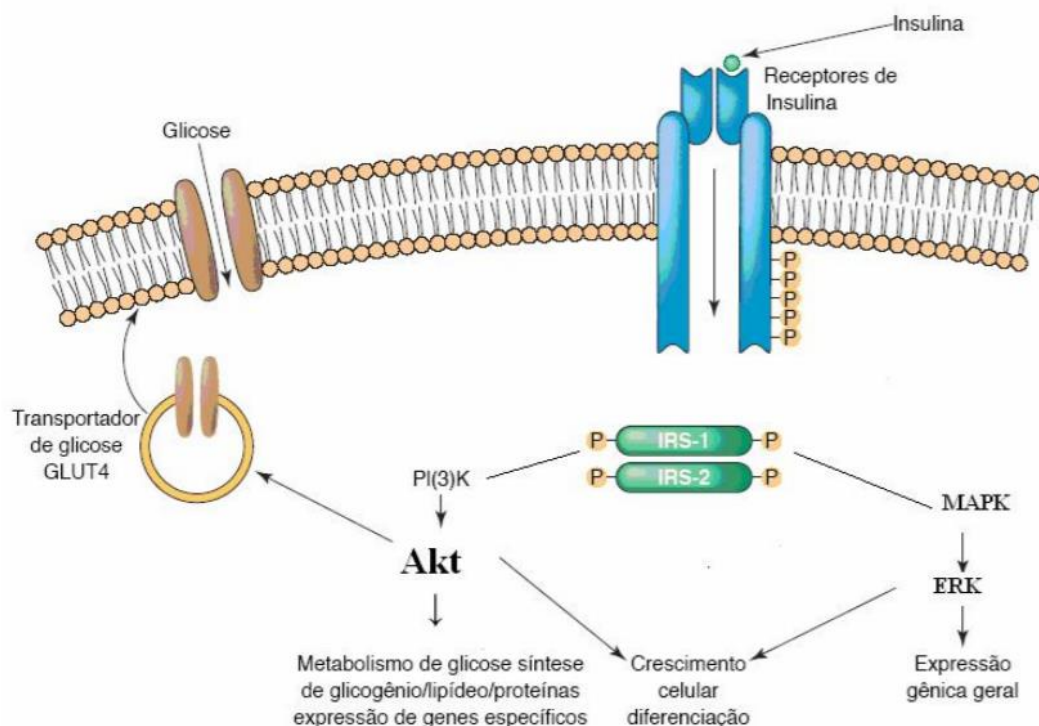


Fonte: Orey (2003), com modificações.

Na transdução do sinal insulínico, a enzima heterodimérica fosfatidilinositol-3 quinase (PI3K) é um importante efetor da via de sinalização atuando no transporte de glicose para a célula, regulação da mitogênese e diferenciação celular. Estruturalmente, é composta por uma subunidade catalítica (p110) associada a uma subunidade regulatória (p85). O domínio catalítico é ativado a partir da ligação do domínio SH2 da subunidade P85 aos sítios YMXM e YXXM (onde, Y= tirosina, M= metionina, X= qualquer aminoácido) fosforilados das proteínas IRS (CARVALHEIRA; ZECCHIN; SAAD, 2002; LUCBS, 2006). Essa ligação gera a

dissociação da subunidade p110, que assim catalisará a fosforilação de grupos fosfatidil-inositol (fosfoinosítídeos) na posição 3, produzindo fosfatidilinositol-3-fosfato, fosfatidilinositol-3,4-difosfato (PIP2) e fosfatidilinositol- 3,4,5-trifosfato (PIP3). Os produtos PIP2 e PIP3 ativam serina/treonina quinases entre essas, a proteína quinase B Akt (PKB/Akt) que promove a translocação do transportador de glicose tipo 4 (GLUT-4) de locais intracelulares para a membrana plasmática, permitindo o aumento da captação da glicose pela célula por difusão facilitada (Figura 8) (GUO, 2014).

Figura 8 - Translocação da proteína GLUT – 4 para a membrana celular a partir da transdução de sinal insulínico em células de tecidos sensíveis a insulina. Esse processo permite a entrada de glicose na célula.



Fonte: Queiroz (2008), adaptado de Carvalheira et al. (2002)

A via da sinalização da insulina também possui um mecanismo de controle negativo, importante para a atenuação ou interrupção em resposta à modulação metabólica. Estudos mostram que a fosforilação em sítios de resíduos de serina (SER) ou treonina (THR) do IRS-1 reduz ou bloqueia a fosforilação da tirosina ou promove mudança na conformação estrutural do IRS-1 (especialmente no domínio PTB) ou à ligação desse a moléculas de sinalização desconhecidas. (GUAL; LE MARCHAND-BRUSTEL; TANTI, 2005; PAZ et al., 1997a; SALTIEL; PESSIN, 2002).

Diante dos estudos sobre a via de sinalização da insulina, observa-se nesse processo um sensível equilíbrio entre a fosforilação do resíduo de tirosina (positiva) e a fosforilação do

resíduo de serina (negativa). Interferências nesse equilíbrio contribuem para problemas na transdução do sinal da insulina e captação de glicose plasmática.

O mecanismo supracitado é reconhecido também em estudos sobre obesidade e estresse. Esses fatores ambientais inibem a ação da insulina devido à ativação da proteína quinase C (PKC) que fosforila o resíduo de serina na posição 1101 do IRS-1, bloqueando a fosforilação da tirosina nesse substrato e diminuindo a ativação de Akt (LI et al., 2004).

Compreender a via de sinalização da insulina é importante para a fisiopatologia de doenças em humanos, pois fatores genéticos e não genéticos podem influenciar nesse processo. Vários estudos apontam que alterações na sequência ou no nível de expressão dos genes cujos produtos estão envolvidos na sinalização da insulina são fatores determinantes da resistência à insulina e desencadeamento da DM2 (CARVALHEIRA; ZECCHIN; SAAD, 2002). Nesse contexto, as proteínas IRS são os principais alvos para a compreensão de possíveis problemas na transdução do sinal insulínico.

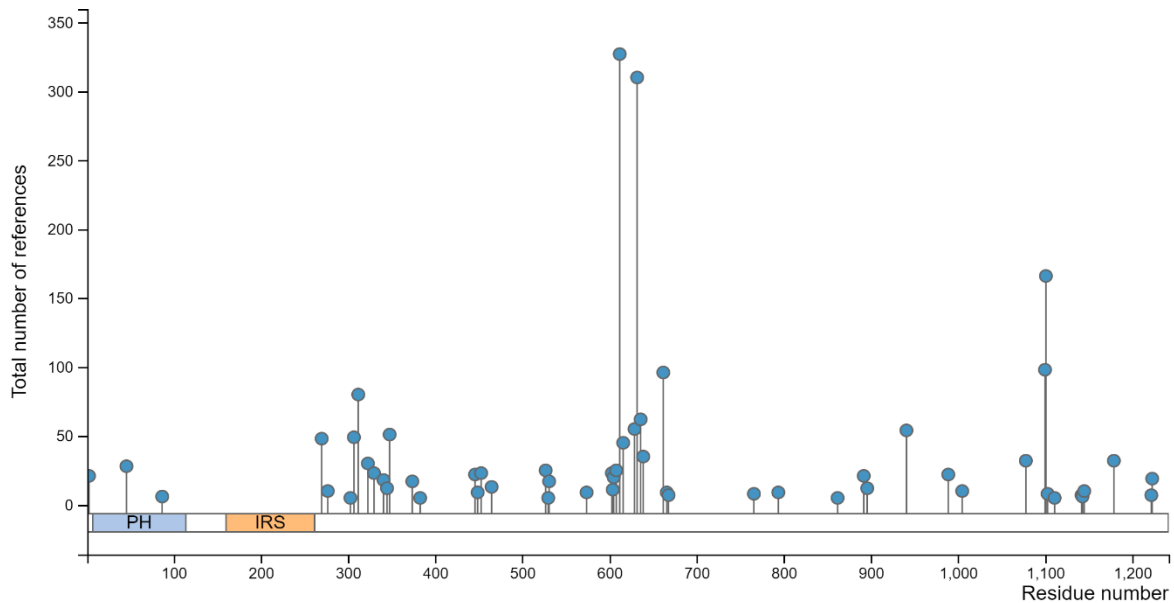
2.3 SUBSTRATO DO RECEPTOR DA INSULINA 1 (IRS-1).

A ativação do receptor da insulina causa a fosforilação de substratos, incluindo os substratos do receptor da insulina (IRS). Nessa família de substratos, destaca-se o IRS-1, imediatamente fosforilado em determinados resíduos de tirosina após estimulação insulínica e, portanto, de suma importância para os passos iniciais da transdução do sinal pós-receptor. Foi o primeiro substrato do receptor da insulina clonado e é o melhor caracterizado (SUN et al., 1991).

O substrato IRS-1 (P35568³) é uma proteína citoplasmática, monomérica com 1.242 resíduos de aminoácidos e apresenta uma massa molecular entre 165 a 180 kDa. Contém vários sítios potenciais de fosforilação em resíduo de tirosina, serina e treonina (figura 9) (GUAL; LE MARCHAND-BRUSTEL; TANTI, 2005). Quando fosforilado, é capaz de gerar múltiplos sinais celulares, podendo ativar várias proteínas de sinalização à jusante, como: (1) a PI3K, importante para a captação da glicose, síntese de glicogênio, lipídios e proteínas, expressão de genes e proliferação celular; e (2) a Grb₂ que estimula a cascata MAPK (*mitogen-activated protein kinase*/Proteína-quinases ativadas por mitógenos) resultando na proliferação e diferenciação celulares (Figura 10) (CARVALHEIRA; ZECCHIN; SAAD, 2002).

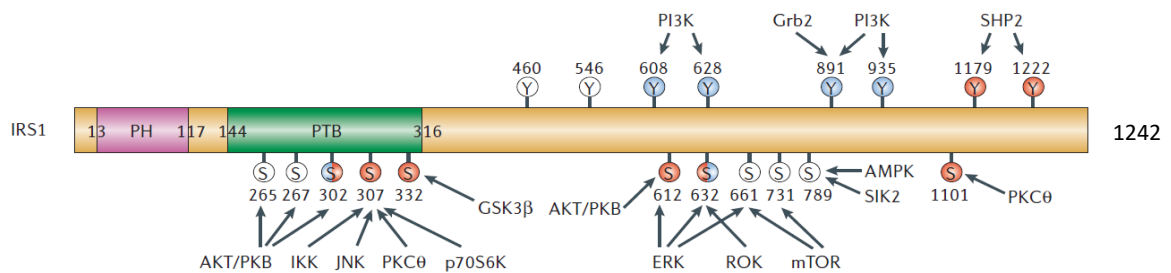
³ Código UNIPROT - base de dados que contém informações sobre sequências de proteínas e respectivas funções.

Figura 9: Estrutura do substrato IRS-1 mostrando múltiplos sítios de fosforilação em resíduos de tirosina, serina e treonina.



Fonte: PhosphoSite Plus®, www.phosphosite.org

Figura 10 - Esquema da estrutura molecular do substrato 1 do receptor da insulina. Observa-se os domínios PH (magenta), PTB (verde) e vários sítios de fosforilação em resíduos de tirosina (Y) e serina (S). São indicados os resíduos de tirosina fosforilados pelo receptor da insulina, cujo processo provoca a ligação e ativação de PI3K, Grb2 e SHP2. Também são indicados os resíduos de serina e as proteínas quinases responsáveis pelas respectivas fosforilações. Círculo em azul representam fosforilação positiva, vermelho regulação negativa e combinados em azul e vermelho representam locais que podem ter tanto regulação positiva ou negativa. Círculos brancos a fosforilação ainda não é conhecida.



Fonte: Taniguchi; Emanuelli; Kahn (2006), com adaptações.

Os principais estudos com o IRS-1 versam sobre a sua relação com neoplasias, pois sua alta expressão influencia no desequilíbrio da proliferação celular devido a sua relação com a cascata MAPK (GIOVANNONE et al., 2000), e na ação celular da insulina, foco principal da presente pesquisa.

O papel do substrato IRS-1 na ação da insulina foi estudado primeiramente por Kanai et al. (1993) a partir da expressão, em uma linhagem celular, de um receptor de insulina

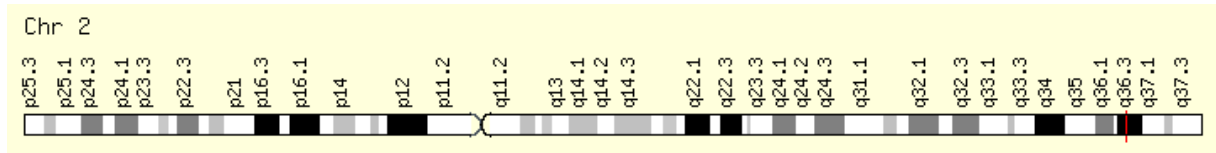
mutante em um sítio de tirosina. Os resultados desse experimento mostraram que a redução da fosforilação de IRS-1 diminuiu o transporte de GLUT-4 nessas linhagens, sugerindo uma associação na regulação dos genes IRS-1 e GLUT-4. No ano seguinte, Araki et al. (1994) publicaram que camundongos sem a expressão do gene *IRS1* apresentaram diminuição na captação de glicose e desenvolveram a resistência à insulina. Araújo et al. (2005) empregaram um oligonucleotídeo anti-sentido para inibir a expressão do IRS-1 em ratos Wistar o que resultou em redução de captação da glicose, aumento de insulina plasmática (hipersulinemia) e significativa redução na fosforilação em Akt.

Destacada a sua importância nesta via, observou-se em modelos animais e pessoas com DM2 que a redução na absorção da glicose está associada à baixa fosforilação em resíduos de tirosina (Tyr) de IRS-1 e por conseguinte baixa ativação de PI3K. Ainda, baixas quantidades de IRS-1 e diminuição na fosforilação de resíduos de tirosina nesse substrato foram observadas em 30% de parentes de primeiro grau de diabéticos tipo 2, indicando alto risco para o desencadeamento de DM2 (CESARETTI; KOHLMANN JUNIOR, 2006; GUAL; LE MARCHAND-BRUSTEL; TANTI, 2005; SALTIEL; KAHN, 2001b).

Uma linha de estudo mostra que a fosforilação irregular do IRS-1 em sítios de serina (Ser) e treonina (Thr) são responsáveis por defeitos na sinalização da insulina e resistência à insulina em tecidos periféricos (BRUMMER; SCHMITZ-PEIFFER; DALY, 2010; PAZ et al., 1997a). A hiperativação de Akt ou a hipersulinemia resulta na fosforilação em resíduos de serina do IRS-1 pela quinase P70S6, influenciando na redução da interação entre IRS-1/PI3K. (DRAZNIN, 2006). C-Jun NH2-terminal kinase (JNK), uma quinase ativada pelo estresse, promove a fosforilação do resíduo de serina 307, adjacente ao domínio PTB do IRS-1, interferindo na sua interação com o receptor da insulina e na fosforilação do resíduo de tirosina (BOURA-HALFON; ZICK, 2009).

2.4 GENE DO SUBSTRATO DO RECEPTOR DA INSULINA 1

O substrato IRS-1 é codificado pelo gene *IRS1* (sinônimo *HIRS*) que possui 74.474bp (anexo C) e está localizado no cromossomo 2q36.3 (localização molecular: 226,731,317 a 226,798,790) (figura 11). O gene possui dois éxons, no entanto, somente o éxon 1, com 3726 bp, é codificante (NISHIYAMA et al., 1994).

Figura 11 - Localização do gene *IRS1* no cromossomo 2 (barra vermelha)

Fonte: Ensemble, <http://www.ensembl.org>

Mutações nesses genes podem resultar em alterações na expressão ou estrutura tridimensional e funcional dessas proteínas e afetar a cascata de sinalização da insulina. As mutações mais comuns são aquelas que acometem uma única base em uma sequência de DNA, os denominados Variantes de Nucleotídeo Único (SNV) (DEN DUNNEN et al., 2016)⁴. Esses são muito frequentes no genoma humano e responsáveis por diversas doenças de base genética como a anemia falciforme e subtipos do quarto grupo de diabetes.

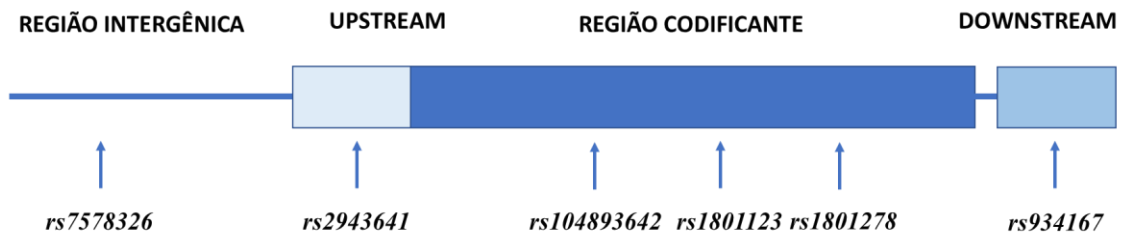
Estudos de associação entre variantes no gene *IRS1* e outros genes relacionados foram realizados por diferentes autores. A literatura reporta seis SNVs no gene *IRS1* associados ao desencadeamento da RI e DM2. Os estudos foram realizados em diferentes populações. Dados sobre esses variantes estão disponibilizados na tabela 3 enquanto a localização de cada sequência variante no éxon 1 do gene *IRS1* está representada na figura 12.

Tabela 3 - SNVs identificados no gene *IRS1* associados a resistência à insulina e Diabetes *Mellitus* tipo 2.

SNV	Localização no gene	Alelo de referência	Alelo variante	Citação
<i>rs2943641</i>	500kb upstream <i>IRS1</i>	T	C	Li et al. (2016) Mahmutovic et al. (2019) Rung et al. (2009)
<i>rs934167</i>	Downstream <i>IRS1</i>	C	T	Feng et al. (2013)
<i>rs1801123</i>	Sequência codificante	T	C	Feng et al. (2013)
<i>rs7578326</i>	Variante intergênica <i>IRS1</i>	A	G	Voight et al. (2010)
<i>rs104893642</i>	Sequência codificante	C	G	Esposito et al. (2003)
<i>rs1801278</i>	Sequência codificante	G	A	Burguete-Garcia et al. (2010) Kommoju et al. (2014) Li et al. (2016) Martínez-Gómez et al. (2011) Prudente et al. (2013) Szendroedi et al. (2014)

⁴ Seguindo recomendação disponibilizada pela *Human Genome Variation Society* (HGVS).

Figura 12: Localização dos SNVs identificados no gene *IRS1* associados a resistência à insulina e Diabetes *Mellitus* tipo 2.



O variante *rs2943641*, localizado próximo a região codificante do gene *IRS1*, foi associado à RI e DM2 em populações chinesas e caucasianas (LI et al., 2016). O mesmo resultado foi observado com populações francesas, dinamarquesas e finlandesas em estudo realizado por Rung et al. (2009), que associou o alelo mutante a níveis basais reduzidos de proteína IRS-1 e diminuição da atividade de PI3K em biópsias de músculo esquelético humano. Mahmutovic et al (2019) observou a associação desse variante com resistência à insulina na população da Bosnia e Herzegovina. Não há estudos sobre como esta alteração influencia a sinalização da insulina, sugerindo-se que sua localização, 500 kb *upstream* do gene, ocorra em sítio de regulação de genes.

Os variantes *rs934167* e *rs1801123* apresentaram forte associação com hiperglicemia e resistência à insulina em uma amostra de Porto Rico, mas sem associação significativa em pessoas com DM2 pesquisadas (FENG et al., 2013). No entanto, os autores dessa pesquisa discutem que estes resultados requerem a análise em outras populações, avaliando-se os fatores ambientais relacionados ao desencadeamento de DM2.

Dados de associação genômica em indivíduos europeus com DM2 identificou forte associação do variante *rs7578326*, indicando que esse pode elevar o risco para o desencadeamento de DM2 (VOIGHT et al., 2010).

O variante *rs104893642* foi identificado em pessoas com DM2, é um variante raro que substitui um resíduo de arginina por um de treonina no IRS-1 influenciando a ligação e ativação de PI3K e contribuindo para o aparecimento da resistência à insulina (ESPOSITO et al., 2003).

O variante *rs1801278* é a variante do gene *IRS1* mais seguramente associado ao risco e desencadeamento de DM2. Consiste em uma substituição de um resíduo de glicina para arginina na posição 971 do IRS-1. Apesar de sua alta frequência em pessoas com DM2, não há estudos na literatura sobre como este variante influencia na transdução do sinal da insulina

(BURGUETE-GARCIA et al., 2010; KOMMOJU et al., 2014; LI et al., 2016; MARTÍNEZ-GÓMEZ et al., 2011; PRUDENTE et al., 2013; SZENDROEDI et al., 2014).

Em todos os estudos sobre associação de variantes no gene *IRS1*, RI e DM2, discute-se a necessidade de replicar essas análises em outras populações, visando determinar marcadores genéticos que permitam triar pessoas com riscos para DM2.

2.5 SEQUENCIAMENTO E PCR-RFLP PARA O DIAGNÓSTICO MOLECULAR.

O sequenciamento do genoma humano associado a avanços biotecnológicos é uma relevante conquista para a compreensão de desordens de base genética. Um dos objetivos do Projeto Genoma Humano previa a possibilidade de usar o conhecimento gerado para a detecção de predisposição genética a doenças visando possível intervenção preventiva (VASSY; MEIGS, 2012). Essa “possibilidade” tornou-se uma realidade para a medicina preventiva. O diagnóstico molecular preditivo para doenças genéticas é ainda pouco valorizado na prática clínica, mas é indiscutível sua importância como ferramenta para ações de vigilância e prevenção, notadamente em doenças com alto custo de tratamento e passíveis de intervenções ainda antes do aparecimento dos primeiros sintomas clínicos.

O termo diagnóstico molecular, devido a sua amplitude, será direcionado neste trabalho ao genoma humano. Nesse contexto, designa técnicas de biologia molecular aplicadas para detectar marcadores de relevância diagnóstica e/ou prognóstica no genoma humano. Os marcadores mais estudados são aqueles associados a doenças genéticas (FARFÁN, 2015).

O diagnóstico molecular, ou teste genético, pode ser aplicado para confirmar uma doença genética em pessoas com sintomas clínicos ou estimar o risco futuro de uma condição genética em pessoas que ainda não apresentam sintomas, mas possuem familiares com a condição genética. Entre os benefícios, garante decisões terapêuticas direcionadas para aumento da sobrevivência (quando possível), a prevenção de complicações e o aconselhamento genético em famílias (FERRAZ-DE-SOUZA, 2015).

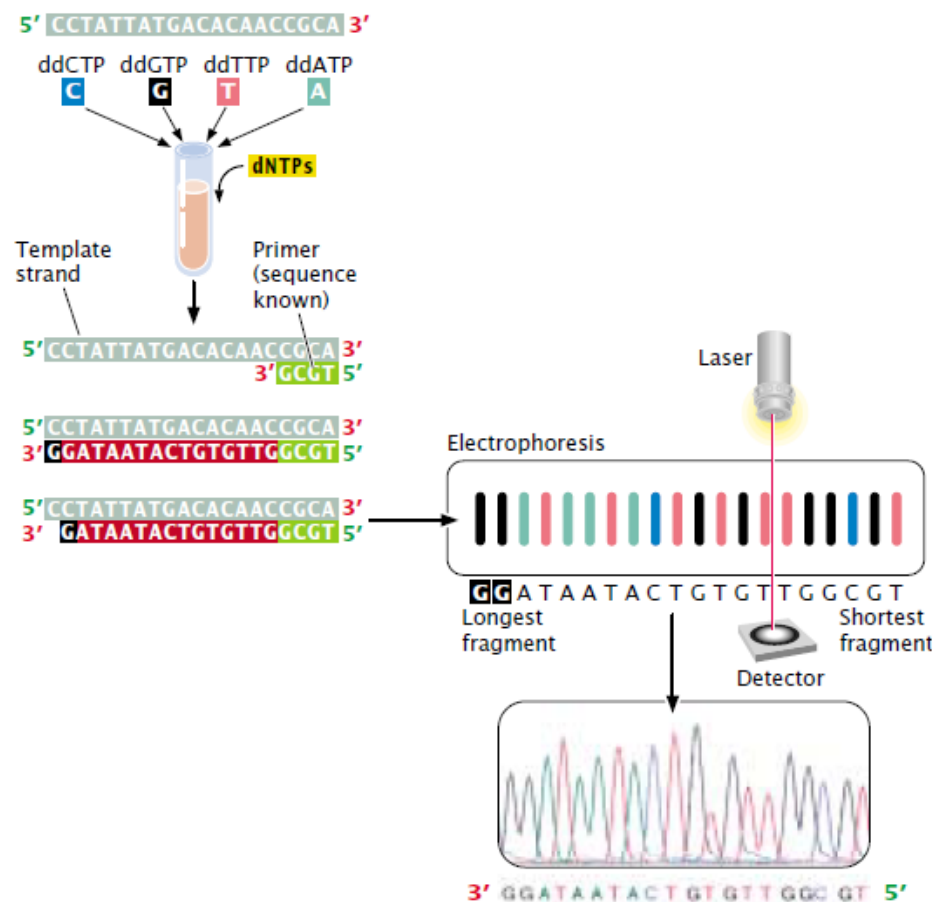
A realização do diagnóstico molecular processa-se a partir de modernas técnicas que possibilitam a identificação de mutações no genoma em genes associados a doenças genéticas.

O sequenciamento dideoxi ou sequenciamento de Sanger (Sanger e Coulson, 1977), devido sua versatilidade, é o método mais utilizado para a identificação de mutações em laboratórios de Biologia Molecular. Considerado padrão-ouro no diagnóstico molecular, garante com exatidão identificar mutações de um único nucleotídeo, deleções e inserções em sequências genômicas, previamente amplificada (CARVALHO, 2016). Essa técnica consiste

na adição de dideoxynucleotídeos (ddNTPs) em uma reação de síntese de sequências de DNA. A incorporação de ddNTPs interrompe a síntese da cadeia e gera sequências com diferentes comprimentos e terminações. A automatização do processo é garantida pelo uso de quatro ddNTPs fluorescentes (um para cada base nitrogenada do DNA), detectados pelo sistema óptico dos analisadores genéticos, e convertidos em um tipo de gráfico conhecido como eletroferograma, contendo as posições relativas das bases nitrogenadas em formas de picos coloridos (Figura 13) (RIDGWELL, 2004).

O impacto dessa tecnologia na Genética Médica é crescente e extrapola os limites da pesquisa científica, não só pelo seu reconhecido potencial diagnóstico e prognóstico, mas também por permitir a melhor compreensão sobre as doenças genéticas em benefício da saúde humana, com uso de novas abordagens terapêuticas em programas de assistência à saúde e futuramente na medicina personalizada (RABBANI; TEKIN; MAHDIEH, 2014; SMITH A, BOYCOTT KM, 2014).

Figura 13- Método sequenciamento dideoxi automatizado. Método que consiste na adição de dideoxynucleotídeos, que interrompem a síntese de uma sequência de DNA. O analisador genético identifica os dideoxynucleotídeos no final da cadeia interrompida e gera um eletroferograma registrando a sequência de bases da amostra em análise.



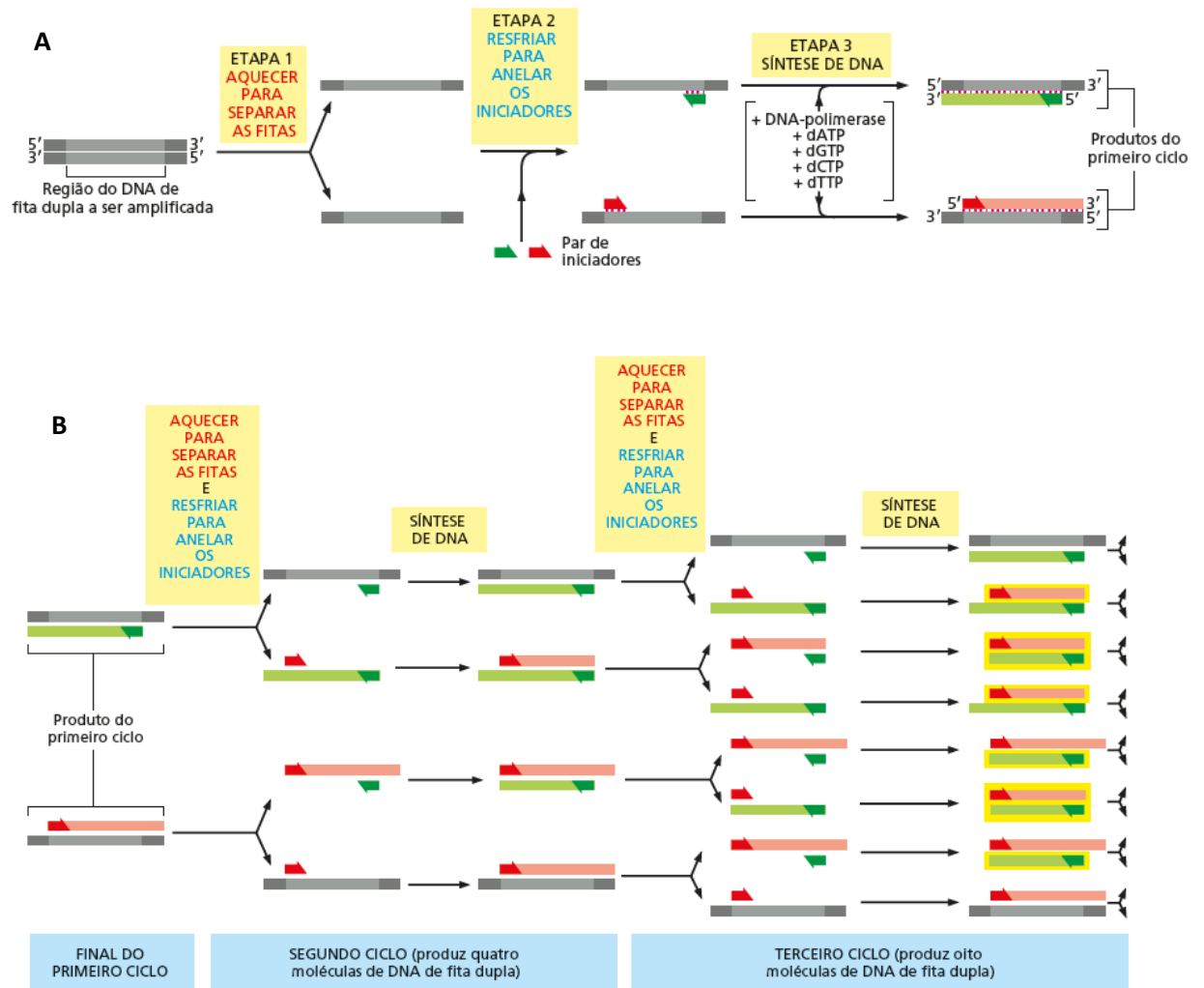
Fonte: Pierce (2016).

O sequenciamento de uma região de interesse do genoma é precedido pela técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR), desenvolvida por Mullis; Faloona (1987). Essa técnica, *in vitro*, é imprescindível ao diagnóstico molecular, pois permite à amplificação em milhares de cópias de uma região do genoma associada a uma determinada condição genética que se deseja analisar (VALONES et al., 2009).

A amplificação ocorre a partir do uso de um par de oligonucleotídeos, conhecidos também como *primers*, desenhados especialmente para a região que se deseja amplificar. Esses flanqueiam a região de interesse e a localizam dentro do genoma a partir da complementariedade de bases nessa região (MULLIS, 1990; SAIKI et al., 1988).

A PCR envolve três etapas básicas, reguladas a partir de temperaturas específicas em um determinado tempo: 1) desnaturação, onde as ligações de hidrogênio entre as bases nitrogenadas são rompidas à temperatura de 92 °C a 95 °C para separar os polinucleotídeos do DNA; 2) pareamento dos *primers*, momento em que os oligonucleotídeos desenhados irão se hibridizar com a região de interesse, em temperatura que pode variar de 50 °C a 60 °C; 3) extensão, etapa enzimática em que ocorre a síntese do novo polinucleotídeo a partir dos oligonucleotídeos e da sequência de bases do DNA que foi desnaturado. As etapas descritas formam um ciclo e a repetição dos ciclos, de 30 a 40 vezes, garante o aumento exponencial no número de cópias da região que se deseja analisar (MULLIS, 1990; NETTO; SAAD; DYSERT, 2003; RIDGWELL, 2004; SAIKI et al., 1988; VALONES et al., 2009).

Figura 14 - Esquema da técnica de PCR. (A) Cada ciclo de amplificação tem três etapas: (etapa 1) desnaturação do DNA genômico analisado, (etapa 2) anelamento do oligonucleotídeos sintetizados a região de interesse do genoma, e (etapa 3) síntese enzimática da região de interesse do DNA. (B) A repetição dos ciclos aumenta de forma exponencial o número de cópias da região de interesse.



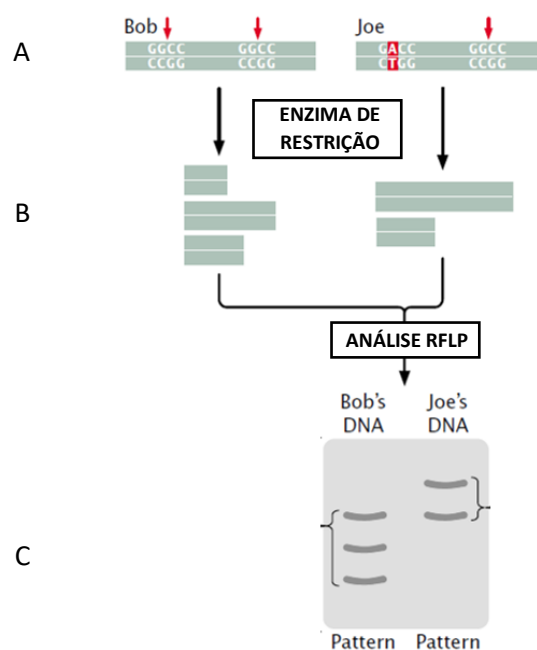
Fonte: Alberts et al. (2017)

Para o diagnóstico molecular em humanos, o produto da PCR (*amplicon*) pode ser sequenciado, como já discutido, ou analisado com uso da técnica de polimorfismos do comprimento dos fragmentos de restrição (RFLP).

A PCR-RFLP é muito utilizada em pesquisas para genotipagem e consiste na obtenção de fragmentos de diferentes tamanhos de um *amplicon*, a partir do uso de endonucleases de restrição, enzimas que clivam o DNA em sítios específicos (sítios de restrição). O resultado é um perfil de restrição que, no diagnóstico molecular, permite identificar a presença de mutação pontual na sequência de DNA em análise. Como a enzima reconhece sítios específicos, a mutação pode inserir ou eliminar tais sítios da região analisada e, portanto, mudar o padrão de um perfil de restrição. Dessa forma, o perfil de restrição obtido deve ser sempre comparado com os perfis previamente validados para indivíduos afetados ou não afetados (Figura 15) (CAIXETA, E.T.; OLIVEIRA, A.C.B.; BRITO, G.G.; SAKIYAMA, 2009).

Para o sucesso da PCR-RFLP, no diagnóstico molecular, deve-se conhecer a sequência em análise, a mutação que causa a condição genética e a enzima de restrição adequada para a obtenção dos perfis de restrição (FARFÁN, 2015).

Figura 15 - Esquema da técnica de PCR-RFLP na identificação de variante de base única em um *amplicon*. (A) Por meio da PCR, obteve-se o *amplicon* de Bob e Joe. (B) Os *amplicons* foram tratados com enzimas de restrição. (B) A endonuclease de restrição clivou o *amplicon* de Bob, mas não clivou o *amplicon* de Joe devido a presença de uma mutação de ponto que alterou o sítio de restrição da endonuclease. (C) O padrão de restrição de Bob revelou a presença de três bandas (sem mutação) e o de Joe, duas bandas (com mutação).

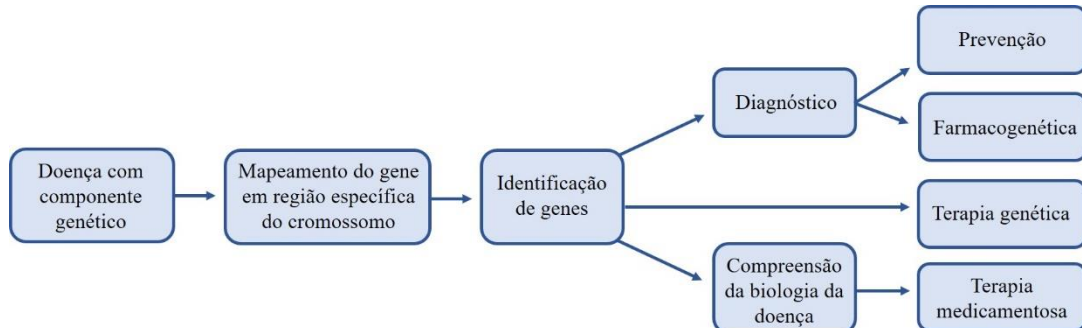


Fonte: Pierce (2016), com modificações.

Avanços recentes trouxeram o sequenciamento massivo ou de alta demanda (*Next Generation Sequencing* - NGS) que permite sequenciar rapidamente genomas inteiros a custos reduzidos. É a tecnologia aplicada no sequenciamento completo do exoma humano, que permite determinar variações, comuns e raras, em todas as regiões codificadoras (éxons) de um genoma. Algumas dessas variações possuem importância clínica, podendo desencadear distúrbios genéticos em humanos (POON; TAN; KOAY, 2015).

Outras técnicas podem ser aplicadas ao diagnóstico genético em humanos. A escolha da técnica deve considerar o tipo de alteração genética que se deseja identificar. Segundo Farfán (2015), o campo do diagnóstico molecular apresentou um excelente crescimento nos últimos anos. Para aumentar a disponibilidade de testes genéticos na área médica, é preciso o investimento em pesquisas que busquem a identificação de mutações patogênicas e sua respectiva associação a uma doença genética. É importante também reconhecer o impacto dessa mutação na função da proteína envolvida. Esse conhecimento auxilia na terapêutica adequada, prevenção, melhor conhecimento da farmacogenética e busca de novos fármacos para o controle da doença (Figura 16) (NETTO; SAAD; DYSERT, 2003).

Figura 16 - Etapas da abordagem investigativa para o diagnóstico e tratamento de doenças genéticas.



Fonte: Netto; Saad; Dysert (2003), com modificações.

Prever se e quando um indivíduo vai desenvolver a DM2 é um dos principais desafios da endocrinologia contemporânea. O estudo de genes que contribuam para o desenvolvimento de testes para diagnóstico molecular da DM2 é relevante no contexto da medicina preventiva e individualizada (DERAKHSHAN et al., 2015; GIL; VALERO, 2017). A identificação precoce de indivíduos com alto risco para a DM2 pode prevenir ou retardar o aparecimento da condição com mudanças no estilo de vida e intervenções farmacológicas (HU; JIA, 2018; VASSY; MEIGS, 2012).

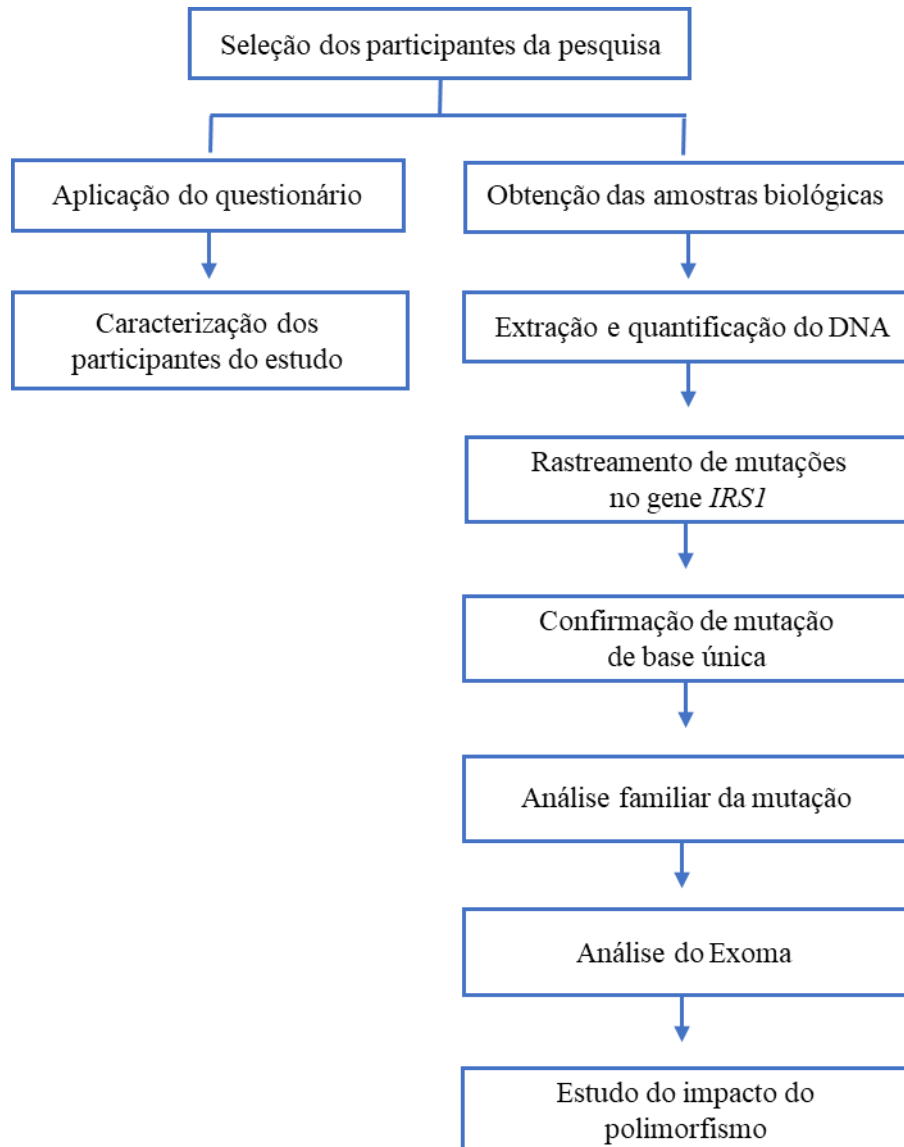
A biologia molecular se instalou no campo da prática clínica e, mesmo com limitações devido especialmente ao alto custo, são notórias as vantagens das técnicas

moleculares em relação às técnicas clássicas. Há a necessidade de se implementar o serviço de diagnóstico molecular no sistema de saúde pública para que esta ferramenta importante esteja acessível à equipe de saúde e pacientes e cujo uso em médio e longo prazo fornecerá um perfil do *background* genético da população o que permitirá melhorar o grau de acerto de ferramentas preditivas como o FINDRISC (FARFÁN, 2015).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

A análise do éxon 1 do gene *IRS1*, em pessoas com Diabetes *Mellitus* tipo 2, para a identificação e estudo de variantes de riscos foi executada de acordo com as etapas descritas no fluxograma a seguir (Figura 17):

Figura 17 – Fluxograma com as principais etapas da pesquisa.



3.1 OBTENÇÃO DA POPULAÇÃO

A pesquisa foi autorizada pela Secretaria Municipal de Saúde (SEMSA), ofício no. 41/2016 – GESAU⁵/SEMSA (Anexo A) e aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Amazonas (UFAM) sob o CAAE⁶ 60172416.8.0000.5020, em 15 de dezembro de 2016 (Anexo B).

A população foi composta no período de fevereiro a dezembro de 2017 e incluiu pessoas com diagnóstico clínico e laboratorial confirmado para Diabetes *Mellitus* tipo 2 (DM2)⁷, excluindo-se indivíduos menores de 18 anos e/ou com etnia indígena, pois esses possuem peculiaridades que não abrangem o escopo da pesquisa. Todos os participantes estavam em acompanhamento clínico com médico endocrinologista, glicemia controlada por uso de medicamentos e recrutados em consulta de rotina na Policlínica Raimundo Franco de Sá, localizada no bairro Nova Esperança na cidade de Manaus, Amazonas. A aceitação para participar da pesquisa foi devidamente documentada com assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Apêndice A) após os devidos esclarecimentos.

3.2 CARACTERIZAÇÃO DA POPULAÇÃO

Os pacientes incluídos na pesquisa responderam a um questionário com perguntas simples, aplicado logo após a consulta médica. Foram coletadas informações sobre o perfil sociodemográfico (gênero, faixa etária, escolaridade), anamnese, tratamento (antidiabéticos orais e insulina), comorbidades (hipertensão, dislipidemia e índice de massa corpórea⁸), complicações clínicas (oftalmológicas, cardíacas, renais, amputações, acidente vascular encefálico) e variáveis comportamentais (uso de tabaco, álcool, alimentação e prática de atividade física) associadas a DM2.

Para o conhecimento sobre a agregação familiar, foram obtidos dados sobre o histórico familiar para DM2, sendo considerados familiares de 1º. grau (pais e irmãos) e 2º. grau (avós, tios e primos). O instrumento aplicado para a obtenção de dados foi elaborado, com adaptações, a partir do FINDRISC (*Finnish Diabetes Risk Score*) (Apêndice B).

Os dados obtidos foram organizados em planilha no Excel[®], apresentados de forma tabular, analisados por estatística descritiva e as variáveis apresentadas por meio de frequência

⁵ GESAU - Gerência de Gestão da Educação na Saúde

⁶ CAAE - Certificado de Apresentação para Apreciação Ética

⁷ De acordo com os critérios estabelecidos pela Associação Americana de Diabetes (ADA) e recomendados pelas diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes (SBD).

⁸ Parâmetros estabelecidos de acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), sendo: 18,5 – 24,9: normal; 25 – 29,9: sobrepeso; ≥ 30 : obeso.

absoluta e percentual simples. Para identificar associações entre variáveis, aplicou-se o teste Qui-quadrado de Pearson (χ^2). Os dados foram processados no software IBM SPSS versão 19.0.

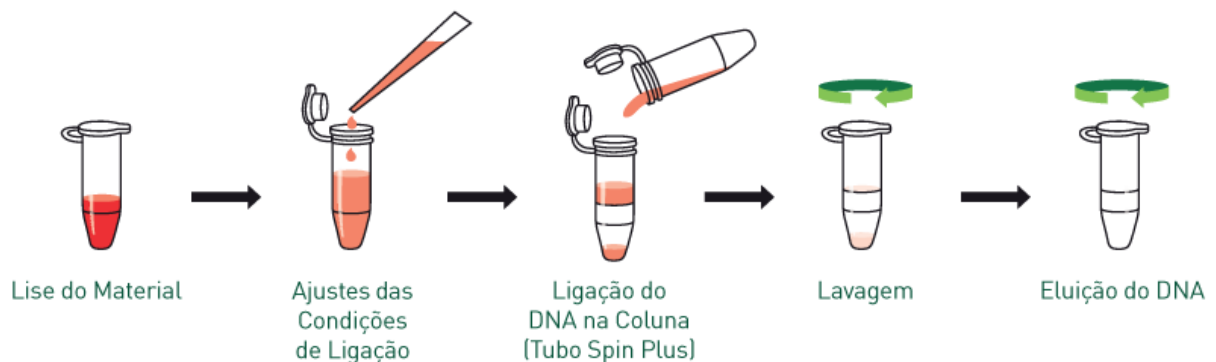
3.3 COLETA DAS AMOSTRAS BIOLÓGICAS

Para a obtenção do DNA, foi coletado, com o uso de seringas e agulhas estéreis, 1 mL de sangue venoso periférico, distribuído em volume de 200 μ L em microtubos. Imediatamente após a coleta de sangue, essas amostras foram mantidas em baixa temperatura até seu processamento no laboratório de Diagnóstico Molecular, localizado no setor sul, bloco M da UFAM. Todas as amostras biológicas coletadas foram identificadas por um código numérico, mantendo-se sigilo sobre os dados coletados, conforme preconizado pelas normativas estabelecidas pelo Comitê de Ética em Pesquisa.

3.4 EXTRAÇÃO DO DNA GENÔMICO

Alíquotas de 200 μ L do sangue venoso foram processadas para a extração de DNA com o Kit de Extração de DNA Mini Spin – modelo K9-0050 (KASVI), seguindo as recomendações do fabricante (Figura 18).

Figura 18 - Etapas de extração de DNA Mini Spin (Kasvi) - Tecnologia de membrana de sílica em coluna Spin.



Fonte: <http://kasvi.com.br/a-extracao-de-dna>, disponível em 14/08/2018.

O DNA extraído foi analisado em (1) eletroforese em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio (0,5 μ g/mL), para verificar a integridade e estimativa da concentração (quantificação); (2) espectrofotômetro NanoDrop® 2000c nos comprimentos de onda de 230, 260 e 280 nm, onde os parâmetros 260/280 nm e 260/230 nm determinarão o grau de pureza da amostra, e (3) Qubit Fluorometric Quantitation para a determinação precisa da concentração do

material genético. A migração em gel de agarose foi registrada em fotodocumentador Quantum Vilber Lourmat equipado com transluminador UV.

3.5 ANÁLISE DO ÉXON 1 DO GENE *IRS1*

Para a análise do éxon 1 do gene *IRS1* foram desenhados e sintetizados oligonucleotídeos (tabela 4 e figura 19) estabelecidos com a ferramenta *PrimerQuest* (*Integrated DNA Technologies, Inc.*) a partir da região codificante da sequência de referência do gene *IRS1* de *Homo sapiens*, disponível na plataforma *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), com acesso NG_015830.1 (Anexo C). A validação *in silico* dos oligonucleotídeos desenhados foi realizada com a ferramenta *online Oligoanalyser* (*Integrated DNA Technologies, Inc.*) utilizando como parâmetro o valor mínimo do ΔG (energia livre) para estruturas secundárias (*hairpin*), homodímero e heterodímero de ≤ -5 , a fim de excluir possíveis artefatos.

Tabela 4 - Oligonucleotídeos desenhados e sintetizados para a análise do éxon 1 do gene *IRS1*.

Oligonucleotídeos	Start	Stop	Tm (oC)
FW 1 – GTTTCTGCTGCCTCCA	1	17	60
FW 2 – AAGACCATCAGCTTCGTG	700	718	58
FW 3 – AGTTCCTTCCGCAGTGTCA	1450	1469	62
FW 6 – CCTTGCACAGGTGACTACAT	2301	2321	62
RV 1 – TGTGCCCTGAGAATGTAAGT	3999	4019	60
RV 2 – AGGCTGCTGAGGATGAG	3237	3254	59
RV 3 – CTGGTGGAAGAGGAAGAATC	2548	2568	58
RV 4 – GGACTGGAGCCATACTCAT	1408	1427	60
RV 5 – CCACCTCGATGAAGAAGAAG	779	799	59

Figura 19 - Localização de anelamento dos oligonucleotídeos desenhados para a análise do éxon 1 do gene *IRS1*.



A amplificação do éxon 1 do gene *IRS1* processou-se com o conjunto de reagentes *Platinum™ Taq DNA polimerase High Fidelity* (HF) (Invitrogen by Thermo), usando o par de *primers* FW1 e RV1 (tabela 4) e seguindo o protocolo de reação otimizado apresentado na

tabela 5. A ciclagem da PCR foi programada em termociclador ProFlex-PCR System (Applied Biosystems by Thermo) e constou de uma desnaturação inicial a 95 °C por 3 min, seguido de 30 ciclos a 95 °C por 30 segundos, 58 °C por 30 segundos, 68 °C por 4 minutos, seguido de extensão final por 10 minutos a 68 °C. O resultado da amplificação foi avaliado em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio (0,5 µg/mL). Obteve-se um fragmento com 4020 bp.

Tabela 5 - Concentração final dos reagentes utilizados na PCR otimizada para o par de oligonucleotídeos FW1 e RV1.

Componente	Concentração final 25µL de reação
H ₂ O ultrapura	q.s.p
Tampão (10 x)	1X
dNTP (10 mM)	0,2 mM de cada
Oligonucleotídeo FW1 (10 µM)	0,2 µM
Oligonucleotídeo RV1 (10 µM)	0,2 µM
Taq polimerase High Fidelity (5 U/µL)	1 U/reação
MgSO ₄ (50 mM)	1,5 mM
DNA molde (10 ng/µL)	50 ng
DMSO (10 x)	1X

dNTP - Desoxirribonucleotídeos trifosfatados; MgSO₄ – sulfato de magnésio; DMSO - dimetil sulfóxido; q.s.p – quantidade suficiente para.

Para o melhor aproveitamento do sequenciamento do éxon 1 do gene *IRS1* foi empregada a técnica de Semi *Nested* PCR (SN-PCR), realizando-se separadamente reações de PCR com os pares de *primers* FW1/RV3 e FW3/RV1 (tabela 4) a partir de 2 µL do produto da primeira PCR com as mesmas concentrações dos reagentes descrito na tabela 5. A ciclagem seguiu as etapas supracitadas, alterando-se o tempo de extensão para 2min30s. Obteve-se *amplicons* de 2557 bp para o par FW1/RV3 e 2569 bp para o par FW3/RV1 (Figura 20). Os *amplicons* foram purificados com *PureLink® PCR Purification Kit* (Figura 21), quantificados com *Qubit Fluorometric Quantitation*.

Figura 20 –Esquema da Semi-Nested PCR utilizada para o sequenciamento do éxon 1 do gene *IRSI*.

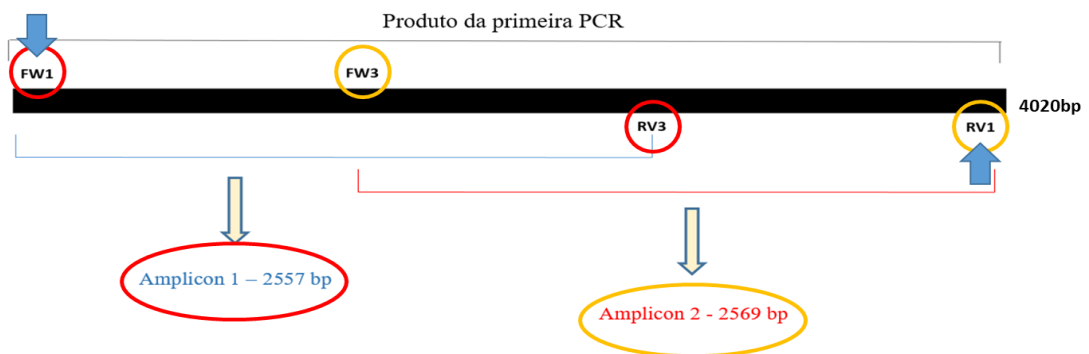
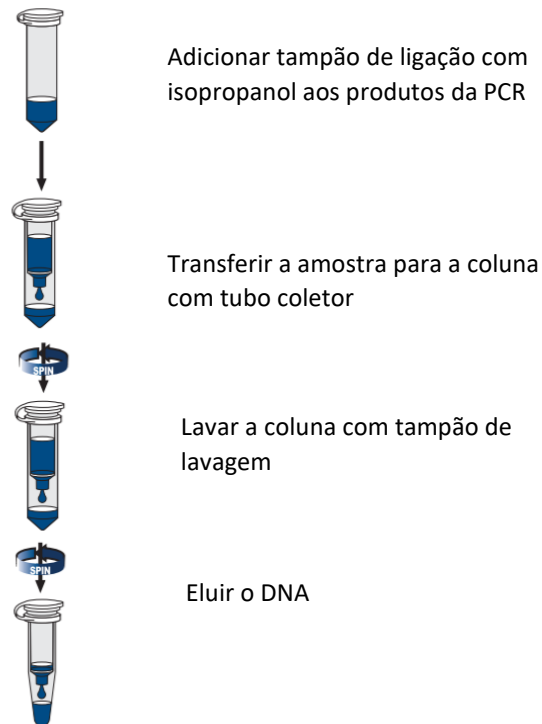


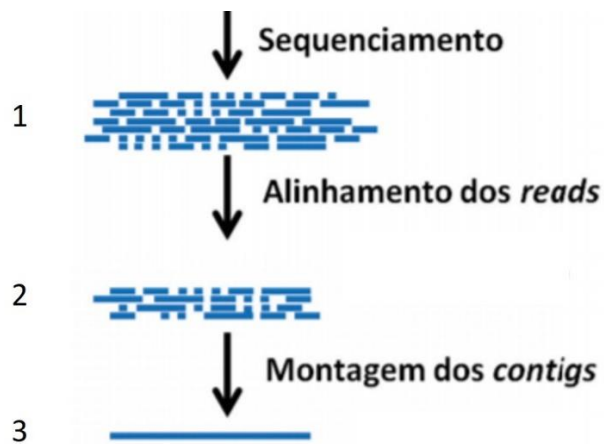
Figura 21 – Etapas para purificar produtos de PCR usando o PureLink® PCR Purification Kit, conforme indicação do fabricante.



Fonte: <https://www.thermofisher.com>, acesso em 16/08/2018

Para o sequenciamento do éxon 1 do gene *IRSI*, foram usados todos os oligonucleotídeos desenhados para a presente análise (tabela 4). Essa estratégia garantiu a obtenção de fragmentos (*reads*) com sobreposição mínima (> 10 bp) das extremidades para alinhamento e a formação de *contigs*, isto é, a obtenção da sequência completa do gene *IRSI* (Figura 22).

Figura 22 – Estratégia para a obtenção da sequência completa do gene *IRSI*. Será realizado o sequenciamento com oligonucleotídeos externos e internos para a obtenção de *reads* (1) que serão alinhadas em regiões de sobreposição (2) para a formação de *contigs* (3).



Fonte: Moreira (2015) com adaptações.

O sequenciamento processou-se com o conjunto de reagentes BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystems™ by Life Technologies, Foster City, CA, USA). A reação de sequenciamento foi realizada com volume final de 10 μL , sendo 0,5 μL de BigDye, 1,75 μL de tampão de sequenciamento (5X), 1 μL do produto da PCR (25 ng) e 1 μL do oligonucleotídeo (2,5 μM) e água ultrapura (q.s.p). A reação foi colocada em termociclador ProFlex-PCR System (Applied Biosystems by Thermo), nas seguintes condições: 96 °C 1 minuto, seguido de 35 ciclos a 95 °C 15 segundos, 56 °C 15 segundos, 60 °C 2 minutos. Para a precipitação das reações de sequenciamento, foram adicionados 4 μL da solução NG (1mg.mL⁻¹ de glicogênio dissolvido em 5 M NH₄OAc) e 40 μL de etanol absoluto homogeneizando-os em vórtex e, em seguida, mantendo-os a -20 °C por no mínimo 30 min. A placa com o material foi centrifugada por 40 min a 4.400 rpm em centrífuga de bancada com rotor de placas (Thermo Scientific: Heraeus Megafuge 8R). O sobrenadante foi desprezado por inversão e a placa foi submetida a um *spin* invertido de 300 rpm. O precipitado foi lavado duas vezes com 110 μL de etanol 70% (Merck), a primeira lavagem com uma centrifugação de 20 min a 4.400 rpm, descarte do sobrenadante por inversão e *spin* e a segunda lavagem com uma centrifugação de 5 min a 4.400 rpm e descarte do sobrenadante com inversão e *spin*. Para evaporação do etanol residual, a placa permaneceu em temperatura ambiente por 5 minutos. O material foi ressuspendido em 10 μL de formamida ultrapura (Merck) e as amostras injetadas em um analisador genético por eletroforese capilar modelo ABI 3500 (Applied Biosystems) para a determinação das sequências.

As sequências obtidas foram analisadas e editadas utilizando-se a ferramenta Lasergene® SeqMan™ Pro para Windows (DNASTAR®) e comparadas com o banco de DNA genômico humano do GenBank, usando a ferramenta “Basic Local Alignment Search Tool” BLASTN (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) (ALTSCHUL et al, 1990)

As mutações identificadas na análise foram apuradas quanto à associação com a DM2, a partir da literatura científica disponível em plataformas de acesso a publicações científicas da área biomédica.

3.6 CONFIRMAÇÃO DO VARIANTE *rs1801278*

O rastreamento do éxon 1 do gene *IRS1* revelou a presença do variante *rs1801278* selecionado, na presente pesquisa, para o estudo da análise de risco no desencadeamento da DM2.

A ocorrência do variante *rs1801278* foi confirmado pela técnica de polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição (RFLP). A seleção da enzima de restrição ideal para a identificação do variante de base única em estudo foi realizada com a ferramenta NebCutter, disponível em <http://nc2.neb.com/NEBcutter2/> (VINCZE et al. 2003).

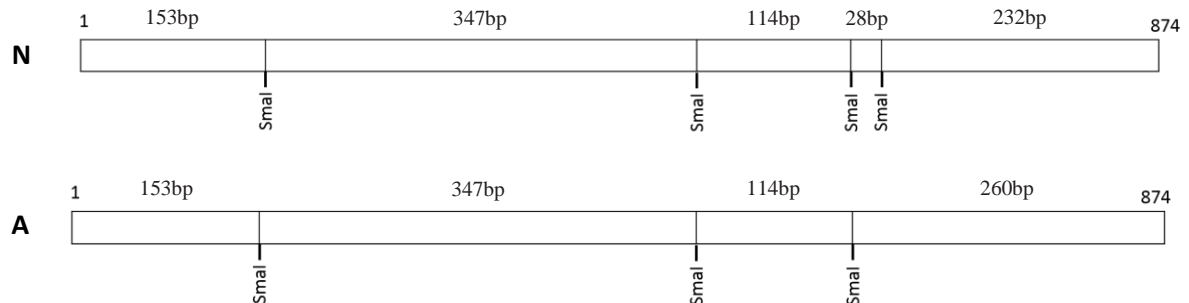
Um *amplicon* de 874bp foi obtido com o uso dos *primers* FW3 e RV2 (tabela 4) e submetido ao tratamento com a enzima de restrição *SmaI* (CCC[^]GGG) (Thermo Fisher Cientific) por 2h a 37 °C. A reação processou-se em volume final de 10 µL, sendo 5 µL de DNA (250-500ng), 2 µL de buffer (10X), 0,2 µL de BSA⁹ (100X), 0,5 µL de *SmaI* (2000 U) e água ultrapura (q.s.p).

Para a análise do padrão de restrição, digeriu-se uma amostra controle (sem mutação, confirmada pelo sequenciamento) e a amostra 12 da presente pesquisa (com a mutação). O padrão da digestão foi analisado em gel de agarose 2%, corado com brometo de etídio 0,5µg/mL e analisado em um fotodocumentador (Quantum Vilber Lourmat) equipado com transluminador UV.

Quando digerido com a enzima de restrição *SmaI*, o *amplicon* sem a mutação gera cinco fragmentos de restrição: 153bp, 347bp, 114bp, 28bp, 232bp (figura 23-N). No *amplicon* com mutação, a alteração excluiu sítio de restrição na posição 732, gerando assim quatro fragmentos de restrição: 153bp, 347bp, 114bp, 260bp (figura 23-A). O padrão de digestão para o indivíduo heterozigoto para o variante *rs1801278* apresenta os fragmentos de restrição 347bp, 260bp, 232bp, 153bp, 114bp e 28bp.

⁹ BSA: recomendado para a amplificação de fragmentos com alta frequência de GC.

Figura 23: Mapa do *amplicon* após a digestão com identificação dos sítios de restrição para *Sma*I. **N** – Mapa de restrição do *amplicon* sem a mutação, observando-se a obtenção de cinco fragmentos (347bp, 232bp, 153bp, 114bp e 28bp); **A** – Mapa de restrição do *amplicon* com a mutação (347bp, 260bp, 153bp, 114bp). Indivíduos heterozigotos apresentam fragmentos referentes ao padrão normal e ao padrão com mutação.



3.7 ANÁLISE FAMILIAR DO VARIANTE *rs1801278*.

A análise familiar do variante *rs1801278* realizou-se a partir da investigação genética em membros da família de um indivíduo (P12) portador do sequência variante identificada na etapa de rastreio inicial no gene *IRS1*. Para essa análise utilizou-se a técnica de PCR-RFLP, padronizada e validada conforme descrito no item 4.6, específica e eficiente na identificação do variante *rs1801278*. Os resultados obtidos na análise familiar foram organizados em heredograma construído com o programa Progeny Free Online Pedigree Tool (© 2015. Progeny Genetics disponível em <https://www.progenygenetics.com/>).

3.8 SEQUENCIAMENTO DO EXOMA

Para o entendimento do valor aditivo do variante *rs1801278*, processou-se a busca de sequências variantes de base única em genes relacionados a via de sinalização da insulina em tecidos periféricos: *INSR*, *IRS1*, *IRS2*, *IRS3*, *IRS4*, *PI3KR1*, *TBC1D4*, *SLC2A4* (tabela 6). Para essa análise, obteve-se o sequenciamento total do exoma do indivíduo P12 com uso da plataforma IlluminaHiSeq 2000 (Sigma-Aldrich Corporation®, Missouri, EUA) da GenOne Biotechnologies.

Tabela 6: Genes analisados nos dados obtidos pelo sequenciamento do exoma cujos produtos participam da via de sinalização da insulina.

Genes	Localização	Produto do gene
<i>INSR</i>	19p13.2	Receptor da insulina (IR)
<i>IRS1</i>	2q36.3	Substrato do receptor da insulina 1 (IRS-1)
<i>IRS2</i>	13q34	Substrato do receptor da insulina 2 (IRS-2)
<i>IRS3</i>	7q22.3	Substrato do receptor da insulina 3 (IRS-3)
<i>IRS4</i>	Xq22.3	Substrato do receptor da insulina 4 (IRS-4)
<i>PIK3R1</i>	5q13.1	Fosfatidilinositol-3'-OH quinase (PI3K)
<i>TBC1D4</i>	13q22.2	proteína quinase B Akt (PKB/Akt)
<i>SLC2A4</i>	17p13	transportador de glicose 4 (GLUT 4)

As sequências (*reads*) foram mapeadas de acordo com o genoma humano de referência GRCh37. Para a filtragem, excluiu-se variáveis em regiões intergênicas, intrônicas e não traduzidas (UTR), variáveis de mutações sinônimas e variáveis com índice menor que 20. Possíveis impactos das variáveis selecionadas foram previstas com as ferramentas Polyphen2 (Polymorphism Phenotyping v2) (ADZHUBEI et al., 2010; ADZHUBEI; JORDAN; SUNYAEV, 2013) e SIFT (Sorting Intolerant From Tolerant) (VASER et al., 2016). Esses algoritmos são utilizados para prever o efeito que a substituição de aminoácidos pode causar na estrutura e função de uma proteína humana, utilizando análises evolutivas estruturais e comparativas. A análise gera uma pontuação (score) que varia de 0.0 a 1.0. No Polyphen2 variantes com pontuações de 0,0 a 0,15 são consideradas benignas, enquanto variantes com valores acima de 0,15 são preditas como prejudiciais. Para o SIFT, variantes de 0,0 a 0,05 são consideradas deletérias, enquanto variantes acima de 0,005 são consideradas toleráveis.

3.9 MODELAGEM MOLECULAR

Para a análise do impacto do variante *rs1801278*, na estrutura do substrato IRS-1 e sua interação com PI3K, foi realizada a modelagem molecular por homologia e modelagem do complexo IRS-1/PI3K.

As sequências de aminoácidos de IRS-1 selvagem e IRS-1 mutante foram submetidas ao servidor I-TASSER (YANG et al., 2014; YANG; ZHANG, 2015) para previsão da sua estrutura terciária com auxílio do programa LOMETS (SIEVERS et al., 2011). A estrutura tridimensional teórica de IRS-1 selvagem e mutante foram baseadas no molde 2NBIA. As estruturas foram refinadas pelo programa ModRefiner (XU; ZHANG, 2011) e sua qualidade

estereoquímica foi examinada usando o PROCHECK (LASKOWSKI et al., 1993). As proteínas foram visualizadas no programa MOE (MOE., 2015).

Antes dos procedimentos de ancoramento molecular, foi feita uma fosforilação no aminoácido Ser⁹⁷⁴ da sequência de IRS-1 mutante. A sequência de IRS-1 selvagem sem fosforilação também foi utilizada no ancoramento para efeitos de comparação neste estudo. As moléculas de IRS-1 foram ancoradas com o domínio SH2 da subunidade p85 de PI3K obtida no Protein Data Bank (PDB ID: 2IUG). O docking molecular proteína-proteína foi realizado com auxílio do programa MOE pelo método de proteína rígida com pós-refinamento, usando o Algoritmo Genético para determinar as melhores pontuações (scores). Os resultados gerados pelo docking foram processados e a solução mais favorável (pose) foi selecionada com base na sua conformação e interações intermoleculares. A análise dos resultados do docking selecionado de IRS-1 selvagem e mutante foi realizada no programa MOE, visando identificar o número de ligações de hidrogênio e suas distâncias, assim como outras possíveis interações intermoleculares proteína-proteína.

3.10 ESTUDO DO IMPACTO DO VARIANTE *rs1801278* NA TRANSDUÇÃO DO SINAL INSULÍNICO.

O impacto do variante *rs1801278* em sítios de fosforilação do substrato IRS-1 foi também analisado na presente pesquisa.

A predição de sítios de fosforilação foi verificada com o programa NetPhos 3.1 Server (disponível em <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>) (BLOM; GAMMELTOFT; BRUNAK, 1999), comparando-se a sequência do substrato IRS-1 selvagem e mutante.

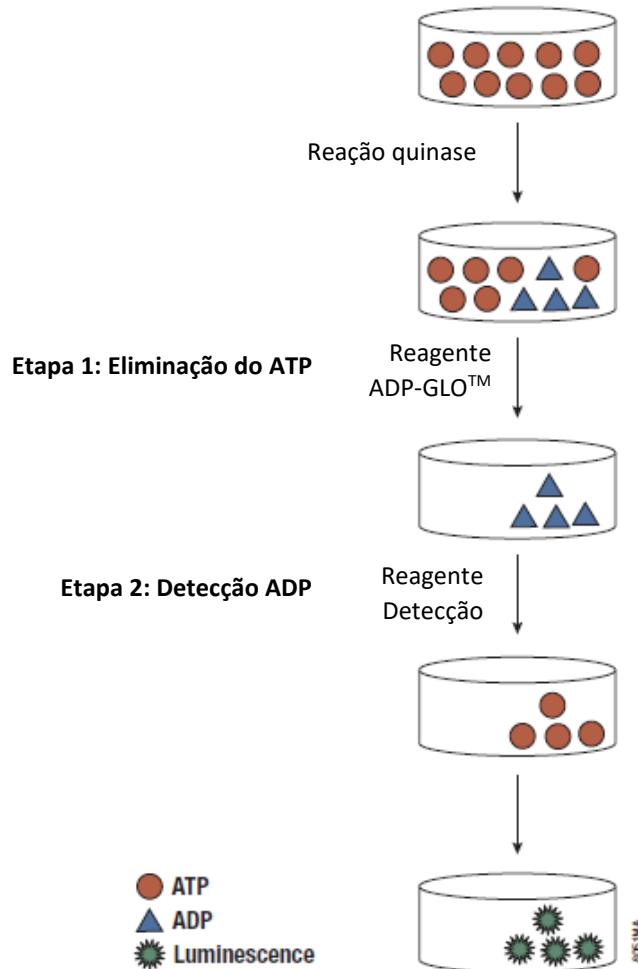
Para o teste de fosforilação *in vitro*, foram sintetizados dois peptídeos com quinze aminoácidos (GenOne Biotechnologies), incluindo o aminoácido 971 e a serina 974 do substrato IRS-1, sendo um peptídeo com a sequência selvagem (971G) e outro com a sequência mutante (971R) (tabela 7). A reação de fosforilação processou-se com PKA Kinase Enzyme System (PROMEGA Corporation) em volume final de 25 µL, sendo 5 µL de buffer 5X, 0,5 µL de DTT (100mM), 1 µL de ATP (100 µM), 5 µL de PKA (0,5U), 5 µg de peptídeo (colocados em tubos separados) e água ultrapura (q.s.p). A verificação da fosforilação foi feita com o uso do KIT ADP-Glo™ Kinase Assay seguindo as instruções do fabricante (figura 24). Utilizou-se como controle positivo o peptídeo kemptide [LRRASLG] e como controle negativo amostra sem peptídeo. Todas as amostras foram analisadas em quadruplicatas. A luminescência emitida foi determinada em GloMax® 20/20 Luminometer (PROMEGA Corporation), com tempo de

1 sec. Essa leitura foi realizada na Plataforma de Bioensaios da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ).

Tabela 7: Sequência dos peptídeos IRS-1 selvagem e mutante sintetizados para a presente pesquisa. Observa-se na posição 971 uma mutação missense entre os peptídeos selvagem e mutante e na posição 974 uma serina.

PEPTÍDEOS	SEQUÊNCIA PEPTÍDEOS	
	971	974
Seq1 - Selvagem	[H] - P A P P G A A S I C R P T R A - [O H]	
Seq2 - Mutante	[H] - P A P P R A A S I C R P T R A - [O H]	

Figura 24: Princípio do KIT ADP-Glo™ Kinase Assay (Promega Corporation). O ensaio é realizado em duas etapas: 1) após a reação de fosforilação, é adicionado o reagente ADP-Glo™ para interrupção da reação de fosforilação e eliminação do ATP restante; 2) Em seguida, o reagente de detecção de quinase é adicionado para converter ADP em ATP. O ATP recém-sintetizado será medido pela reação luciferase/luciferina. A luz emitida na reação da luciferase é proporcional a quantidade de ADP gerado na reação de fosforilação.



Fonte: Promega Corporation

4. RESULTADOS

4.1 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA

Participaram da pesquisa 53 pessoas com diagnóstico confirmado de Diabetes *Mellitus* Tipo 2, com maior prevalência do sexo feminino (68,5%). A média de idade foi $61,11 \pm 14,573$ sendo a faixa etária predominante de 65 a 74 anos de idade (28,3%) (figura 25). Quanto a escolaridade, o ensino fundamental incompleto (34%) foi o de maior prevalência na amostra (Figura 26). O tempo de diagnóstico para DM2 teve média de $9,124 \pm 9,3120$ anos, sendo o de maior frequência o período correspondente de 6 meses a 5 anos (49,1%) (Figura 27).

Figura 25: Distribuição dos participantes da pesquisa por classes de faixa etária.

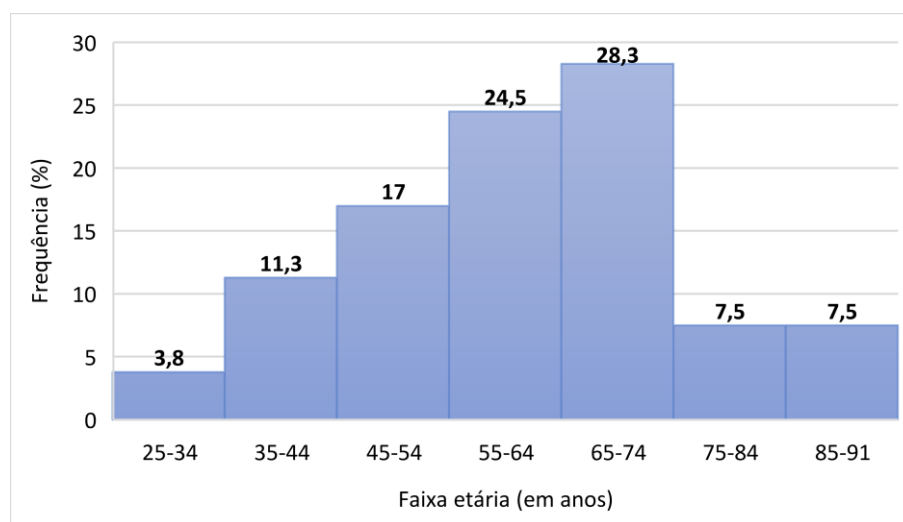
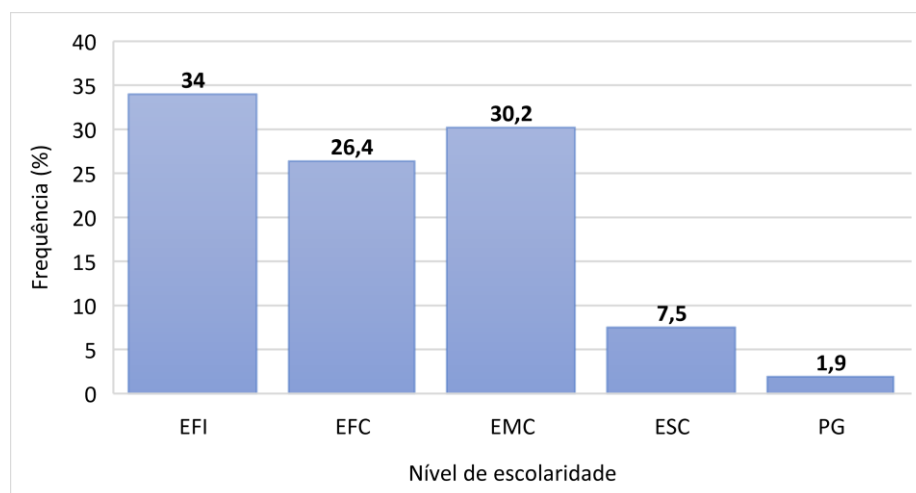
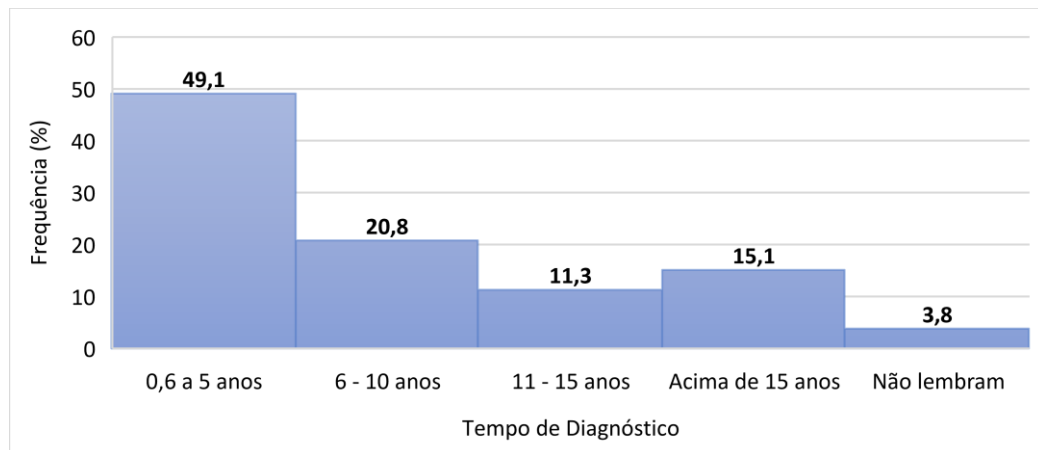


Figura 26: Distribuição dos participantes da pesquisa de acordo com a escolaridade.



EFI – Ensino Fundamental Incompleto; EFC – Ensino Fundamental Completo; EMC – Ensino Médio Completo; ESC – Ensino Superior Completo; PG – Pós-Graduação.

Figura 27: Distribuição dos participantes da pesquisa de acordo com o tempo de diagnóstico para DM2.



Quanto às comorbidades, observou-se que 62,3% dos indivíduos que compõem a amostra possuíam hipertensão arterial e 47,2% dislipidemia. Identificou-se 35,8% com sobrepeso e 43,4% com obesidade (figura 28). Com relação a complicações associadas à DM2, verificou-se 73,6% com complicações oftalmológicas, 26,4% com complicações cardíacas, 20,8% com complicações renais, 1,9% com amputações de membros inferiores e 13,5% relataram acidente vascular encefálico (AVE) (figura 29).

Figura 28: Distribuição de comorbidades associadas a DM2.

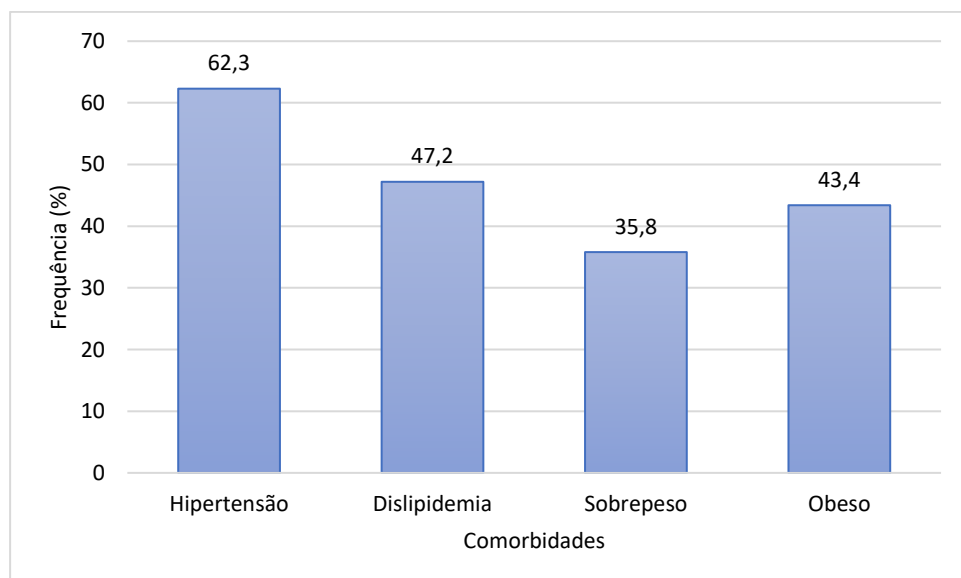
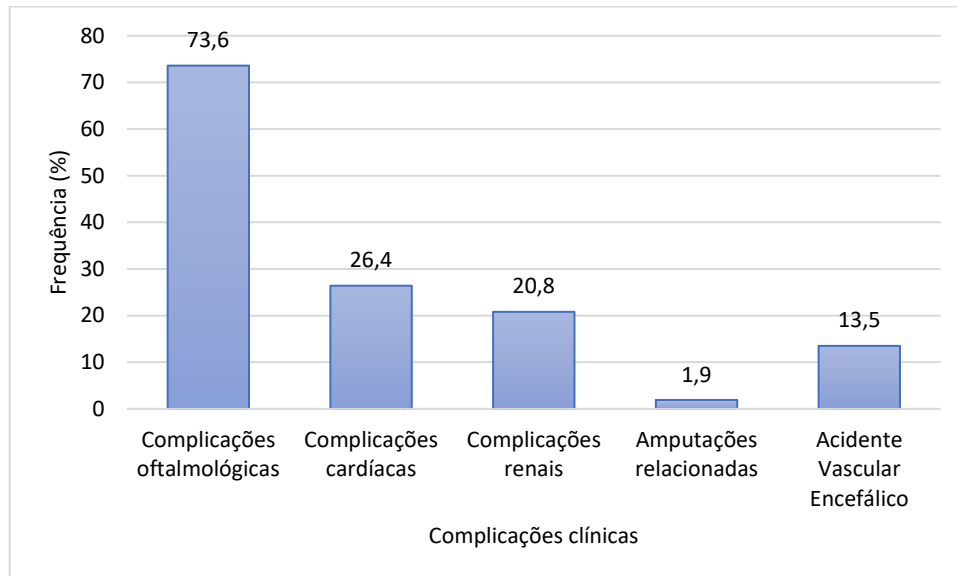


Figura 29: Distribuição de complicações clínicas associadas a DM2.



Houve associação estatística significativa entre o tempo de diagnóstico para DM2 e complicações clínicas (tabela 8). Quanto a associação entre comorbidades e complicações clínicas, houve associação estatística significativa para dislipidemia e mais de uma complicação clínica, IMC e complicações oftalmológicas e IMC e mais de uma complicação clínica (tabela 9).

Tabela 8: Associação entre tempo de diagnóstico para DM2 e complicações clínicas associadas a DM2.

Tempo diagnóstico para DM2	Complicações cardíacas		Complicações renais		Complicações oftalmológicas		Mais de uma complicação clínica	
	N	p-value	N	p-value	N	p-value	N	p-value
6 meses a 5 anos	7	0,178	7	0,661	22	0,088	26	0,001
6 - 10 anos	2		1		5		5	
11 - 15 anos	0		1		5		5	
Acima de 15 anos	4		2		6		6	

p-value <0,05.

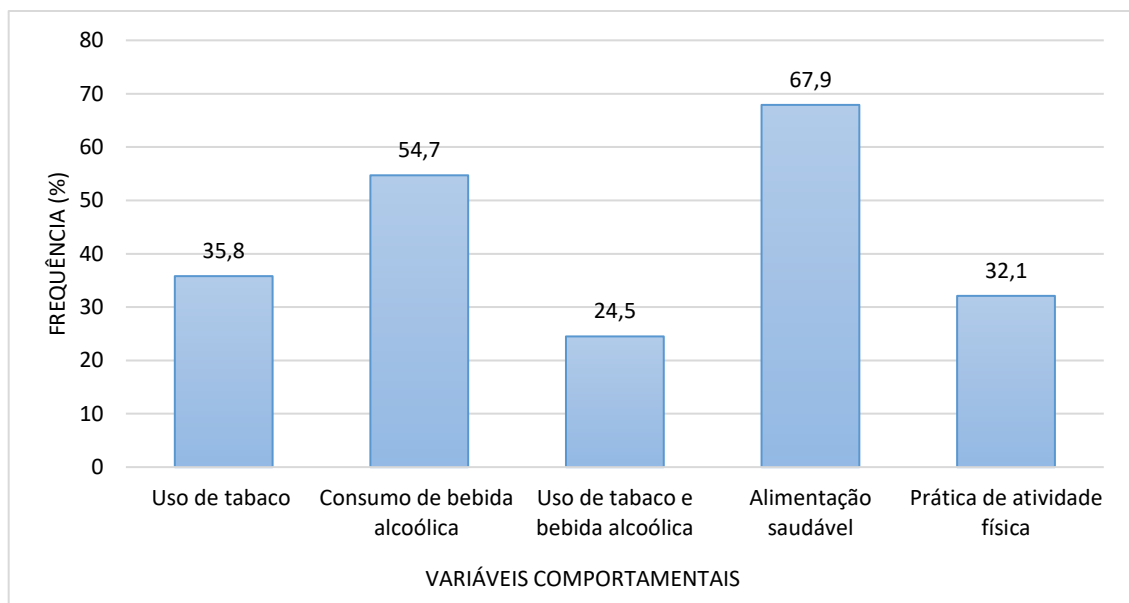
Tabela 9: Associação entre comorbidades e complicações clínicas associadas a DM2.

Comorbidades	Complicações cardíacas		Complicações renais		Complicações oftalmológicas		Mais de uma complicação clínica	
	N	p-value	N	p-value	N	p-value	N	p-value
Dislipidemia		0,722		0,150		0,132		0,001
sim	6		8		21		25	
não	7		3		16		16	
Hipertensão		0,645		0,421		0,645		0,870
sim	8		8		25		27	
não	6		3		14		16	
IMC		0,081		0,123		0,015		0,002
normal	0		0		5		5	
sobrepeso	6		4		13		16	
obeso	8		7		21		22	

p-value <0,05.

Quanto às variáveis comportamentais associadas a DM2, 35,8% dos indivíduos da amostra afirmaram o uso do tabaco em algum momento da vida (fumante ou ex-fumante), 54,7% o consumo de bebidas alcoólicas e 24,5% o uso de tabaco e álcool. A alimentação saudável (consumo diário de frutas e verduras) foi relatada por 67,9% dos indivíduos e somente 32,1% praticam algum tipo de atividade física regularmente (Figura 30). Quanto ao tratamento medicamentoso, verificou-se que 92,5% utilizam antidiabéticos orais e 20,8% a insulina para o controle da glicemia. Na análise de agregação familiar, 69,8% possuem algum familiar de primeira e/ou segunda geração com DM2.

Figura 30: Frequência de variáveis comportamentais associadas a DM2.



4.2 ANÁLISE DO ÉXON 1 DO GENE *IRS1*

A metodologia empregada para a extração de DNA forneceu material genômico em quantidade e qualidade satisfatórias (figura 31), o que favoreceu o desenvolvimento das etapas de Semi Nested-PCR (figura 32) e Sequenciamento (Figura 33).

Figura 31 – Imagem representativa do perfil eletroforético do DNA genômico obtido a partir do método de extração proposto para a presente pesquisa. M – Marcador Lambda 20 ng; 1-11 – amostras da pesquisa. Gel de agarose 1% corado com brometo de etídio.

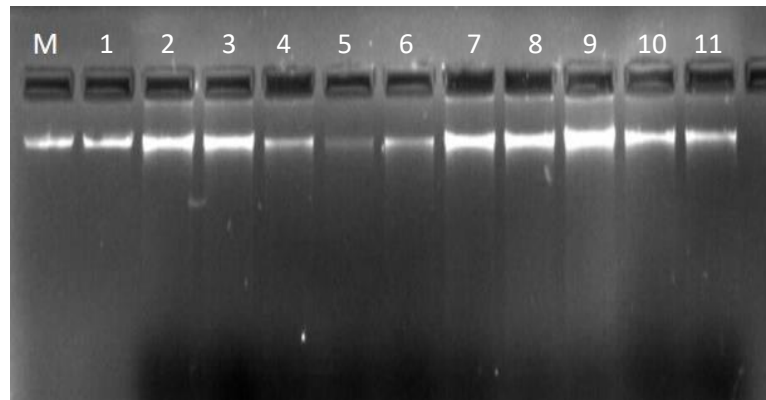


Figura 32 - Perfil eletroforético dos produtos amplificados com os oligonucleotídeos FW1/RV3 (2557bp) e FW3/RV1 (2569bp), com uso da técnica de Semi Nested-PCR. M = marcador de peso molecular 1 Kb (KASVI); 1 e 2 = *amplicon* FW1/RV3; 3 e 4 = *amplicon* FW3/RV1. Gel de agarose 1% corado com brometo de etídio.

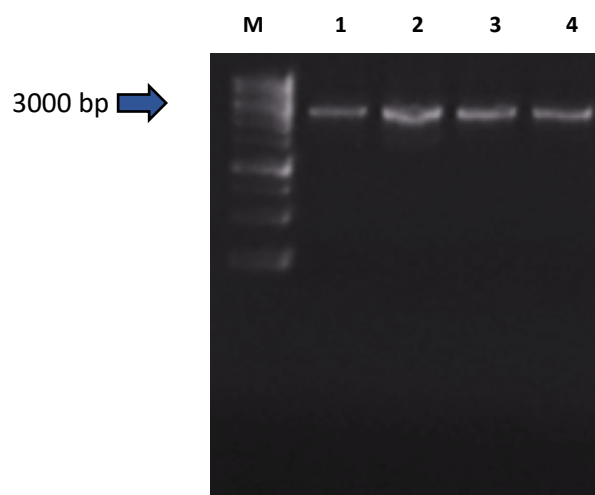
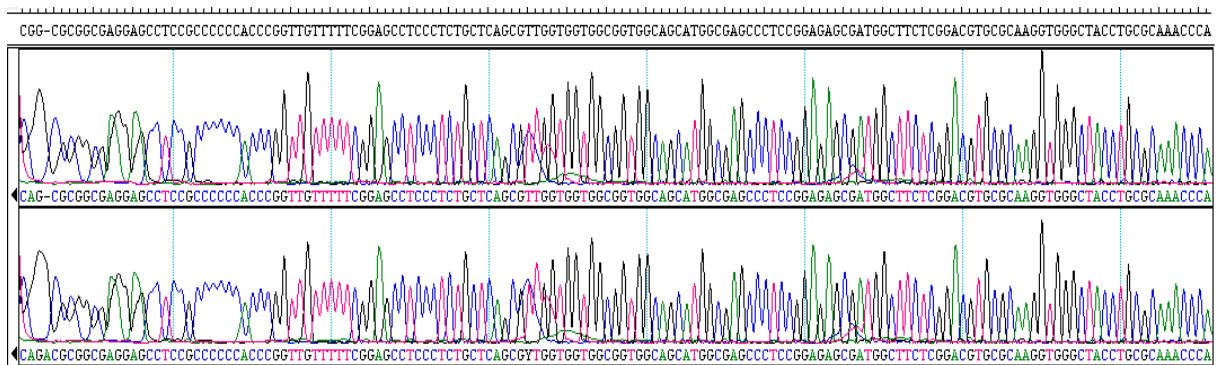


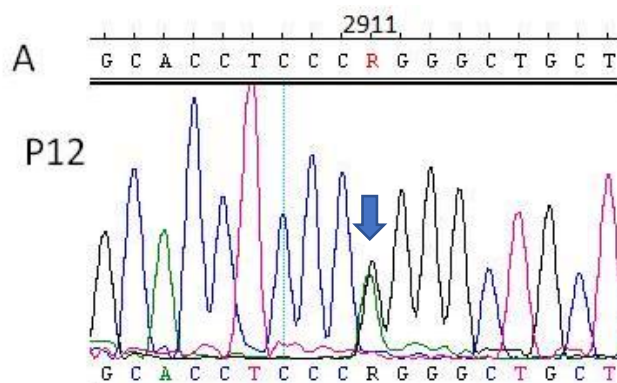
Figura 33 – Eletroferogramas obtidos de parte da sequência codificante do gene *IRS1*. Análise realizada no programa SeqMan - DNASTAR.



4.3 IDENTIFICAÇÃO DO VARIANTE *rs1801278*

O rastreio de mutações na sequência codificante do gene *IRS1* em pessoas com DM2 identificou o variante *rs1801278* (NM_005544.2)¹⁰, em heterozigose, no indivíduo 12 da amostra (figura 34), o qual foi denominado nas próximas etapas da pesquisa como P12. Trata-se de uma mutação de ponto c2911G>A, do tipo transição, que causa uma mutação de sentido trocado no códon 971 alterando-o de GGG para AGG e substituindo no substrato IRS-1 a glicina da sequência de aminoácidos original por uma arginina (p.Gly971Arg/p.G971R) (Figura 35).

Figura 34 - Eletroferograma da sequência codificante do gene *IRS1* da amostra 12 (P12). Observa-se um variante de base única na posição 2911, em heterozigose, que caracteriza o variante *rs1801278* está representado pela letra R, que indica a ocorrência de dois picos na mesma posição, correspondentes às bases A e G (seta).



¹⁰ Número do variante clínico para acesso no NCBI.

Figura 35 - Alinhamento local de 21 nucleotídeos da sequência codificante do gene *IRS1* do indivíduo 12, evidenciando a mutação de sentido trocado G971R (seta). P12 *rs1801278* – sequência com SNV *rs1801278* da amostra 12; NG_015830.1 – acesso NCBI para a sequência de referência do gene *IRS1* de *Homo sapiens*. Os nucleotídeos foram separados em códon para facilitar a visualização da mutação de sentido trocados. Os aminoácidos correspondentes a cada códon estão representados pelo código de três letras.

				↓			
	Ala	Pro	Pro	Arg	Ala	Ala	Ser
P12rs1801278	GCA	CCT	CCC	AGG	GCT	GCT	AGC
NG_015830.1	GCA	CCT	CCC	GGG	GCT	GCT	AGC
	Ala	Pro	Pro	Gly	Ala	Ala	Ser
	968	969	970	971	972	973	974

Estudos publicados mostram que o variante *rs1801278* está associado a DM2 em várias populações, conforme apresentado na tabela 3 da sessão 3.4.

4.4 ANÁLISE FAMILIAR DO VARIANTE *rs1801278*.

Considerando a importância do variante *rs1801278* no desencadeamento da DM2, decidiu-se pesquisá-lo em outros membros da família do indivíduo P12 com uso da técnica de PCR-RFLP, digerindo-se o *amplicon* do gene *IRS1* gerado pelos oligonucleotídeos FW3 e RV2 com a enzima de restrição *SmaI*.

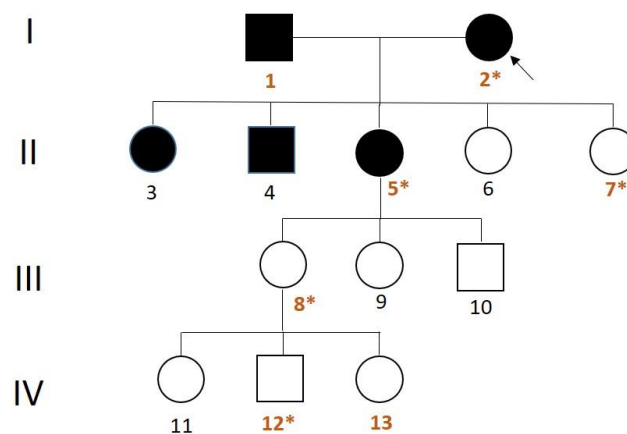
Para a análise familiar desse variante, sete membros de quatro gerações da família do indivíduo 12, com ou sem diagnóstico clínico confirmado para DM2, foram incluídos voluntariamente nessa etapa da pesquisa. Dados clínicos e de caracterização sobre esses indivíduos estão apresentados na tabela 10 e o heredograma da família, construído a partir de informações fornecidas pelos indivíduos parentais (I-1 e I-12), é apresentado na figura 36.

Tabela 10 - Caracterização dos participantes da etapa de análise familiar.

Dados	1	2 (P12)	5	7	8	12	13
Gênero	M	F	F	F	F	M	F
Idade	91 anos	88 anos	59 anos	49 anos	37 anos	6 anos	1 ano
IMC	30,94 obeso	23,55 normal	28,4 sobrepeso	31,1 obeso	27,8 sobrepeso	-	-
Diagnóstico DM2	Sim	Sim	Sim	Não	Não	Não	Não
Tempo de diagnóstico	40 anos	10 anos	6 anos	-	-	-	-
Comorbidades	H CO CC	D CO CR	-	-	-	-	-
Tratamento com insulina	Sim	Não	Não	Não	Não	Não	Não
Atividade Física	Não	Sim	Não	Sim	Não	Não	Não

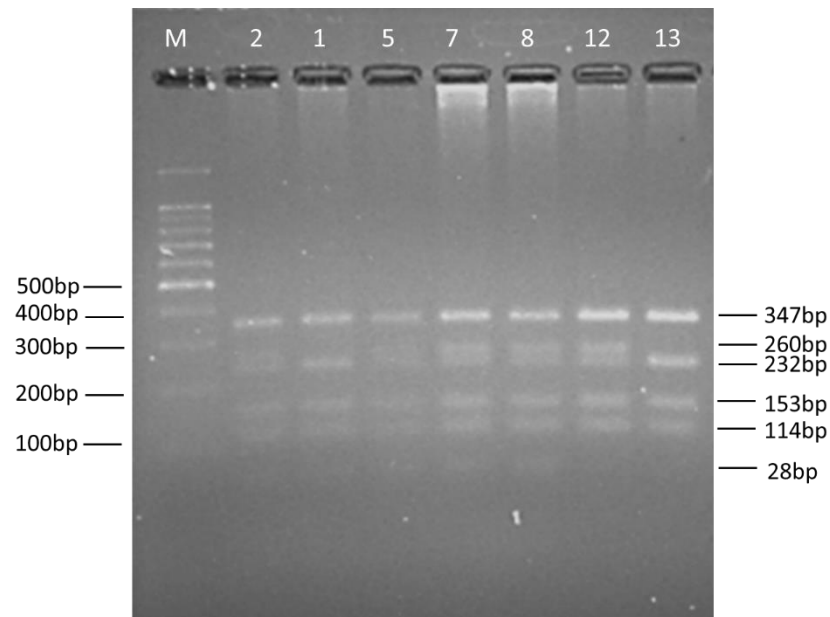
M- masculino; F – feminino; IMC – índice de massa corporal; CC – Complicações Cardíacas; CO – Complicações Oftalmológicas; CR – Complicações renais; D – Dislipidemia; H – Hipertensão arterial;

Figura 36: Heredograma de quatro gerações para a família em estudo. A genealogia de 13 indivíduos é apresentada. O indivíduo P12 é o probando do heredograma identificado com seta e indicado como I-2. Símbolos escuros representam indivíduos clinicamente diagnosticados com DM2 e símbolos não escuros representam indivíduos sem o diagnóstico clínico para DM2. A pesquisa do variante *rs1801278* pela técnica de PCR-RFLP foi realizada com os indivíduos 1, 2 (P12), 5, 7, 8, 12 e 13 do heredograma. Indivíduos com asteriscos foram positivos para o variante *rs180127*.



A análise dos membros da família em quatro gerações revelou o variante *rs1801278* em cinco pessoas (I-2, II-5, II-7, III-8, IV-12), três delas sem manifestação, no momento da pesquisa, de quadro clínico para DM2 (Figura 37).

Figura 37: Perfil de restrição da análise familiar obtido por meio da técnica de PCR-RFLP para *rs1801278*. M – marcador de peso molecular 100 bp (INVITROGEN). Indivíduos identificados com o variante *rs1801278*: 2 (P12), 5, 7, 10 e 14. Gel de agarose 2% corado com brometo de etídio.



4.5 SEQUENCIAMENTO DO EXOMA

O sequenciamento total do exoma do indivíduo P12 gerou 22.384 variantes de nucleotídeo único em regiões exônicas. A filtragem de variáveis foi aplicada e resultou em seis variantes não sinônimas em genes relacionados a via de sinalização da insulina. A análise com Polyphen2 e SIFT revelou que somente o variante *rs1801278* é prejudicial com score de 0.714 e 0,006, respectivamente (Tabela 11).

Tabela 11: Resultado de variantes em genes relacionados a via de sinalização da insulina obtido a partir da análise do sequenciamento total do exoma do indivíduo P12. A tabela contém dados sobre o score obtido de cada variante gerado pelos programas Polyphen2 e SIFT e a classificação da predição de acordo com o score obtido.

SNV	Gene/ Locus	alelos	¹ AA trocado	² Score Predição Polyphen2	Predição Polyphen2	³ Score Predição SIFT	Predição SIFT
<i>rs7508518</i>	<i>INSR</i> 19p13.2	G>C	A2G	0.000	benigna	0.532	tolerável
<i>rs1801278</i>	<i>IRS1</i> 2q36.3	G>A	G971R	0.714	prejudicial	0.006	deletéria
<i>rs1805097</i>	<i>IRS2</i> 13q34	C>T	G1057D	0.089	benigna	0.333	tolerável
<i>rs1801164</i>	<i>IRS4</i> Xq22.3	G>C	H879D	0.000	benigna	1	tolerável
<i>rs3730089</i>	<i>PIK3R1</i> 5q13.1	G>A	M326I	0.000	benigna	0.223	tolerável
<i>rs1062087</i>	<i>TBC1D4</i> 13q22.2	C>T	V819I	0.000	benigna	0.484	tolerável

¹AA - aminoácido

²SCORE POLYPHEN: 0.0 – 0,15 benigna; acima de 0,15 prejudicial.

³SCORE SIFT: 0.0 a 0.05 – deletéria; acima de 0,05 – tolerável.

4.6 ANÁLISE DA MODELAGEM MOLECULAR

A construção de modelos estruturais com uso da modelagem molecular por homologia permitiu obter a estrutura terciária do substrato IRS-1 selvagem (Gly⁹⁷¹) e mutante (Arg⁹⁷¹), cuja sobreposição e detalhes da região com a mutação são apresentadas na figura 38. O modelo molecular da fosforilação no resíduo Ser⁹⁷⁴ da sequência do substrato IRS-1 mutante mostrou a baixa interação desse substrato com o domínio SH2 (resíduo de arginina 19) da subunidade p85 de PI3K, quando comparado com o substrato IRS-1 selvagem (figura 39).

Figura 38: (A) Sobreposição dos substratos IRS-1 selvagem e mutante. A seta azul indica a posição da mutação entre os substratos selvagem (glicina) e mutante (arginina) (B) Detalhe da sobreposição com a região 971 que contém a mutação.

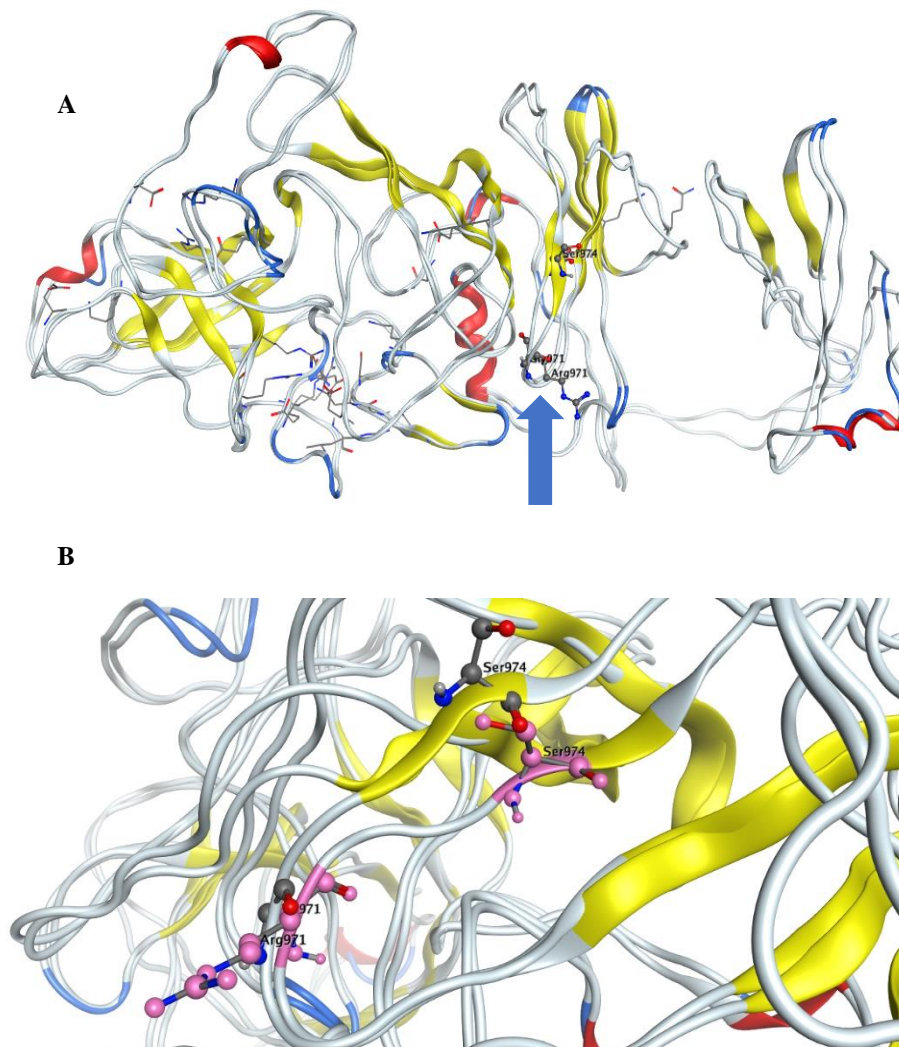
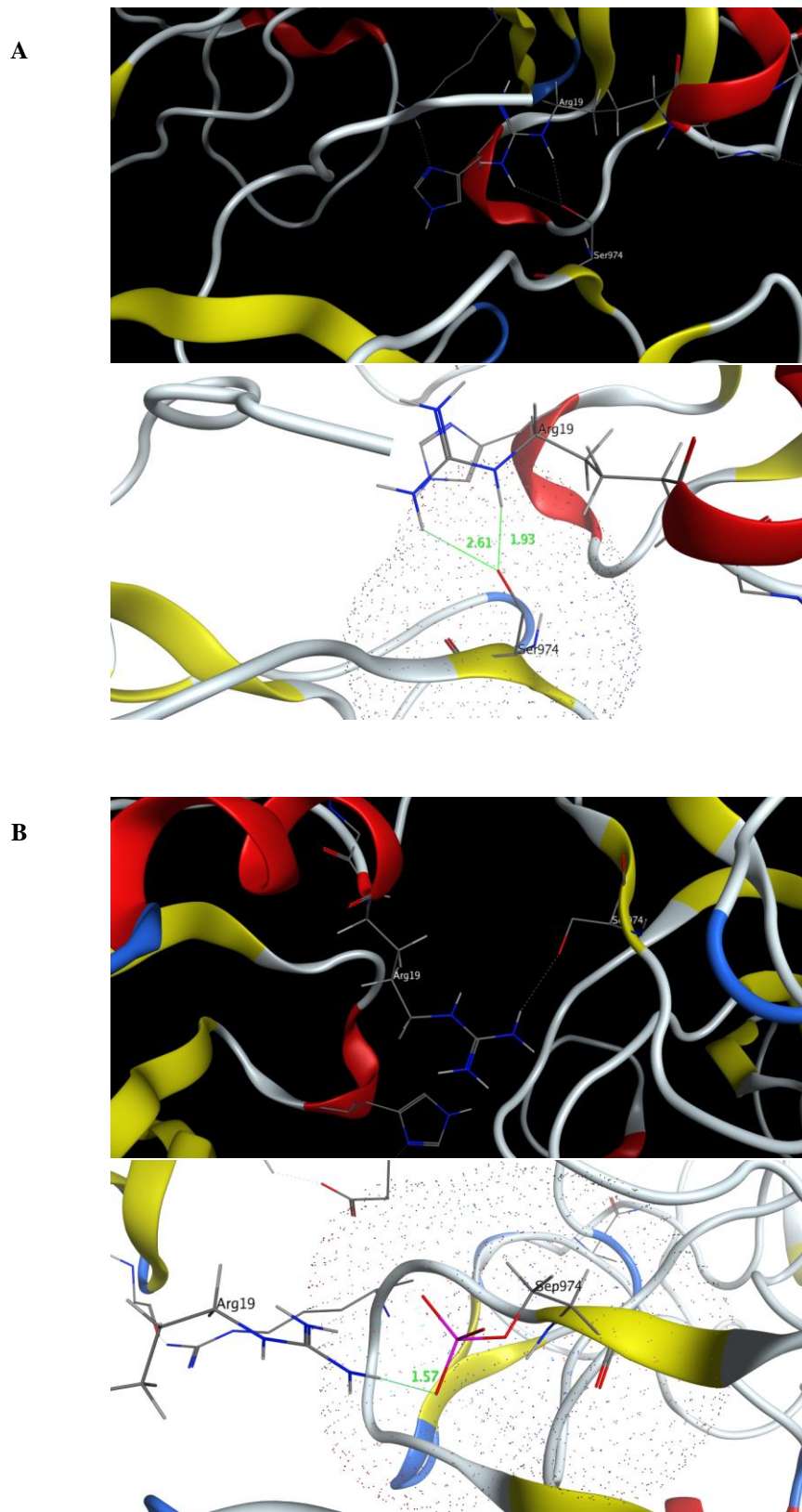


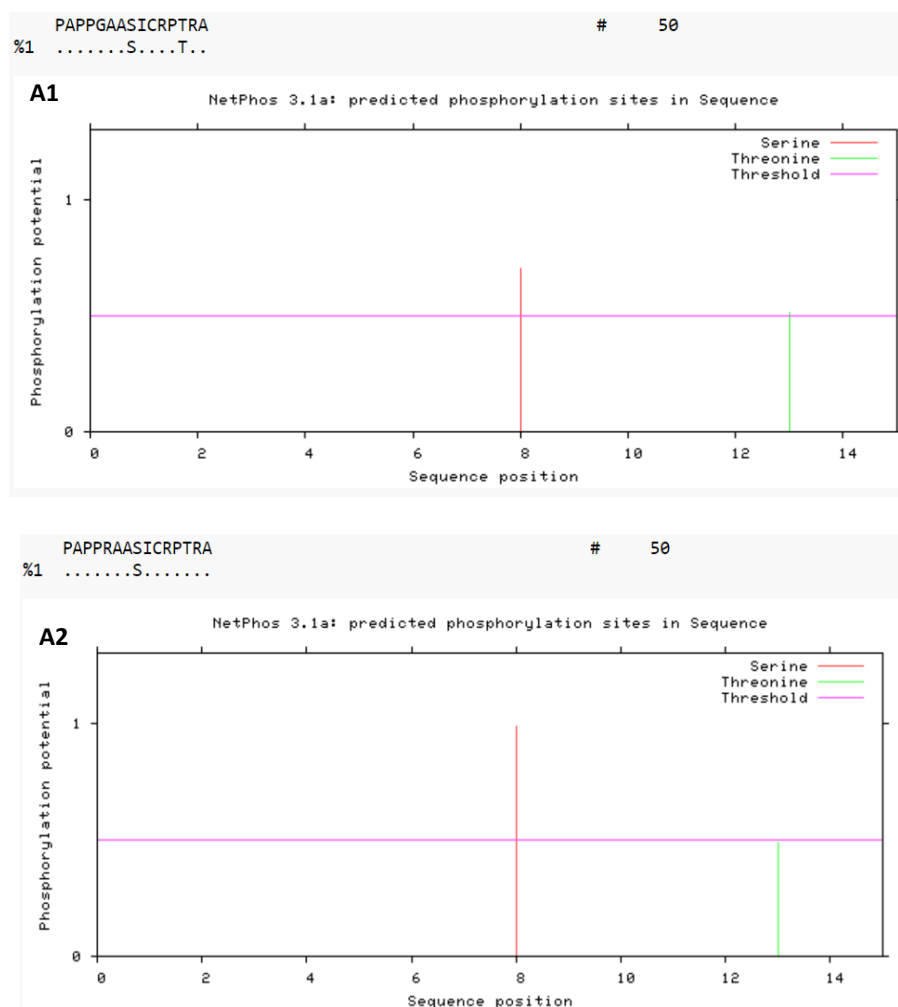
Figura 39: Simulação de ancoramento molecular entre IRS-1 selvagem (A) e mutante (B) com o domínio SH2 de PI3K (resíduo de arginina 19), com distância em Å. Os domínios SH2 são formados por uma cadeia lateral de arginina e a interação da Ser⁹⁷⁴ do substrato IRS-1 interage com a Arg¹⁹ de PI3K. Observa-se baixa interação molecular entre IRS-1 mutante e PI3K.



4.7 ANÁLISE DA FOSFORILAÇÃO

A análise comparativa *in silico* entre os substratos IRS-1 selvagem e mutante no programa NetPhos 3.1 revelou que a presença da mutação G>A no gene *IRS1* com a consequente troca de aminoácidos G971R estimula a fosforilação por proteína kinase A (PKA) na serina 974 da cadeia de aminoácidos do substrato IRS-1 (Figura 40).

Figura 40: Análise *in silico* comparativa do potencial de fosforilação do substrato IRS-1 selvagem (A) e mutante (B). Observa-se aumento na fosforilação do substrato mutante (A2) em comparação com o substrato selvagem (A1) e maior potencial de fosforilação na serina (8) no substrato IRS-1 mutante (B1 e B2). Fonte: NetPhos 3.1 Server.



B1

```

>Sequence      15 amino acids
#
# netphos-3.1b prediction results
#
# Sequence      # x Context      Score Kinase      Answer
# -----
# Sequence      8 S PGAASICRP  0.702 unsp        YES
# Sequence      8 S PGAASICRP  0.460 cdc2        .
# Sequence      8 S PGAASICRP  0.453 CaM-II     .
# Sequence      8 S PGAASICRP  0.452 GSK3       .
# Sequence      8 S PGAASICRP  0.363 CKI        .
# Sequence      8 S PGAASICRP  0.350 p38MAPK    .
# Sequence      8 S PGAASICRP  0.349 DNAPK     .
# Sequence      8 S PGAASICRP  0.317 PKC      .
# Sequence      8 S PGAASICRP  0.307 ATM     .
# Sequence      8 S PGAASICRP  0.280 CKII     .
# Sequence      8 S PGAASICRP  0.269 cdk5     .
# Sequence      8 S PGAASICRP  0.259 RSK      .
# Sequence      8 S PGAASICRP  0.235 PKG     .
# Sequence      8 S PGAASICRP  0.215 PKA     .
# Sequence      8 S PGAASICRP  0.083 PKB     .
#
# Sequence      13 T ICRPTRA--  0.513 PKA        YES
# Sequence      13 T ICRPTRA--  0.474 PKG      .
# Sequence      13 T ICRPTRA--  0.464 GSK3     .
# Sequence      13 T ICRPTRA--  0.433 CaM-II   .
# Sequence      13 T ICRPTRA--  0.363 CKI      .
# Sequence      13 T ICRPTRA--  0.355 PKC     .
# Sequence      13 T ICRPTRA--  0.354 DNAPK   .
# Sequence      13 T ICRPTRA--  0.347 cdc2    .
# Sequence      13 T ICRPTRA--  0.302 RSK     .
# Sequence      13 T ICRPTRA--  0.301 p38MAPK .
# Sequence      13 T ICRPTRA--  0.295 CKII    .
# Sequence      13 T ICRPTRA--  0.267 ATM     .
# Sequence      13 T ICRPTRA--  0.190 cdk5    .
# Sequence      13 T ICRPTRA--  0.080 PKB     .
# Sequence      13 T ICRPTRA--  0.075 unsp    .
#
# PAPPGAASICRPTRA # 50
%1 .....S....T..

```

B2

```

>Sequence      15 amino acids
#
# netphos-3.1b prediction results
#
# Sequence      # x Context      Score Kinase      Answer
# -----
# Sequence      8 S PRAASICRP  0.984 unsp        YES
# Sequence      8 S PRAASICRP  0.538 PKA        YES
# Sequence      8 S PRAASICRP  0.477 CaM-II     .
# Sequence      8 S PRAASICRP  0.465 cdc2        .
# Sequence      8 S PRAASICRP  0.455 GSK3       .
# Sequence      8 S PRAASICRP  0.433 RSK        .
# Sequence      8 S PRAASICRP  0.363 CKI        .
# Sequence      8 S PRAASICRP  0.349 DNAPK     .
# Sequence      8 S PRAASICRP  0.340 p38MAPK    .
# Sequence      8 S PRAASICRP  0.315 PKG      .
# Sequence      8 S PRAASICRP  0.306 PKC      .
# Sequence      8 S PRAASICRP  0.304 cdk5     .
# Sequence      8 S PRAASICRP  0.288 ATM     .
# Sequence      8 S PRAASICRP  0.214 PKB     .
# Sequence      8 S PRAASICRP  0.209 CKII     .
#
# Sequence      13 T ICRPTRA--  0.485 PKA      .
# Sequence      13 T ICRPTRA--  0.474 PKG      .
# Sequence      13 T ICRPTRA--  0.464 GSK3     .
# Sequence      13 T ICRPTRA--  0.433 CaM-II   .
# Sequence      13 T ICRPTRA--  0.366 cdc2    .
# Sequence      13 T ICRPTRA--  0.363 CKI      .
# Sequence      13 T ICRPTRA--  0.355 PKC     .
# Sequence      13 T ICRPTRA--  0.354 DNAPK   .
# Sequence      13 T ICRPTRA--  0.304 RSK     .
# Sequence      13 T ICRPTRA--  0.301 p38MAPK .
# Sequence      13 T ICRPTRA--  0.295 CKII    .
# Sequence      13 T ICRPTRA--  0.263 ATM     .
# Sequence      13 T ICRPTRA--  0.192 cdk5    .
# Sequence      13 T ICRPTRA--  0.080 PKB     .
# Sequence      13 T ICRPTRA--  0.075 unsp    .
#
# PAPPRAASICRPTRA # 50
%1 .....S.....

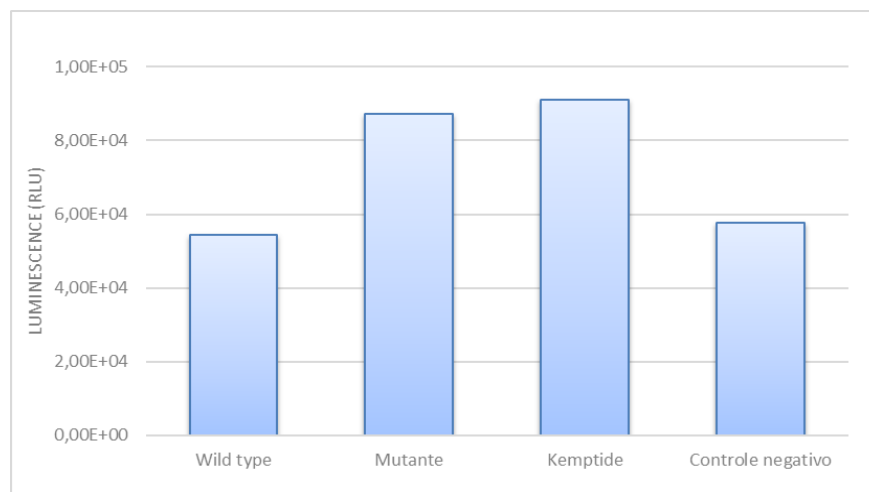
```

A fosforilação *in vitro* dos substratos selvagem e mutante foi verificada com o uso do Kit ADP-Glo™ Kinase Assay, cuja análise baseia-se na luminescência gerada, correlacionada com a quantidade de ADP gerado na reação da kinase, indicativo da atividade da kinase. A emissão de luminescência revelou maior fosforilação no peptídeo mutante e controle positivo (kemptide). O peptídeo com a sequência selvagem apresentou luminescência similar ao controle negativo (Tabela 12 e figura 41).

Tabela 12: Comparação do sinal de luminescência com o uso de ADP-Glo™ Kinase Assay entre as amostras selvagem, mutante, kemptide, controle negativo. A luminescência foi medida usando GloMax® 20/20 Luminometer (PROMEGA Corporation). As amostras foram analisadas em quadruplicatas e apresentados os cálculos referentes a média e desvio padrão.

AMOSTRAS	1	2	3	4	MÉDIA	DESVIO PADRÃO
Selvagem	3,20E+04	5,46E+04	6,60E+04	6,48E+04	5,43E+04	1,58E+04
Mutante	5,88E+04	8,81E+04	1,04E+05	9,82E+04	8,72E+04	2,01E+04
Kemptide	6,05E+04	9,29E+04	1,07E+05	1,04E+05	9,12E+04	2,13E+04
Controle negativo	3,43E+04	5,63E+04	7,21E+04	6,76E+04	5,76E+04	1,69E+04

Figura 41: Gráfico comparativo mostrando os valores médios do sinal de luminescência entre as amostras com o uso de ADP-Glo™ Kinase Assay. Quanto maior o sinal de luminescência maior a conversão de ATP-ADP e, portanto, maior atividade da kinase.



5 DISCUSSÃO

5.1 COMORBIDADES, COMPLICAÇÕES CLÍNICAS E VARIÁVEIS COMPORTAMENTAIS DE RISCO.

A maior prevalência do gênero feminino com DM2, observada também em outros estudos, pode ser explicada pelo comportamento dicotômico entre os gêneros, evidenciando-se uma maior busca aos cuidados com a saúde pelo gênero feminino. Deve-se considerar ainda que a composição da amostra na presente pesquisa foi realizada em uma policlínica, fato que pode ter contribuído com esse resultado. Historicamente, o público feminino é mais consciente sobre a relevância da atenção à saúde e conseqüentemente, acessam mais os serviços de saúde (BAHIA et al., 2011; BERTOLDI et al., 2013; CECILIO et al., 2015; CORRER et al., 2019; LIMA et al., 2010).

O aumento da incidência de DM2 em função da idade é significativo e também observado em outros estudos populacionais (BAHIA et al., 2011; BERTOLDI et al., 2013; CECILIO et al., 2015; CORRER et al., 2019; GRILLO; GORINI, 2007; LIMA et al., 2010; ROCHA et al., 2017). Em decorrência do aumento da idade e conseqüente processo de envelhecimento, ocorre menor produção de insulina devido a disfunção de células beta pancreáticas (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2019). A associação da genética e determinados comportamentos, como má alimentação e sedentarismo, favorecem o aumento da prevalência de DM2 em pessoas com idade acima 40 anos.

Entre as doenças crônicas não transmissíveis, a DM2 é importante causa de mortalidade entre os idosos (FRANCISCO et al., 2010), fato que pode explicar a redução da incidência de pessoas com DM2 acima de 75 anos em estudos populacionais para DM2 (BAHIA et al., 2011; BERTOLDI et al., 2013).

A disparidade entre os níveis de escolaridade dos indivíduos é evidente. A ocorrência da diabetes independe do nível de escolaridade e, esses dados, podem refletir a população local atendida pela policlínica, pois em princípio, atende apenas a população de uma determinada região. Entretanto, estudos mostram que pessoas com baixa escolaridade e baixa renda possuem mais dificuldade para adesão ao tratamento (CREATORE et al., 2010; SORIGUER et al., 2012; VITAL et al., 2019). A condição da escolaridade pode dificultar o acesso à informação, prejudicando a compreensão quanto a medidas de autocuidado da pessoa com diabetes. Independente do real fator, esses dados reforçam a necessidade de planejamento de estratégias diferenciadas por profissionais da atenção básica, garantindo orientações claras quanto ao autocuidado, visto que é importante um mínimo de conhecimento para permitir a

conscientização, modificação de condutas não saudáveis, tomada de decisões e autocuidado que favorecem o controle da doença e conseqüentemente a melhoria da qualidade de vida da pessoa com DM2 (CECILIO et al., 2015; GRILLO; GORINI, 2007).

A elevada frequência da hipertensão arterial é consenso em estudos com essa população, fato que contribui para o aumento significativo de risco de doença cardiovascular, complicações microvasculares e oftalmológicas (BASSI et al., 2018; FERRANNINI; CUSHMAN, 2012; GRILLO; GORINI, 2007; MENGESHA, 2007; VITAL et al., 2019). Em estudo realizado por Cecilio et al. (2015), foi observada associação significativa para hipertensão e complicações clínicas para DM2, não notado no presente estudo. Essa fisiopatologia interliga-se com DM2 especialmente devido à resistência à insulina, cujo estado de hipersulinemia reduz a vasodilatação (FERRANNINI; CUSHMAN, 2012). As alterações vasculares são naturais ao processo de envelhecimento, no entanto, a incidência de hipertensão com o aumento da idade é maior em pessoas diabéticas do que pessoas não diabéticas (SPENCER, 2010).

A dislipidemia é outro fator de risco a se observar, pois também se apresenta com elevada frequência em vários estudos populacionais, e contribui significativamente para as doenças cardíacas (GRILLO; GORINI, 2007; MENGESHA, 2007). No presente estudo, a dislipidemia foi estatisticamente significativa com o risco de complicações clínicas em pessoas com DM2. A resistência à insulina, em pessoas com DM2, predispõe a alterações no metabolismo das lipoproteínas circulantes, ocorrendo hipertriglicéremia e aumento na produção hepática de VLDL (PEREIRA, 2011; PINHO et al., 2015). Essas alterações contribuem para o desenvolvimento de aterosclerose e doenças cardiovasculares, principais causas de óbito da população diabética (MULLUGETA et al., 2012). No caso de pessoas diabéticas, o risco do desenvolvimento das condições supracitadas se eleva de 2 a 4 vezes (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2019).

A obesidade em portadores de DM2 é outro fator preocupante. A alta frequência observada, nesse estudo, repete-se em outras análises semelhantes (GOMES et al., 2006; GRILLO; GORINI, 2007; LIMA et al., 2010; MENGESHA, 2007; SORIGUER et al., 2012; VITAL et al., 2019). A obesidade tem se tornado um dos pontos mais discutidos na medicina atual, pois sua incidência tem se elevado ao longo dos anos, associada ao sedentarismo e alimentação inadequada da população em geral.

Nesse estudo, o Índice de Massa Corpórea (IMC) teve associação significativa com o risco de complicações oftalmológicas e complicações em geral. A obesidade influencia negativamente a sinalização da insulina favorecendo um quadro de resistência à insulina que desencadeia a hiperglicemia crônica resultando no aparecimento de complicações clínicas ao

longo do tempo (FREITAS; CESCHINI; RAMALLO, 2014). Estudos apontam que a obesidade aumenta o risco de doenças renais em pessoas com resistência à insulina severa (AHLQVIST et al., 2018).

O aumento da mortalidade entre pessoas com DM2 está associado ao desenvolvimento de complicações agudas, devido à hiperglicemia crônica que causa alterações fisiológicas e metabólicas ao longo de vários anos (DE BEM; KUNDE, 2006; FERREIRA et al., 2011; KLAFKE et al., 2014; TSCHIEDEL, 2014). São comuns as complicações macrovasculares e microvasculares que diferem em frequência e níveis de gravidade (CECILIO et al., 2015; GRILLO; GORINI, 2007; LIMA et al., 2010).

Corroborando com os dados obtidos na população em estudo, a ocorrência de complicações oftalmológicas é a mais frequente das complicações em pessoas com DM2, sendo a mais comum a retinopatia diabética, principal causa de cegueira em pessoas com essa patologia (CECILIO et al., 2015; ESTEVES et al., 2008; LIMA et al., 2010; SANTOS; FREITAS; PINTO, 2014; TSCHIEDEL, 2014). A hiperglicemia crônica ocasiona alterações microvasculares do tecido retiniano com alterações circulatórias culminando em hemorragias e descolamento da retina (BOSCO et al., 2005).

As complicações cardíacas e renais, apesar de uma baixa frequência nesse estudo, são mais frequentes em pessoas com DM2 em comparação a pessoas sem DM2 (QUEIROZ et al., 2011; SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2019; TSCHIEDEL, 2014). Indivíduos com DM2 apresentam função cardiovascular reduzida, notada pela diminuição da frequência cardíaca, levando a maior risco de morte súbita cardíaca (ROCHA et al., 2017; SILVA-E-OLIVEIRA et al., 2017). A nefropatia diabética, uma complicação renal da DM2, é a principal causa de pessoas com DM2 em programas de diálise, inclusive no Brasil, e é consequência do aumento de excreção urinária de albumina e redução da taxa de filtração glomerular (MACIEL; VASCONCELOS; ANDRADE, 2019; SESSO et al., 2010).

A ocorrência de amputações foi baixa no estudo, no entanto, outros estudos afirmam que a maior causa registrada de amputações em internações hospitalares é decorrente de lesões graves em pessoas com DM2, devido principalmente a neuropatias periféricas (CECILIO et al., 2015; GRILLO; GORINI, 2007; LIMA et al., 2010; ROCHA et al., 2017; SANTOS et al., 2015).

O tempo de diagnóstico para DM2 é um importante indicador, pois quanto maior o tempo de diagnóstico, maior é a prevalência de complicações clínicas (SCHEFFEL et al., 2004). Este fato pode ser observado no presente estudo, pois houve associação estatística significativa entre tempo de diagnóstico e complicações clínicas. A média do tempo de diagnóstico na pesquisa foi de aproximadamente 9 anos ($9,124 \pm 9,3120$ anos), resultado aproximado aos

obtidos em outros estudos realizados no Brasil com usuários de unidades básicas de saúde do sistema público (GOMES et al., 2006; LYRA et al., 2006; SCHEFFEL et al., 2004).

Os dados obtidos pela associação entre tempo de diagnóstico para DM2 e comorbidades em DM2, relevam a importância do acompanhamento clínico para a população diabética para o controle efetivo da glicemia, diminuindo-se o risco de complicações clínicas graves que comprometam a qualidade de vida dessas pessoas, bem como altos custos ao sistema de saúde (COSTA et al., 2017; DE BEM; KUNDE, 2006; SOUZA; GROSS, 2012). Um exemplo prático dessa compreensão é o resultado obtido por Keenan et al. (2007) onde afirmam que a glicemia controlada em padrões normais, ou próximo desse, pode postergar a retinopatia diabética, uma das principais complicações oftalmológicas em pessoas com DM2.

Entretanto, o diagnóstico tardio para a DM2 é ainda um problema, pois se estima que cerca de 46% dos casos de diabetes em adultos não são diagnosticados, e a condição de hiperglicemia permanece por vários anos afetando fisiologicamente o sistema biológico do indivíduo (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2019). Uma vez que a grande maioria das pessoas com DM2 na população permanece assintomática por um longo período, o diagnóstico frequentemente é resultado da presença de sintomas das complicações tardias da doença. Um estudo transversal nacional realizado em novembro de 2018 avaliou a glicemia capilar em pessoas sem diagnóstico prévio para DM e mostrou que a prevalência de pacientes com alta glicemia foi de 18,4% (IC 95%: 17,9 - 19,0), dado que mostra a importância do rastreio para diabetes para a população brasileira (CORRER et al., 2019).

A ocorrência de uso de tabaco e ingestão de álcool em pessoas com DM2 foi verificado em outros estudos (CECILIO et al., 2015; CORRÊA, 2003; RODRIGUES, 2013). Cecilio et al. (2015) relatam que não houve associação estatisticamente significativa entre o consumo de álcool e tabaco e complicações microvasculares, conforme afirmado em estudo anterior realizado por Umamahesh et al. (2014) Entretanto, sabe-se que em longo prazo, esses comportamentos aumentam o risco de complicações da doença.

Apesar da maior parte da população do estudo afirmar que faz uma alimentação adequada, observa-se alta frequência de pessoas com sobrepeso e obesas. Estudos discutem que devido às condições econômicas, existe o consumo frequente de carboidratos, devido ao baixo custo para aquisição, associado à insuficiente prática de atividade física (ARSA et al., 2009; CECILIO et al., 2015; CORRER et al., 2019; GRILLO; GORINI, 2007). É notória a importância do exercício físico, pois potencializa o mecanismo de sinalização da insulina, aumentando a expressão de GLUT-4, proporcionando maior entrada da glicose na célula e, conseqüentemente, controle da glicemia (ALVES et al., 2019; ARSA et al., 2009; COCATE; DOMINGUES; NATALI, 2011; VANCEA et al., 2009).

O uso de antidiabéticos orais é frequente para o controle da glicemia, conforme relatado em estudos com pessoas portadoras de DM2 (BRITO et al., 2019; MATOS; BRANCHTEIN, 2006; RODRIGUES, 2011; ROSSI; DA SILVA; FONSECA, 2016; TURCATTO; FARIA, 2011). Entretanto, no decorrer do tempo, ocorre a necessidade da insulinoterapia para algumas pessoas, pois devido ao quadro de hipersulinemia compensatória, desencadeada pela resistência à insulina, ocorrerá um estresse oxidativo com disfunção das células β pancreáticas contribuindo na diminuição da síntese e secreção da insulina com perda gradual e progressiva do controle glicêmico (FERREIRA et al., 2011; MACEDO et al., 2011; MATTHAEI et al., 2000). A adesão ao tratamento com medicamentos orais além de favorecer o controle da glicemia, podem retardar a falência das células beta pancreáticas na produção de insulina e conseqüentemente retardar a necessidade de insulinoterapia (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2019). Nesse estudo, poucos indivíduos da amostra usam insulina para o controle da glicemia, sendo o uso de antidiabéticos orais (hipoglicemiantes) associado à dieta foi a principal forma de controle glicêmico reportada.

A alta porcentagem de agregação familiar para DM2 foi observada na amostra em estudo. Sendo uma doença de herança multifatorial, a presença de DM2 em um familiar aumenta o risco de outro familiar apresentar a DM2. Estudos comparativos entre indivíduos com e sem histórico familiar para DM2 mostram que a glicemia em jejum elevada e a resistência insulínica são mais frequentes no primeiro grupo (CORRER et al., 2019; ROCHA et al., 2017; VITAL et al., 2019).

Sabe-se que o investimento no cuidado a pessoas com DM2 é essencial para a sobrevivência desse paciente, no entanto, a redução na incidência de novos casos nos próximos anos só será possível com programas de saúde direcionados também à prevenção do DM2 na parcela da população que não possui a doença, mas com casos na linha familiar. Dados sobre o histórico familiar para DM2, como os observados na presente pesquisa, apontam para a necessidade de acompanhamento de todos os membros da família do paciente em programas de prevenção tanto para a conscientização quanto para estimular consultas periódicas, prática regular de exercícios físicos e redução do peso corporal.

Estudos sobre a hereditariedade em doenças não mendelianas, como a DM2, ainda são pouco explorados na pesquisa científica. Entretanto, o crescimento da medicina personalizada torna a o conhecimento da genética do indivíduo uma ferramenta importante para a prevenção de doenças genéticas na população (IRIART, 2019; PINHO; SITNIK; MANGUEIRA, 2014). O conhecimento de cada gene envolvido e sua contribuição no desencadeamento de uma herança complexa é importante para o desenvolvimento de testes genéticos, que, na prática, permitirá identificar precocemente a predisposição genética do

indivíduo. Uma vez estabelecida a carga genética potencial (ou predisposição genética) para uma determinada doença ou condição patológica é possível redobrar a atenção em ações de prevenção, controle da doença, bem como às complicações (CRISPIM et al., 2006; VASSY; MEIGS, 2012).

Os dados apresentados reforçam, ainda, a importância na atenção primária por intervenções multiprofissionais que visem a conscientização com a propagação de conhecimentos claros. Pesquisas mostram que quanto maior a compreensão da condição de saúde, maior a participação ativa do indivíduo no processo de autocuidado e adesão ao tratamento medicamentoso e, portanto, maiores são as chances de mudanças de hábitos a fim de se prevenir as complicações (ROSSI; DA SILVA; FONSECA, 2016; SEIGNEMARTIN, 2018). Impactos positivos no prognóstico visam melhorar a qualidade de vida dos portadores da diabetes, redução na mortalidade e diminuição dos custos aos sistemas de saúde gerados pelas internações hospitalares para tratamentos com uma complexidade maior do que aqueles característicos da medicina preventiva.

Apesar de notória importância no contexto da saúde, não há dados na literatura médica científica publicados sobre a prevalência de DM2 para a população de Manaus. Dados sobre a população de DM2 permitem planejar os recursos destinados a assistência à saúde, ampliar a visão dos investimentos econômicos necessários e prioritários para a saúde do estado. Outros estudos de caracterização populacional que contribuam com dados robustos devem ser estimulados para o direcionamento de pesquisas científicas que atendam a demanda e a necessidade observada na rotina clínica e a formulação de políticas públicas ativas que promovam novas ações e intervenções necessárias ao controle da DM2 para os próximos anos.

5.2 ESTUDO DA AGREGAÇÃO FAMILIAR PARA *rs1801278*: UM VARIANTE ASSOCIADO A DM2.

A DM2 tem se tornado um problema de saúde pública mundial devido à alta prevalência na população e a perspectiva de aumento do número de novos casos ao longo dos próximos anos (INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION, 2019).

A etiologia de DM2 é multifatorial com uma heterogeneidade de fatores predisponentes em uma complexa interação entre genes, ambiente e fatores epigenéticos (HU; JIA, 2018).

Quanto a hereditariedade, é inegável a agregação familiar dessa condição, sendo um importante fator a ser considerado na prática médica. Estudos com gêmeos indicam uma taxa de concordância maior entre os pares monozigóticos que em dizigóticos. Esses dados

reforçam o papel significativo da base genética como fator de risco para a DM2 e explicam a frequente agregação familiar observada nos indivíduos com a patologia (CRISPIM et al., 2006; GLOYN; MCCARTHY, 2001; POULSEN et al., 1999).

A determinação do componente genético associado à hereditariedade, entretanto, não é tarefa fácil, pois o padrão poligênico de herança resulta em classes fenotípicas que ora se assemelham ao modelo mendeliano de herança, ora se assemelham a padrões que obedecem ao modelo limiar ou de propensão. Assim a hiperglicemia crônica, característica da doença, pode ser desencadeada por combinação de variantes de poucos a muitos genes predisponentes, dependendo obviamente da contribuição dos produtos de cada gene nas vias envolvidas com o metabolismo da glicose e sinalização da insulina (ALI, 2013; YONAMINE, 2017). Estudos de associação em genoma completo (*Genome-Wide Association Study* – GWAS) identificaram vários genes, cujas variantes conferem suscetibilidade para DM2, entre diferentes populações étnicas ao redor do mundo, entre esses, alguns são genes que codificam proteínas envolvidas na via de sinalização da insulina (HU; JIA, 2018; KHAN et al., 2012).

O gene *IRS1* codifica o substrato do receptor da insulina 1 (IRS-1), importante proteína de ancoramento (*docking protein*) da via de sinalização da insulina que quando fosforilado interage com a subunidade regulatória p85 da enzima PI3K para a transdução do sinal insulínico (METZ; HOUGHTON, 2011). Em estudos preliminares sobre a função do IRS-1 na ação da insulina, observou-se uma associação funcional entre IRS-1 e o transportador de glicose tipo 4 (GLUT-4) influenciando no transporte de glicose, principalmente em células musculares (KANAI et al., 1993). Estudos posteriores corroboraram essa associação destacando a relevância desse substrato na transdução do sinal insulínico (ARAKI et al., 1994; ARAUJO, 2005; CESARETTI; KOHLMANN JUNIOR, 2006; GUAL; LE MARCHAND-BRUSTEL; TANTI, 2005; SALTIEL; KAHN, 2001a).

Dados moleculares revelaram a presença de variantes do gene *IRS1* em pessoas com DM2 que podem afetar a expressão do gene ou a função da proteína, induzindo a resistência à insulina e aumentando o risco para DM2 (BURGUETE-GARCIA et al., 2010; ESPOSITO et al., 2003; FENG et al., 2013; LI et al., 2016; MARTÍNEZ-GÓMEZ et al., 2011; PRUDENTE et al., 2018; RUNG et al., 2009; SZENDROEDI et al., 2014; VOIGHT et al., 2010).

Dentre os variantes genéticos reportados no gene *IRS1*, destaca-se o *rs1801278*, objeto da presente pesquisa. Esse variante, de relevante prevalência entre os diabéticos, caracteriza-se por uma mutação *missense*, devido à substituição de uma glicina por uma arginina na posição 971 da cadeia polipeptídica do substrato IRS-1 (G971R). Essa troca é decorrente da mutação pontual c2911G>A da região codificante do gene *IRS1*. A substituição de um resíduo de glicina por um resíduo de arginina é significativa, uma vez que de fato a carga

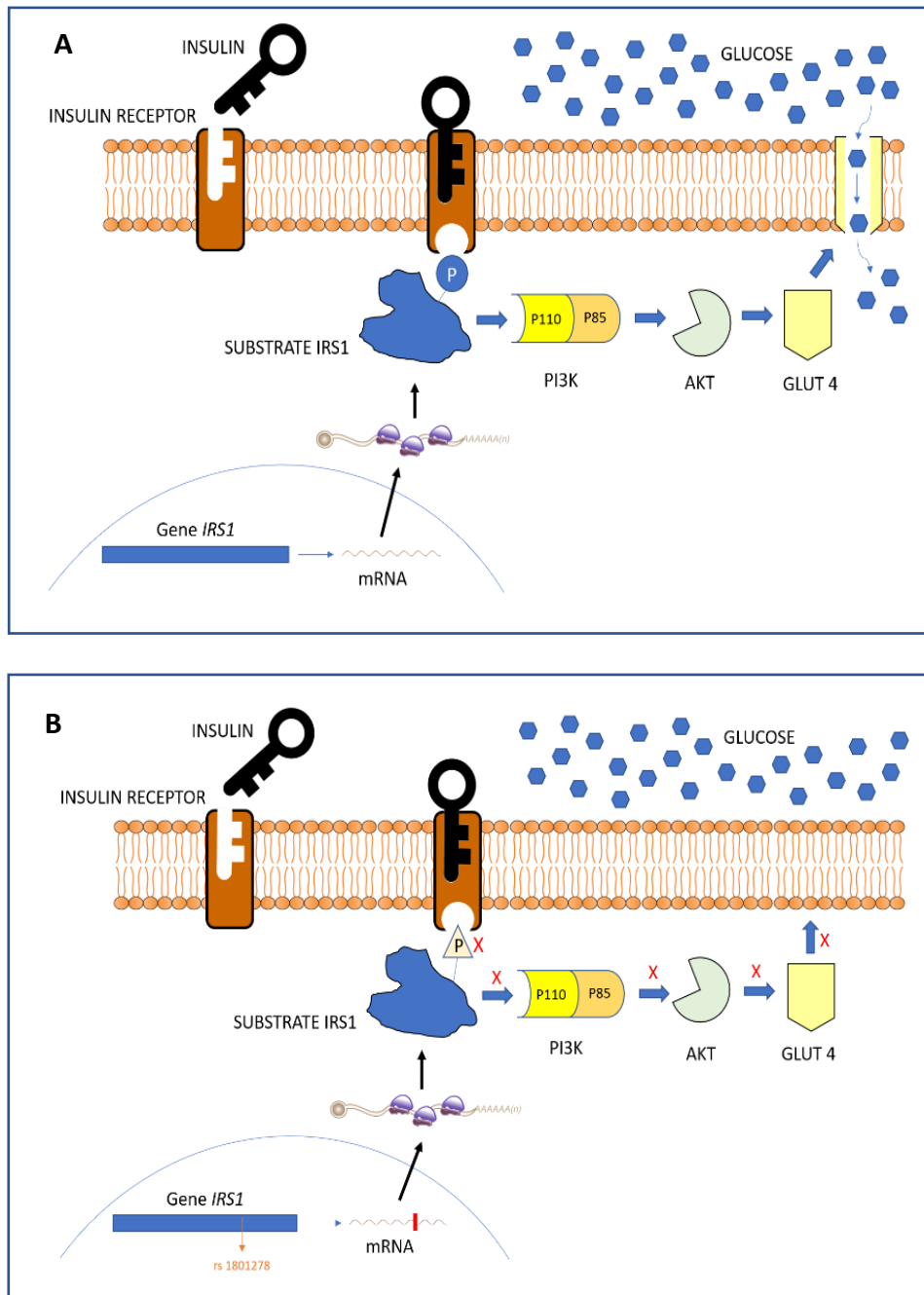
líquida é alterada, pois a glicina é um aminoácido neutro e a arginina um aminoácido polar básico (BURGUETE-GARCIA et al., 2010; Li et al., 2016). Informa-se que alguns autores se referem à posição de troca de glicina para arginina na posição 972, o que pode ser interpretado como resultado de ajustes finos nos dados apresentados do projeto genoma humano.

A associação do variante *rs1801278* à susceptibilidade a DM2 é reportada por vários estudos em diferentes populações e com diferenças significativas em amostras caso-controle, com maior frequência desse variante em pessoas com DM2 (BURGUETE-GARCIA et al., 2010; FENG et al., 2013; SABRINA PRUDENTE, ELEONORA MORINI, LORELLA MARSELLI et al., 2013). Expressiva associação desse variante ao risco de desenvolver a DM2 também é reportada em pesquisas de meta-análise (LI et al., 2016).

Hipóteses sobre a influência do variante *rs1801278* na sinalização da insulina sugerem que esse variante reduz a fosforilação do substrato IRS-1 em resíduos de tirosina que flanqueiam a sequência variante, reduzindo a ativação de PI3K e a transdução do sinal à jusante, cuja consequência final é a diminuição da translocação do GLUT-4 para a membrana plasmática (Figura 42). Esses dados indicam que esse variante contribui para a resistência à insulina em pessoas que carregam pelo menos um alelo com essa mutação (ALMIND et al., 1996; DE COSMO et al., 2013; HRIBAL et al., 2000; MCGETTRICK; FEENER; KAHN, 2005; PORZIO et al., 1999).

O padrão de herança poligênica, proposto para a DM2, implica a contribuição de vários genes na etiologia da doença e a hipótese da existência de poligenes assume que o valor aditivo de cada gene é o mesmo e, portanto, o conjunto de alelos é o fator genético determinante. Existem diversos genes que podem contribuir para o desenvolvimento da DM2, entretanto, aparentemente existe certa hierarquia e o valor aditivo não seja o mesmo para todos e a mutação em genes específicos parece preponderar sobre os demais. O variante *rs1801278* exemplifica bem essa proposição. Os dados apresentados pela literatura sobre o mecanismo molecular do variante *rs1801278* mostram que o mesmo representa risco aumentado para a resistência à insulina, principal fator fisiológico determinante para a manifestação da DM2 (ALBEGALI et al., 2019; DERAKHSHAN et al., 2015). O IRS-1 é o primeiro substrato citoplasmático a ser fosforilado na transdução do sinal insulínico, é possível que mutações que alterem sua expressão, estrutura ou função, tenham papel majoritário no fenótipo da RI e consequentemente DM2, especialmente em indivíduos com mutações em outros genes também relacionados à doença. As mutações nos demais genes, e o componente ambiental, podem ajudar a explicar a heterogeneidade da cronologia de desenvolvimento e severidade da doença.

Figura 42: **Modelo de transdução do sinal insulínico via fosforilação do substrato IRS-1 selvagem e mutante:**
 (A) Funcionamento da via de sinalização da insulina considerando o gene *IRS1* sem a sequência variante *rs1801278* (selvagem). A expressão do gene sintetiza o substrato IRS-1 cuja fosforilação transcorre normal. Ao ser fosforilado pelo receptor da insulina, o substrato IRS-1 desencadeia a transdução do sinal insulínico a jusante, ativando a translocação do transportador de glicose 4 (GLUT-4) para a membrana plasmática, garantindo a entrada de glicose para a célula e, portanto, o controle da glicemia. (B) Funcionamento da via de sinalização da insulina considerando o gene *IRS1* com a sequência variante *rs1801278* (mutante). Nesse caso, a expressão do gene produz o substrato IRS-1 com alteração na fosforilação, afetando a transdução do sinal insulínico a jusante. Devido a essa condição, a translocação de GLUT-4 para a membrana plasmática é diminuída, caracterizando a resistência à insulina e desencadeando o acúmulo de glicose plasmática.



Os dados obtidos, na presente pesquisa, a partir da análise familiar reforçam que o variante *rs1801278* é relevante em estudos de agregação familiar e, ajudam a esclarecer o porquê de a predisposição familiar ser um fator de risco importante para DM2. Assim, familiares de portadores da DM2 devem ser alvos preferenciais de investigação genética voltada ao estudo genético preditivo. Identificado o potencial genético de risco no indivíduo, é possível intervir com ações de prevenção primária e secundária, buscando-se evitar as complicações clínicas decorrentes da hiperglicemia crônica da DM2, favorecendo uma melhor qualidade para os portadores, principalmente na terceira idade e ainda conseqüentemente reduzindo o impacto dos altos custos aos sistemas de saúde para o tratamento da doença, comorbidades e suas complicações (SARAIVA et al., 2016).

Um estudo de outras variantes associados a DM2 e resistência à insulina em cinco *loci* no gene *IRS1*, na mesma população de estudo da presente pesquisa, foi realizado por um membro do grupo de pesquisa do laboratório. Por meio do sequenciamento de Sanger e validação por análise do High Resolution Melt (HRM), Rabelo (2019) identificou os SNPs *rs934167*, *rs1801123*, *rs7578326*, *rs2943640*, *rs2943641* em indivíduos da população em estudo. Esse trabalho reforça a importante associação do gene *IRS1* no desencadeamento da DM2, já relatado na literatura.

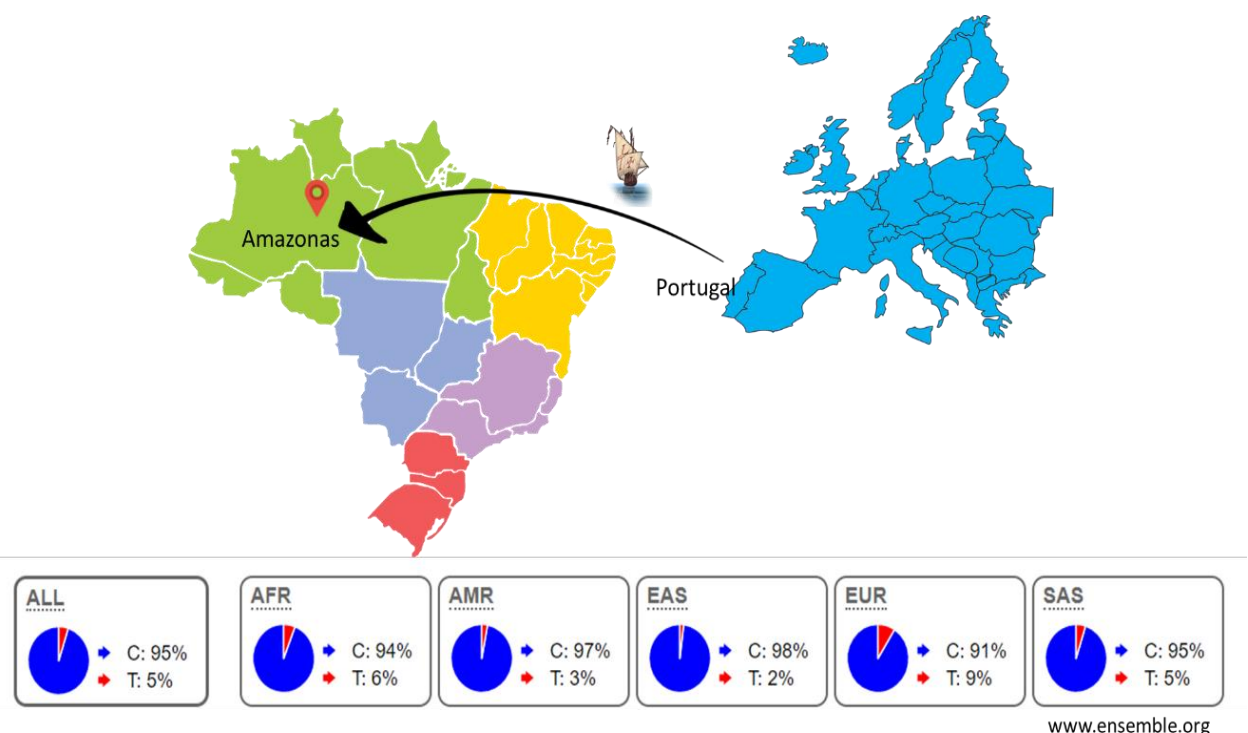
Os resultados do presente estudo mostram a importância do fator genético na etiologia da DM2, cuja ação é potencializada por outros fatores de risco tais como obesidade, idade, dieta e sedentarismo (HU; JIA, 2018). Reforça ainda a necessidade de mais iniciativas voltadas à coleta de dados genéticos visando preencher essa lacuna para a população brasileira, pois a alta miscigenação da população associada à regionalização de processos migratórios, e, portanto, fluxo de genes, provavelmente estabeleceram um *background* genético heterogêneo entre as populações das diferentes regiões do país. O dado genético além de robustecer a epidemiologia de determinada doença tem aplicabilidade imediata na localidade onde é gerado, subsidiando tomadas de decisão pela equipe médica visando à prevenção, controle ou tratamento paliativo. O incremento de dados moleculares sobre a genética da DM2 poderá, em médio e longo prazo, fornecer um painel de possíveis marcadores genéticos de risco para essa doença, o que facilitará a identificação precoce do potencial genético de indivíduos com histórico familiar.

Nesse contexto, esse é o primeiro trabalho que reporta dados genéticos na cidade de Manaus, que concentra 52% da população do Amazonas, Estado da Região Norte do Brasil, onde houve uma forte influência da imigração europeia, principalmente portuguesa (BENCHIMOL, 1999; MONTEIRO, 2002). Estudos de Marcadores informativos para ancestralidade (Ancestry Informative Markers - AIM) mostram que a estimativa de

ancestralidade europeia em Manaus é de 0.459, em comparação a 0.163 para ancestralidade africana e 0.378 para ancestralidade de americanos nativos, relevando-se que a imigração de povos europeus foi um evento importante para composição genética da população brasileira (SALOUM DE NEVES MANTA et al., 2013).

Nossos resultados corroboram os dados disponíveis na plataforma Ensembl *genome browser* (http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Variation/Population) (HUNT et al., 2018) sobre o variante *rs1801278*, cuja frequência é elevada na Europa o que sustenta a imigração como um fator importante de fluxo gênico para a população do Estado e provavelmente para a população brasileira (Figura 43). No entanto, é preciso destacar-se que diferentes regiões brasileiras receberam diferentes imigrantes europeus. A região Sul do Brasil, por exemplo, teve forte imigração de italianos, espanhóis e alemães, enquanto a Região Sudeste recebeu também colônias de imigrantes japoneses. Essa visível miscigenação diferencia o país não só em relação a cultura e costumes, mas também quanto a distribuição dos genes e seus variantes nos diferentes territórios. Essa compreensão é relevante e reforça a importância do estudo genético populacional no Brasil, a fim de caracterizar o “pool” gênico e a herança de diferentes mutações que podem ter uma frequência elevada em algumas regiões e baixa ou até nula em outras regiões, devido às correntes migratórias.

Figura 43: Mapa geográfico do Brasil e da Europa ilustrando a imigração da região norte do Brasil, com predominância da população portuguesa. Dados obtidos a partir da plataforma Ensemble Home mostram a maior frequência do variante *rs1801278* na Europa (EUR).



Os dados apresentados na presente pesquisa justificam a necessidade de mais esforços concentrados em estudos genéticos da via de transdução do sinal insulínico a fim de se estabelecer um painel de risco genético contendo todos os genes e suas reais contribuições na patogênese multifatorial da DM2.

Considerando o impacto potencial dessa doença para as próximas gerações, é preciso reconhecer que apenas as políticas públicas atualmente adotadas são insuficientes para deter o avanço da síndrome diabética, o que torna imprescindível um esforço conjunto de pesquisadores e equipes de saúde para as medidas diagnósticas, preventivas, de tratamento e orientação. A identificação de marcadores moleculares relevantes para DM2 é uma alternativa viável que favorece a identificação precoce de diabéticos em potencial e permite implementação de medidas re-educativas e/ou de prevenção que podem retardar o aparecimento da doença ou mitigar seus efeitos, conferindo melhor qualidade de vida a seu portador. Assim, o painel de risco genético será um importante aliado da medicina preventiva no combate a DM2.

5.3 ESTUDO DO IMPACTO DO VARIANTE *rs1801278* NA TRANSDUÇÃO DO SINAL INSULÍNICO.

A comunicação entre células ocorre a partir de sinais biológicos que em conjunto desencadeiam a sinalização celular. Moléculas sinalizadoras, como os hormônios, ligam-se a receptores de membrana celular em células-alvo e pelo processo de transdução de sinal a moléculas sinalizadoras intracelulares a jusante desencadeiam uma resposta celular importante para a fisiologia normal do organismo. A transdução de sinal ocorre principalmente por meio de processos de fosforilação das proteínas que compõem uma cascata de sinalização celular (JORGENSEN, C.; LINDING, 2008).

A transferência de grupos fosfatos de ATP para proteínas que participam do processo de transdução de sinal celular é catalisada por enzimas quinases e ocorre na hidroxila das cadeias laterais dos aminoácidos serina, treonina e tirosina. A fosforilação funciona como um modulador positivo ou negativo, isto é, ativando ou inibindo temporariamente a atividade de proteínas de uma cadeia de sinalização (SILVA et al., 2009).

A sinalização da insulina é uma via de transdução de sinal, fortemente regulada, importante para a homeostase da glicose. Qualquer alteração na via contribui para o quadro de resistência à insulina, cuja persistência desencadeia a hiperglicemia crônica, principal manifestação clínica da DM2 (BOURA-HALFON; ZICK, 2009). Sobre essa via, sabe-se que a expressão do substrato IRS-1 é acentuadamente reduzida no estado de resistência à insulina (PEDERSON; KRAMER; RONDINONE, 2001). Defeitos na fosforilação desse substrato estão relacionados a essa redução e, portanto, desregulação da transdução da sinalização da insulina

(BOURA-HALFON; ZICK, 2009; COPPS; WHITE, 2012; PAZ et al., 1997b; TANIGUCHI; EMANUELLI; KAHN, 2006).

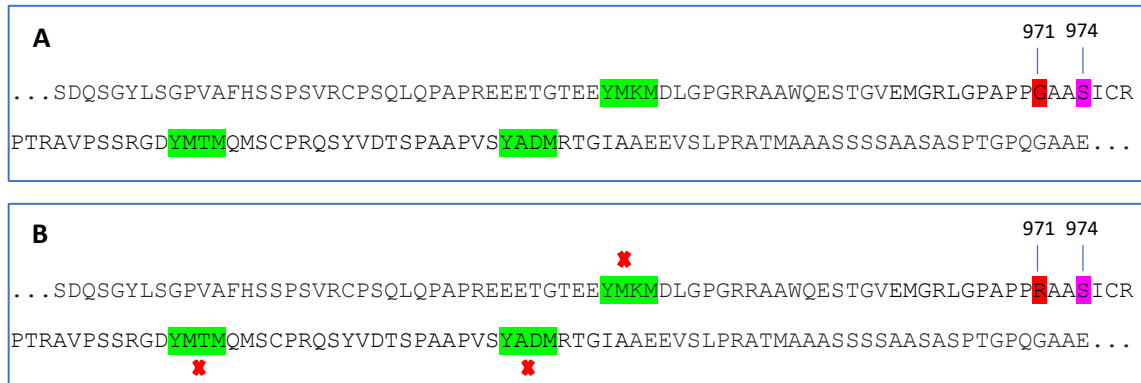
Para verificar o impacto do variante *rs1801278* no funcionamento do substrato IRS-1 e na transdução do sinal insulínico, a presente pesquisa comparou a interação molecular entre o substrato IRS-1 mutante e selvagem com PI3K e analisou o padrão de fosforilação em peptídeos IRS-1 mutante e selvagem. Os resultados mostraram que há uma menor interação do substrato IRS-1 mutante com o PI3K e maior fosforilação no peptídeo IRS-1 mutante. A análise da fosforilação *in silico* do substrato IRS-1 mutante confirmou um sítio de fosforilação no resíduo de Ser⁹⁷⁴ para a proteína quinase A (PKA), simulado na modelagem molecular, não observado no substrato IRS-1 selvagem, o que explica a maior fosforilação observada no substrato mutante.

Experimentos mostram que o aumento da fosforilação em resíduos de serina do substrato IRS-1 afeta a transdução do sinal, pois pode degradar o substrato ou impedir sua fosforilação em resíduos de tirosina pelo receptor da insulina interrompendo pelo menos três interações de IRS-1: com a membrana plasmática, com o receptor de insulina ou com efetores à jusante, como o PI3K. (BOURA-HALFON et al., 2007; BOURA-HALFON; ZICK, 2009; PAZ et al., 1997a; TANTI et al., 1994). A fosforilação em resíduos de tirosina é bloqueada ou reduzida quando ocorre a fosforilação em resíduos de serina adjacentes, o que potencialmente impede o reconhecimento dos sítios YMXM e YXXM pelas moléculas com domínio SH2 à jusante do substrato IRS-1, como o PI3K (BOURA-HALFON; ZICK, 2009; SOMMERFELD et al., 2004; VIRKAMÄKI et al., 1999).

A Ser⁹⁷⁴ está localizada na região da cauda terminal (domínio não PTB) do substrato IRS-1 que contém também vários resíduos de tirosina. Regiões adjacentes a posição 971 e 974, mostram três sítios de reconhecimento (YMXM e YXXM¹¹) para a ligação da subunidade p85 da PI3K (figura 44). Portanto, a troca do aminoácido glicina por alanina, consequência do variante *rs1801278* no gene *IRS1*, gera desequilíbrio na fosforilação dos resíduos de aminoácidos envolvidos e reduz o reconhecimento e interação do complexo IRS-1 e PI3K, prejudicando a transdução do sinal insulínico e desencadeando a resistência à insulina (figura 45) (ALMIND et al., 1996; MOTHE; OBBERGHEN, 1996; VIRKAMÄKI et al., 1999).

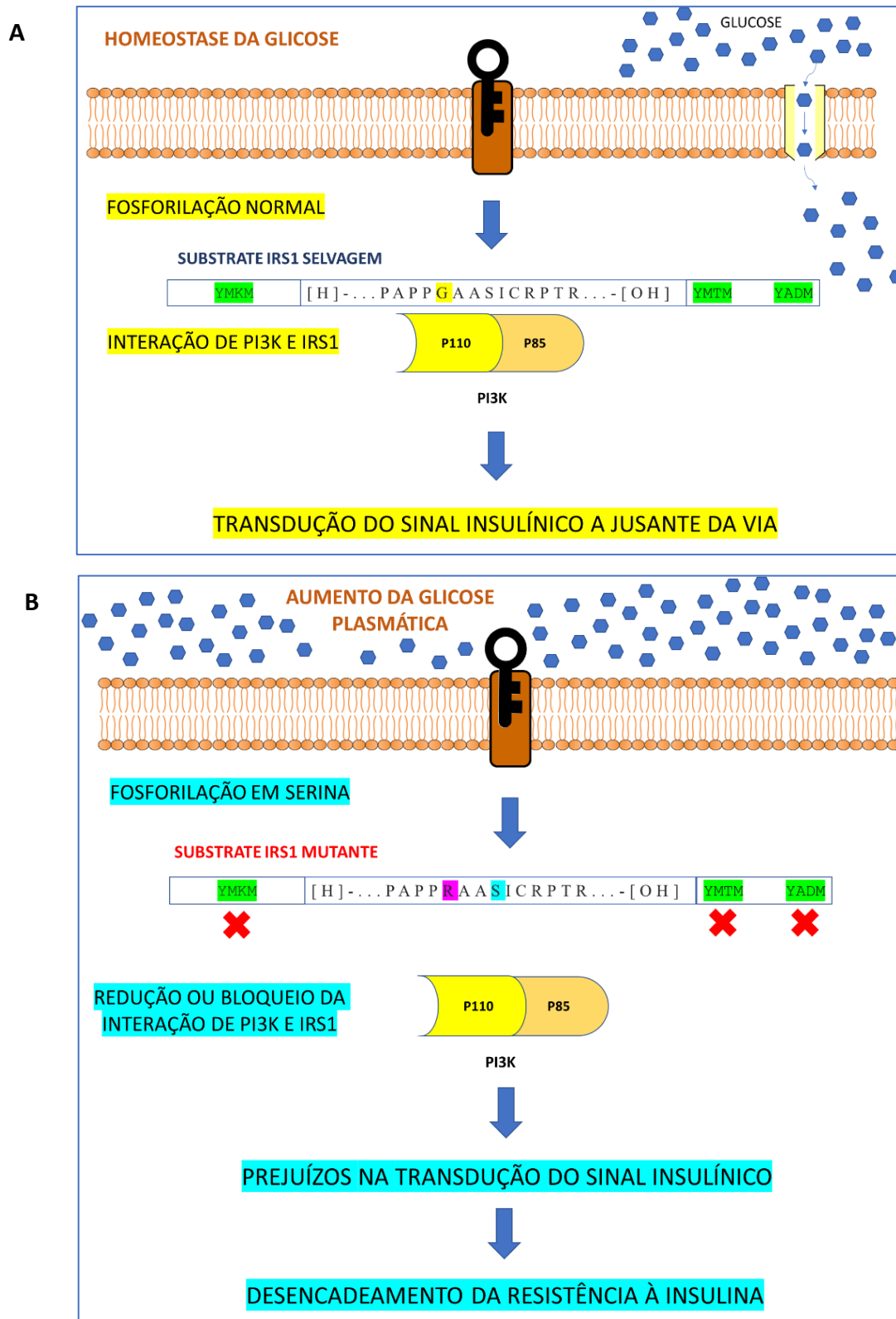
¹¹ Y – tirosina; M – metionina; X – qualquer aminoácido.

Figura 44: **Parte da sequência de aminoácidos do substrato IRS-1.** (A) Substrato IRS-1 selvagem, onde observa-se o resíduo de glicina (G) na posição 971 (vermelho) e o resíduo de serina (S) na posição 974 (lilás). Adjacentes a serina e glicina, observa-se sítios de reconhecimento (YMXM e YXXM*) (em verde) para moléculas com domínio SH2 que quando fosforilados em resíduos de tirosina (Y) permitem a interação entre IRS-1 e PI3K. (B) No substrato IRS-1 mutante, a glicina (G) é substituída por arginina (R) na posição 971. Observou-se que no IRS-1 mutante há aumento de fosforilação em serina. Segundo a literatura, a fosforilação em resíduos de tirosina (Y) é bloqueada ou reduzida quando ocorre a fosforilação em resíduos de serina adjacentes. Por isso, no IRS-1 mutante, a PI3K, molécula que contém domínio SH2, não reconhece IRS-1 e transdução do sinal da insulina é bloqueado.



*YMXM, onde Y – tirosina, M – Metionina, X – qualquer aminoácido.

Figura 45: **Modelo sobre o impacto da transdução do sinal insulínico devido o desequilíbrio na fosforilação do substrato IRS-1 selvagem e mutante:** (A) Funcionamento da via de sinalização com o substrato **IRS-1 selvagem** (971G). Não há aumento de fosforilação para o substrato IRS-1 selvagem e a transdução do sinal da insulina desencadeia a translocação de GLUT 4 para a membrana plasmática, havendo a entrada de glicose e controle da glicemia plasmática. (B) Funcionamento da via de sinalização da insulina com o substrato **IRS-1 mutante** (971R). Há aumento da fosforilação em serina (974S), desencadeando prejuízos para a transdução do sinal da insulina, contribuindo para o desencadeamento da resistência à insulina e aumento da glicemia plasmática.



Um experimento com culturas de adipócitos tratadas com altas taxas de insulina mostrou que a hipersulinemia induziu a fosforilação de serina e treonina do substrato IRS-1, degradando esse substrato, impedindo a transdução do sinal insulínico e reduzindo a síntese de GLUT-4 (PEDERSON; KRAMER; RONDINONE, 2001). Em outro experimento, a eliminação de um domínio rico em resíduos de serina e treonina próximo ao domínio PTB do substrato IRS-1 evitou a degradação do substrato, mesmo em condições de hipersulinemia (BOURA-HALFON et al., 2007).

Ao longo da cadeia de aminoácidos do substrato IRS-1, existe mais de 70 resíduos de serina com potencial para fosforilação (TANIGUCHI; EMANUELLI; KAHN, 2006). Cabe aos pesquisadores a definição de quais desses resíduos estão envolvidos na capacidade de funcionamento do substrato na via de sinalização da insulina (COPPS; WHITE, 2012; SOMMERFELD et al, 2004).

Visando avaliar a fosforilação do substrato IRS-1 em células musculares, foram criados camundongos transgênicos mutantes para IRS-1, com substituição de três resíduos de serina (Ser³⁰², Ser³⁰⁷, Ser⁶¹²) por alanina e comparados com camundongos selvagem. Os camundongos transgênicos apresentaram melhor tolerância a glicose, além de aumento da fosforilação da tirosina do IRS-1 e ligação ao p85 de PI3K em resposta a insulina (MORINO; NESCHEN; BILZ, 2008).

Observou-se também que a hipersulinemia eleva a fosforilação na Ser³¹⁸ do substrato IRS-1, localizada próximo ao domínio PTB, o que presumivelmente afeta a interação do IRS-1 com o receptor de insulina (MOESCHEL et al., 2004). Ainda, em resposta a processos inflamatórios, algumas quinases podem fosforilar serinas, como a Ser²⁴ localizada dentro de sítios do domínio PH do substrato IRS-1, gerando uma situação crítica para a interação do complexo IRS-1 e receptor de insulina (BOURA-HALFON; ZICK, 2009; KIM et al., 2005). Em um estudo com células musculares de pessoas com DM2, observou-se maior fosforilação da Ser⁶³⁶ do substrato IRS-1 com redução da ativação de PI3K (BOUZAKRI et al., 2003).

Uma abordagem *in vitro* para identificar locais de fosforilação da proteína quinase C ζ no substrato IRS-1 e suas implicações funcionais verificou que a fosforilação nos resíduos de Ser⁴⁹⁸ e Ser⁵⁷⁰ reduz a fosforilação em resíduos de tirosina no substrato IRS-1 pelo receptor da insulina. Esses resíduos de serinas ficam adjacentes a seis domínios de ligação PI3K e, por isso, observou-se também a não interação quase completa do substrato IRS-1 ao domínio p85 da PI3K (SOMMERFELD ET AL, 2004).

Sendo a DM2 de herança genética poligênica, a aplicação do sequenciamento do exoma é uma estratégia interessante para melhor compreensão de doenças que envolvem múltiplos genes. A análise do exoma do indivíduo P12, portador do variante *rs1801278*, revelou

que esse indivíduo possui seis SNVs em diferentes genes relacionados a sinalização da insulina. Entretanto, segundo a análise com as ferramentas PolyPhen-2 e SIFT somente o variante *rs1801278* possui impacto prejudicial na estabilidade e funcionamento do seu respectivo produto gênico, o substrato IRS-1 (figura 46). Essa análise, reforça a importância do *rs1801278* em desestabilizar o funcionamento da via de sinalização da insulina, diminuindo a captação da glicose e desencadeando o quadro de hipersulinemia e posteriormente a resistência à insulina, uma das principais causas da DM2.

Embora mecanismos adicionais como fatores ambientais e outros genes contribuam, os resultados sobre a interação molecular do IRS-1 mutante e PI3K e fosforilação do substrato IRS-1 mutante apresentados nessa pesquisa conexos a literatura científica mostram claramente o impacto do variante *rs1801278* e seu papel significativo na patogênese da resistência à insulina em humanos. Diante dos resultados obtidos, ressalta-se a importância da extensão de pesquisas com esse variante em termos populacionais a fim de maior conhecimento da frequência desse na população amazonense e brasileira.

A regulação ineficiente da sinalização insulínica é um fator crítico no desenvolvimento da resistência à insulina e desencadeamento da diabetes. Em uma análise de seis variáveis em pessoas com diagnóstico recente de diabetes, observou-se um grupo (cluster 3) com grave resistência à insulina e alto IMC. Em particular, esses indivíduos tiveram um risco significativamente maior de doença renal diabética em comparação a indivíduos de outros grupos. Os autores ressaltam em seus resultados que o tratamento medicamentoso desse grupo não diferia dos indivíduos de outro grupo com menor risco de complicações clínicas (cluster 4 e 5). Esses dados apontam para a necessidade de uma classificação para diabetes mais refinada, visando-se direcionar um tratamento adequado para a etiologia da diabetes do paciente. (AHLQVIST et al., 2018).

Para que no futuro isso seja possível, pesquisas devem reforçar o conhecimento sobre a resistência à insulina, especialmente no domínio de análise de genes relacionados à sinalização da insulina. Além disso, uma melhor compreensão deste processo fisiopatológico pode levar ao desenvolvimento de perfis genéticos em indivíduos assintomáticos para a implementação de ações que visem o controle da glicemia e novas terapias e alvos medicamentosos para o tratamento da resistência à insulina e Diabetes Tipo 2 (BOUZAKRI et al, 2003; COPPS AND WHITE, 2014). Para uma doença com alta estimativa, é importante refletir que a medicina curativa/terapêutica não é mais suficiente e admitir que a medicina preventiva é a melhor oportunidade para evitar que as estimativas atuais, sobre a diabetes, tornem-se uma realidade para as próximas gerações.

6 CONCLUSÕES

- A amostra composta de pessoas com Diabetes *Mellitus* tipo 2 teve maior prevalência do sexo feminino, média de idade de $61,11 \pm 14,573$ e faixa etária predominante de 65 a 74 anos de idade. Observou-se elevada frequência de hipertensão arterial, complicações oftalmológicas, sobrepeso, obesidade e agregação familiar.
- Quanto às variáveis comportamentais, observou-se o uso do tabaco e consumo de bebidas alcóolicas em algum momento da vida e baixa prática de atividade física regular.
- Houve associação estatística significativa entre as variáveis: tempo de diagnóstico e complicações clínicas, dislipidemia e mais de uma complicação clínica, IMC e complicações oftalmológicas e IMC e mais de uma complicação clínica.
- O variante *rs1801278* (c.2911G>A; p.Gly971Arg), identificado na amostra da presente pesquisa, foi confirmado com a técnica de PCR-RFLP com uso da enzima de restrição *SmaI*. Esse método de identificação se mostrou uma alternativa viável para a identificação do variante em estudo.
- Identificou-se o variante *rs1801278* em indivíduos sintomáticos e assintomáticos de quatro gerações de uma família, relevando-se a importância desse em estudos de agregação familiar, testes preditivos e aconselhamento genético.
- A análise do exoma mostrou seis variantes não sinônimas em genes associados a via de sinalização da insulina, no entanto, programas de predição de variantes mostraram que somente *rs1801278* é prejudicial ao funcionamento da via. Considerando que existem múltiplos genes envolvidos no desencadeamento da resistência à insulina, o variante estudado no gene *IRS1* apresenta-se com um valor aditivo importante no desencadeamento dessa condição.
- Ensaios de modelagem e ancoramento molecular mostram baixa interação do complexo IRS-1 mutante (Arg⁹⁷¹) fosforilado na Ser⁹⁷⁴ e domínio SH2 de PI3K.
- Testes de fosforilação *in silico* e *in vitro* revelaram o aumento da fosforilação em serina (Ser⁹⁷⁴) no substrato IRS-1 mutante (Arg⁹⁷¹).
- O estudo do variante *rs1801278* confirma a associação de risco do *rs1801278* a resistência à insulina e DM2, visto que influencia no aumento da fosforilação do substrato IRS-1 interferindo na formação do complexo IRS-1/PI3K prejudicando o sinal da transdução do sinal insulínico.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABEL, J. J. Crystalline Insulin. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 12, n.2, p. 132-136, 1926.
- ADZHUBEI, I. A. et al. A method and server for predicting damaging missense mutations. **Nature Methods**, v. 7, n. 4, p. 248–249, 2010.
- ADZHUBEI, I.; JORDAN, D. M.; SUNYAEV, S. R. Predicting functional effect of human missense mutations using PolyPhen-2. . 2013, p. 1–41.
- AEKPLAKORN, W. et al. A risk score for predicting incident diabetes in the Thai population. **Diabetes Care**, v. 29, n. 8, p. 1872–1877, 2006.
- AHLQVIST, E. et al. Novel subgroups of adult-onset diabetes and their association with outcomes: a data-driven cluster analysis of six variables. **The Lancet Diabetes and Endocrinology**, v. 6, n. 5, p. 361–369, 2018.
- ALBEGALI, A. A. et al. Genetic association of insulin receptor substrate-1 (IRS-1, rs1801278) gene with insulin resistant of type 2 diabetes *mellitus* in a Pakistani population. **Molecular Biology Reports**, v. 1, n. 0123456789, 2019.
- ALBERTS, B. ET AL. **Biologia molecular da célula**. 6. ed. Porto Alegre: ARTMED, 2017.
- ALI, O. Genetics of type 2 diabetes. **World J Diabetes**, v. 15, n. 4, p. 114–123, 2013.
- ALMEIDA, J. S. DE;; ALMEIDA, J. M. DE. A educação em saúde e o tratamento do diabetes *mellitus* tipo 2 em uma Unidade de Saúde da Família. **Rev Fac Ciênc Méd Sorocaba.**, v. 20, n. 1, p. 13–17, 2016.
- ALMIND, K. et al. A common amino acid polymorphism in insulin receptor substrate-1 causes impaired insulin signaling. Evidence from transfection studies. **Insulin Resistance Caused by IRS-1 Variants**, v. 97, n. 11, p. 2569–2575, 1996.
- ALVES, R. DOS S. R. et al. Blood glucose predictive model after exercise session for physically active type 2 diabetes. **Diabetology & Metabolic Syndrome**, v. 11, p. 69, 2019.
- ARAKI, E. et al. Alternative pathway of insulin signalling in mice with targeted disruption of the IRS-1 gene. **Nature**, v. 372, p. 186–190, 1994.
- ARAUJO, E. P. D. E. **Os efeitos da inibição aguda da expressão do substrato-1 do receptor de insulina (irs-1) sobre a secreção e ação da insulina em ratos wistar**. [s.l.] Universidade Estadual de Campinas, 2005.
- ARAÚJO, S. T.; MOREIRA, T. R. DIABETES CONSULTING:AN EDUCATION-CENTERED APPROACH. **Diabetology & Metabolic Syndrome**, v. 11, n. 1, p. p63, 2019.
- ARSA, G. et al. Diabetes *mellitus* tipo 2: Aspectos fisiológicos, genéticos e formas de exercício físico para seu controle. **Revista Brasileira de Cineantropometria e Desempenho Humano**, v. 11, n. 1, p. 103–111, 2009.
- BAHIA, L. R. et al. The Costs of Type 2 Diabetes *Mellitus* Outpatient Care in the Brazilian. **JVAL**, v. 14, n. 5, p. S137–S140, 2011.
- BASSI, D. et al. Effects of coexistence hypertension and type II diabetes on heart rate variability and cardiorespiratory fitness. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 111, n. 1, p. 64–72, 2018.
- BENCHIMOL, S. **Amazônia: Formação social e cultural**. [s.l.] Valer / EDUA, 1999.
- BERTOLDI, A. D. et al. Epidemiology, management, complications and costs associated with type 2 diabetes in Brazil: A comprehensive literature review. **Globalization and Health**, v. 9, n. 1, p. 1–12, 2013.

- BLOM, N.; GAMMELTOFT, S.; BRUNAK, S. Sequence and structure-based prediction of eukaryotic protein phosphorylation sites. **Journal of Molecular Biology**, v. 294, n. 5, p. 1351–1362, 1999.
- BOSCO, A. et al. Retinopatia Diabética. **Arq Bras Endocrinol Metab** vol, v. 49, n. 2, p. 217–227, 2005.
- BOURA-HALFON, S. et al. A novel domain mediates post-ubiquitination-independent, insulin-induced proteasomal degradation of IRS-1. In: SYMPOSIUM, R. B. D.-C. (Ed.). **Diabetes and Obesity**. 3rd. ed. Jerusalem, Israel: [s.n.]. p. 59.
- BOURA-HALFON, S.; ZICK, Y. Phosphorylation of IRS proteins, insulin action, and insulin resistance. **AJP: Endocrinology and Metabolism**, v. 296, n. 4, p. E581–E591, 2009.
- BOUZAKRI, K. et al. Reduced activation of phosphatidylinositol-3 kinase and increased serine 636 phosphorylation of insulin receptor substrate-1 in primary culture of skeletal muscle cells from patients with type 2 diabetes. **Diabetes**, v. 52, p. 1319–1325, 2003.
- BRASIL.MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Planos de ações estratégicas para o enfrentamento das doenças crônicas não transmissíveis (DCNT) no Brasil 2011-2022**. Brasília: Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Análise de situação de Saúde., 2016.
- BRITO, V. R. R. et al. Adhesion to diabetes *mellitus* type 2 medical treatment. **Diabetology & Metabolic Syndrome**, v. 11, n. 1, p. 13, 2019.
- BRUMMER, T.; SCHMITZ-PEIFFER, C.; DALY, R. J. Docking proteins. **FEBS Journal**, v. 277, n. 21, p. 4356–4369, 2010.
- BURGUETE-GARCIA, A. I. et al. Association of Gly972Arg polymorphism of IRS1 gene with type 2 diabetes *mellitus* in lean participants of a national health survey in Mexico: a candidate gene study. **Metabolism: Clinical and Experimental**, v. 59, n. 1, p. 38–45, 2010.
- CAIXETA, E.T.; OLIVEIRA, A.C.B.; BRITO, G.G.; SAKIYAMA, N. S. Tipos de Marcadores Moleculares. In: BORÉM, A.; CAIXETA, E. (Ed.). **Marcadores Moleculares**. 2ª Edição ed. Viçosa: UFV, 2009. p. 11–93.
- CARVALHEIRA, J. B. C.; ZECCHIN, H. G.; SAAD, M. J. A. Vias de Sinalização da Insulina. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 46, n. 4, p. 419–425, 2002.
- CARVALHO, R. A. DE. Avaliação do método de sequenciamento de nova geração no diagnóstico genético de neoplasia endócrina múltipla tipo 1. **Avaliação do método de sequenciamento de nova geração no diagnóstico genético de neoplasia endócrina múltipla tipo 1 Dissertação**, p. 87, 2016.
- CECILIO, H. P. M. et al. Comportamentos e comorbidades associados às complicações microvasculares do diabetes. **Acta Paul Enferm**, v. 28, n. 2, p. 113–119, 2015.
- CESARETTI, M. L. R.; KOHLMANN JUNIOR, O. Modelos experimentais de resistência à insulina e obesidade: lições aprendidas. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 50, n. 2, p. 190–197, 2006.
- CISZAK, E.; SMITH, G. D. Crystallographic Evidence for Dual Coordination around Zinc in the T3R3 Human Insulin Hexamer. **Biochemistry**, v. 33, n. 6, p. 1512–1517, 1994.
- COCATE, P. G.; DOMINGUES, S. F.; NATALI, A. J. Concentrações sanguíneas de adiponectina e exercício físico: associações com a sensibilidade insulínica. **Revista Brasileira de Ciências do Esporte**, v. 33, n. 3, p. 787–798, 2011.
- COPPS, K.; WHITE, M. Regulation of insulin sensitivity by serine/threonine phosphorylation of insulin receptor substrate proteins IRS1 and IRS2. **Diabetologia**, v. 55, n. 10, p. 2565–2582, 2012.
- CORRÊA, P. C. R. P. " Tabagismo , hipertensão e diabetes - reflexões ". v. 29, n. 1, p. 19–24, 2003.
- CORRER, C. J. et al. Blue diabetes November campaign: screening of undiagnosed diabetes *Mellitus* in community pharmacies in Brazil. **Diabetology & Metabolic Syndrome**, v. 11, n. 1, p. 38, 2019.

- COSTA, A. F. et al. Carga do diabetes *mellitus* tipo 2 no Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 33, n. 2, p. 1–14, 2017.
- CREATORE, M. I. et al. Age- and sex-related prevalence of diabetes *mellitus* among immigrants to Ontario, Canada. **Cmaj**, v. 182, n. 8, p. 781–789, 2010.
- CRISPIM, D. et al. Familial history of type 2 diabetes in patients from Southern Brazil and its influence on the clinical characteristics of this disease. **Arquivos brasileiros de endocrinologia e metabologia**, v. 50, n. 5, p. 862–8, 2006.
- DE BEM, A. F.; KUNDE, J. A importância da determinação da hemoglobina glicada no monitoramento das complicações crônicas do diabetes *mellitus*. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 42, n. 3, p. 185–191, 2006.
- DE COSMO, S. et al. The IRS1 G972R polymorphism and glomerular filtration rate in patients with type 2 diabetes of European ancestry. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 28, n. 12, p. 3031–3034, 2013.
- DEN DUNNEN, J. T. et al. HGVS Recommendations for the Description of Sequence Variants: 2016 Update. **Human Mutation**, v. 37, n. 6, p. 564–569, 2016.
- DERAKHSHAN, A. et al. Relationship of hyperinsulinaemia, insulin resistance and β -cell dysfunction with incident diabetes and pre-diabetes: the Tehran Lipid and Glucose Study. **Diabetic Medicine**, v. 32, n. 1, p. 24–32, 2015.
- DRAZNIN, B. Molecular mechanisms of insulin resistance: Serine phosphorylation of insulin receptor substrate-1 and increased expression of p85 α : The two sides of a coin. **Diabetes**, v. 55, n. 8, p. 2392–2397, 2006.
- ESPOSITO, D. L. et al. Clinical case seminar: A novel T608R missense mutation in insulin receptor substrate-1 identified in a subject with type 2 diabetes impairs metabolic insulin signaling. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 88, n. 4, p. 1468–1475, 2003.
- ESTEVEZ, J. et al. Fatores de risco para retinopatia diabética. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, v. 52, n. 3, p. 431–441, 2008.
- FANTIN, V. R. et al. Mice lacking insulin receptor substrate 4 exhibit mild defects in growth, reproduction, and glucose homeostasis. **American journal of physiology. Endocrinology and metabolism**, v. 278, n. 1, p. E127–33, 2000.
- FARFÁN, M. J. Biología Molecular Aplicada Molecular Biology in Clinical Diagnosis. **Revista Clínica Las Condes**, v. 26, n. 6, p. 788–793, 2015.
- FENG, X. et al. Insulin receptor substrate 1 (IRS1) variants confer risk of diabetes in the Boston Puerto Rican Health Study. **Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition**, v. 22, n. 1, p. 150–159, 2013.
- FERRANNINI, E.; CUSHMAN, W. C. Diabetes and hypertension: The bad companions. **The Lancet**, v. 380, n. 9841, p. 601–610, 2012.
- FERRAZ-DE-SOUZA, B. Molecular diagnosis in the clinical practice: an endocrinologist's perspective. **Rev Med (São Paulo)**, v. 94, n. 4, 2015.
- FERREIRA, L. T. . et al. Diabetes melito: hiperglicemia crônica e suas complicações. **Arquivo Brasileiros de Ciências da Saúde**, v. 36, p. 182–188, 2011.
- FRANCISCO, P. M. S. B. et al. Diabetes auto-referido em idosos: Prevalência, fatores associados e práticas de controle. **Cadernos de Saude Publica**, v. 26, n. 1, p. 175–184, 2010.
- FREITAS, M. C.; CESCHINI, F. L.; RAMALLO, B. T. Resistência à Insulina Associada à Obesidade: Efeitos Anti-Inflamatórios do Exercício Físico. **Revista Brasileira de Ciência e Movimento**, v. 22, n. 3, p. 139–147, 2014.
- FU, Z.; GILBERT, E. R.; LIU, D. Regulation of insulin synthesis and secretion and pancreatic Beta-cell

dysfunction in diabetes. **Current diabetes reviews**, v. 9, n. 1, p. 25–53, 2013.

GIL, B. M.; VALERO, D. D. Nuevas Tecnologías Para El Emerging Technologies in Genetic Diagnosis. **Revista Clínica Las Condes**, v. 28, n. 4, p. 538–545, 2017.

GIOVANNONE, B. et al. Insulin receptor substrate (IRS) transduction system: Distinct and overlapping signaling potential. **Diabetes/Metabolism Research and Reviews**, v. 16, n. 6, p. 434–441, 2000.

GLOYN, A. L.; MCCARTHY, M. I. The genetics of type 2 diabetes. **Best Practice & Research Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 15, n. 3, p. 293–308, 2001.

GOLDSTEIN, B. J. Insulin resistance as the core defect in type 2 diabetes *mellitus*. **American Journal of Cardiology**, v. 90, n. 5 SUPPL., p. 3–10, 2002.

GOMES, M. D. B. et al. Prevalência de sobrepeso e obesidade em pacientes com diabetes *mellitus* do tipo 2 no Brasil: estudo multicêntrico nacional. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 50, n. 1, p. 136–144, 2006.

GOMEZ-ARBELAEZ, D. Evaluation of the Finnish Diabetes Risk Score to predict type 2 diabetes *mellitus* in a Colombian population: A longitudinal observational study. **World Journal of Diabetes**, v. 6, n. 17, p. 1337, 2015.

GRILLO, M. DE F. F.; GORINI, M. I. P. C. Caracterização de pessoas com Diabetes *Mellitus* Tipo 2. **Revista Brasileira de Enfermagem**, v. 60, n. 1, p. 49–54, 2007.

GUAL, P.; LE MARCHAND-BRUSTEL, Y.; TANTI, J. F. Positive and negative regulation of insulin signaling through IRS-1 phosphorylation. **Biochimie**, v. 87, n. 1 SPEC. ISS., p. 99–109, 2005.

GUO, S. Insulin signaling, resistance, and the metabolic syndrome: insights from mouse models into disease mechanisms. **The Journal of endocrinology**, v. 220, n. 2, p. T1–T23, 2014.

GUTIÉRREZ, W. A.; MONTALVO, C. A. Complicaciones crónicas en pacientes con diabetes *mellitus* tipo 2, en el hospital universitario de Neiva. **Revista Facultad de Salud**, p. 61–72, 2012.

HALL, J. E.; GUYTON, A. C. **Guyton & Hall tratado de fisiologia médica**. 13. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2017.

HORIZONTE, B. Classificação De Risco Para Pé Diabético Em Pessoas Idosas Com Diabetes *Mellitus* Tipo 2. **Dissertação (Mestrado em Enfermagem) - Universidade Federal de Minas Gerais.**, p. 0–137, 2011.

HRIBAL, M. L. et al. The Gly3Arg972 Amino Acid Polymorphism in Insulin Receptor Substrate-1 Affects Glucose Metabolism in Skeletal Muscle Cells. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 85, n. 5, p. 2004–2013, 2000.

HU, C.; JIA, W. Diabetes in China: Epidemiology and genetic risk factors and their clinical utility in personalized medication. **Diabetes**, v. 67, n. 1, p. 3–11, 2018.

HUNT, S. E. et al. Ensembl variation resources. **Database : the journal of biological databases and curation**, v. 2018, n. 8, p. 1–12, 2018.

INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION. IDF Diabetes Atlas 9th Edition. p. 155, 2019.

IRIART, J. A. B. Medicina de precisão/medicina personalizada: análise crítica dos movimentos de transformação da biomedicina no início do século XXI. **Cadernos de saúde pública**, v. 35, n. 3, p. e00153118, 2019.

JANGHORBANI, M.; ADINEH, H.; AMINI, M. Evaluation of the Finnish Diabetes Risk Score (FINDRISC) as a Screening Tool for the Metabolic Syndrome. **The Review of Diabetic Studies**, v. 10, n. 4, p. 283–292, 2013.

JORGENSEN, C.; LINDING, R. Directional and quantitative phosphorylation networks. **Brief Funct Genomic Proteomic**, v. 7, n. 1, p. 17–26, 2008.

- KAHN, S. E. et al. Interactions between Genetic Background, Insulin Resistance and β -cell Function. **Diabetes Obes Metab**, v. 14, n. 03, p. 46–56, 2012.
- KANAI, F. et al. Insulin-Stimulated GLUT-4 Translocation Is Relevant to the Phosphorylation of IRS-1 and the Activity of PI3 Kinase. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 195, n. 2, p. 762–768, 1993.
- KEENAN, H. A. et al. Clinical Factors associated with resistance to Microvascular Complications in Diabetic. **Diabetes Care**, v. 30, n. 8, 2007.
- KIM, J. et al. Phosphorylation of Ser24 in the pleckstrin homology domain of insulin receptor substrate-1 by Mouse Pelle-like kinase/interleukin-1 receptor-associated kinase: cross-talk between inflammatory signaling and insulin signaling that may contribute to insulin. **J Biol Chem**, v. 280, p. 23173–23183, 2005.
- KLAFKE, A. et al. Mortalidade por complicações agudas do diabetes melito no Brasil, 2006-2010. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 23, n. 3, p. 455–462, 2014.
- KOMMOJU, U. J. et al. Association of IRS1, CAPN10, and PPARG gene polymorphisms with type 2 diabetes *mellitus* in the high-risk population of Hyderabad, India. **Journal of Diabetes**, v. 6, n. 6, p. 564–573, 2014.
- KREUZBERG, J. T. N.; AGUILAR, A. M. M.; LIMA, M. M. Riscos para complicações cardiovasculares em portadores de diabetes *mellitus*. **Revista de Enfermagem da UFSM**, v. 6, n. 1, p. 93, 2016.
- LASKOWSKI, R. A. et al. PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. **Journal of Applied Crystallography**, v. 26, n. 2, p. 283–291, 1993.
- LAVAN, B. E. et al. A novel 160 kDa phosphotyrosine protein in insulin-treated embryonic kidney cells is a new member of the insulin receptor substrate family. **J.Biol.Chem.**, v. 272, n. 34, p. 21403–21407, 1997.
- LI, Q. et al. Associations between two single-nucleotide polymorphisms (rs1801278 and rs2943641) of insulin receptor substrate 1 gene and type 2 diabetes susceptibility: a meta-analysis. **Endocrine**, v. 51, n. 1, p. 52–62, 2016.
- LI, Y. et al. Protein kinase C θ inhibits insulin signaling by phosphorylating IRS1 at Ser1101. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 44, p. 45304–45307, 2004.
- LIMA, C. DE T. et al. Diabetes e suas comorbidades no Programa de Saúde da Família Vila Davi em Bragança Paulista, SP. **Rev Bras Clin Med**, v. 8, n. 4, p. 316–319, 2010.
- LINDSTRO, J. et al. Reducing the risk of type 2 diabetes with nutrition and physical activity – efficacy and implementation of lifestyle interventions in Finland. **Public Health Nutrition**, v. 13, n. 8, p. 993–999, 2010.
- LINDSTRÖM, J.; TUOMILEHTO, J. The diabetes risk score: A practical tool to predict type 2 diabetes risk. **Diabetes Care**, v. 26, n. 3, p. 725–731, 2003.
- LODISH, H. ET AL. **Biologia celular e molecular**. 7. ed. Porto Alegre: ARTMED, 2014.
- LUCHS, A. Transdução de sinal : um olhar sobre a insulina Signal transduction : an overview on insulin. **Rev Inst Adolfo Lutz**, v. 65, n. 3, p. 157–164, 2006.
- LYRA, R. et al. Prevenção do Diabetes *Mellitus* Tipo 2. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabolgia**, v. 50, p. 239–249, 2006.
- MACEDO, G. et al. Diabetes *Mellitus* Tipo 2: Insulinização. **Projeto Diretrizes. Associação Médica Brasileira e Conselho Federal de Medicina**, p. 1–14, 2011.
- MACHADO-NETO, J. A.; TRAINA, F. IRS1 (insulin receptor substrate 1). **Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology**, v. 17, p. 594–598, 2013.

- MACIEL, R. O.; VASCONCELOS, M. R. S. A.; ANDRADE, C. R. Nefropatia diabética - incidência e fatores de risco associados. **Brazilian Journal of Health Review**, v. 2, n. 4, p. 3808–3823, 2019.
- MAHMUTOVIC, L. et al. Association of IRS1 genetic variants with glucose control and insulin resistance in type 2 diabetic patients from Bosnia and Herzegovina. **Drug Metab Pers Ther.**, v. 34, n. 1, p. 18–31, 2019.
- MARTÍNEZ-GÓMEZ, L. E. et al. A Replication Study of the IRS1, CAPN10, TCF7L2, and PPARG Gene Polymorphisms Associated with Type 2 Diabetes in Two Different Populations of Mexico. **Annals of Human Genetics**, v. 75, n. 5, p. 612–620, 2011.
- MATOS, M. C. G.; BRANCHTEIN, L. O uso de antidiabéticos orais no paciente com diabetes *mellitus* e doença cardíaca. **Revista da Sociedade de Cardiologia do Rio Grande do Sul**, v. 15, n. 8, p. 6–9, 2006.
- MATTHAEI, S. et al. Pathophysiology and pharmacological treatment of insulin resistance. **Endocrine Reviews**, v. 21, n. 6, p. 585–618, 2000.
- MCGETTRICK, A. J.; FEENER, E. P.; KAHN, C. R. Human Insulin Receptor Substrate-1 (IRS-1) Polymorphism G972R Causes IRS-1 to Associate with the Insulin Receptor and Inhibit Receptor Autophosphorylation. **THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY**, v. 280, n. 8, p. 6441–6446, 2005.
- MENGESHA, A. Y. Hypertension and related risk factors in type 2 diabetes *mellitus* (DM) patients in Gaborone City Council (GCC) clinics, Gaborone, Botswana. **African health sciences**, v. 7, n. 4, p. 244–5, 2007.
- METZ, H. E.; HOUGHTON, A. M. G. Insulin receptor substrate regulation of phosphoinositide 3-kinase. **Clinical Cancer Research**, v. 17, n. 2, p. 206–211, 2011.
- MOE. **Molecular Operating Environment (MOE). Chemical Computing Group Inc., 1010 Sherbooke St. West, Suite #910, Montreal, QC, Canada, H3A 2R7.**, 2015.
- MOESCHEL, K. et al. Protein kinase C-zeta-induced phosphorylation of Ser318 in insulin receptor substrate-1 (IRS-1) attenuates the interaction with the insulin receptor and the tyrosine phosphorylation of IRS-1. **J Biol Chem**, v. 279, p. 25157–25163, 2004.
- MONTEIRO, M. Y. **A Capitania de São José do Rio Negro: Antecedentes Históricos e Fundação.** Manaus: VALER, 2002.
- MONTENEGRO, R.; CHAVES, M.; FERNANDES, V. Fisiologia pancreática: pâncreas endócrino. **Sistemas digestório: integração básico-clínica**, 2016.
- MOREIRA, L. M. **Ciências genômicas: fundamentos e aplicações.** 1. ed. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 2015.
- MOREIRA, S. DA S. **FATORES ASSOCIADOS AO CONTROLE GLICÊMICO INADEQUADO EM PACIENTES COM DIABETES TIPO 2 NO BRASIL E NA VENEZUELA.** [s.l.] Fundação Oswaldo Cruz. Instituto Gonçalo Moniz., 2016.
- MORINO, K.; NESCHEN, S.; BILZ, S. Muscle-specific IRS-1 Ser->Ala transgenic mice are protected from fat-induced insulin resistance in skeletal muscle. **Diabetes**, v. 57, p. 2644–2651, 2008.
- MOTHE, I.; OBERGHEN, E. VAN. Phosphorylation of insulin receptor substrate- 1 on multiple serine residues, 612, 632, 662, and 731, modulates insulin action. **J Biol Chem**, v. 271, p. 11222–11227, 1996.
- MULLIS, K. The Unusual Origin of the Polymerase Chain Reaction. **Scientific American**, v. 262, n. 4, p. 56–65, 1990.
- MULLIS, K.; FALOONA, F. Specific synthesis of DNA in vitro via polymerase-catalyzed chain reaction. **Methods in Enzymology**, v. 155, p. 335–350, 1987.

- MULLUGETA, Y. et al. Dyslipidemia associated with poor glycemic control in type 2 diabetes *mellitus* and the protective effect of metformin supplementation. **Indian Journal of Clinical Biochemistry**, v. 27, n. 4, p. 363–369, 2012.
- NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. 6. ed. Porto Alegre: ARTMED, 2014.
- NETTO, G. J.; SAAD, R. D.; DYSERT, P. A. Diagnostic molecular pathology: current techniques and clinical applications, part I. **Proceedings (Baylor University. Medical Center)**, v. 16, n. 4, p. 379–383, 2003.
- NILSSON, E. et al. Altered DNA methylation and differential expression of genes influencing metabolism and inflammation in adipose tissue from subjects with type 2 diabetes. **Diabetes**, v. 63, n. 9, p. 2962–2976, 2014.
- NILSSON, P. M.; CEDERHOLM, J. Diabetes, hypertension, and outcome studies: Overview 2010. **Diabetes Care**, v. 34, n. SUPPL. 2, 2011.
- NISHIYAMA, M. et al. The Human Insulin Receptor Substrate-1 Gene (IRS1) Is Localized on 2q36. **Genomics**, v. 20, n. 1, p. 139–141, 1994.
- NOBLE, D. et al. Risk models and scores for type 2 diabetes: systematic review. **BMJ**, v. 343, n. nov28 1, p. d7163–d7163, 2011.
- ORCY, R. B. **ATIVIDADE DE TIROSINA QUINASE E EXPRESSÃO DO SUBSTRATO 1 DO RECEPTOR DE INSULINA (IRS-1) EM MIOMÉTRIO E MIOMA HUMANOS**. [s.l.] Universidade Federal do Rio Grande do Sul., 2003.
- PAIVA, M. C. O papel fisiológico da insulina e dos hormônios contrarregulatórios na homeostase glicêmica. **Revista Brasileira de Nutrição Clínica Funcional**, n. ano 14, nº 61, p. 34–42, 2014.
- PARK, K. S. Sulwon Lecture 2009: The Search for Genetic Risk Factors of Type 2 Diabetes *Mellitus*. **Diabetes & Metabolism Journal**, v. 35, n. 1, p. 12, 2011.
- PAZ, K. et al. A Molecular Basis for Insulin Resistance. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 47, p. 29911–29918, 1997a.
- PAZ, K. et al. A molecular basis for insulin resistance: elevated serine/threonine phosphorylation of IRS-1 and IRS-2 inhibits their binding to the juxtamembrane region of the insulin receptor and impairs their ability to undergo insulin-induced tyrosine phosphorylation. **J Biol Chem**, v. 272, p. 29911–29918, 1997b.
- PEDERSON, T. M.; KRAMER, D. L.; RONDINONE, C. M. Serine/threonine phosphorylation of IRS-1 triggers its degradation: Possible regulation by tyrosine phosphorylation. **Diabetes**, v. 50, n. 1, p. 24–31, 2001.
- PEREIRA, R. A relação entre a Dislipidemia e Diabetes *Mellitus* tipo 2. **Cadernos UniFOA**, v. 17, p. 89–94, 2011.
- PIERCE, B. **Genética - Um Enfoque Conceitual**. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Saúde, 2016.
- PINHO, J. R. R. EBELL.; SITNIK, R.; MANGUEIRA, C. L. P. ITANGUEIR. Personalized medicine and the clinical laboratory. **Einstein (São Paulo, Brazil)**, v. 12, n. 3, p. 366–373, 2014.
- PINHO, L. et al. Hipertensão e dislipidemia em pacientes diabetes *mellitus* tipo 2: uma revisão integrativa Hypertension and dyslipidemia in patients with type 2 diabetes *mellitus*: an integrative review. **Revista Norte Mineira de Enfermagem**, v. 4, n. 1, p. 87–101, 2015.
- POON, K.-S.; TAN, K. M.-L.; KOAY, E. S.-C. Targeted next-generation sequencing of the ATP7B gene for molecular diagnosis of Wilson disease. **Clinical biochemistry**, v. 49, p. 166–171, 2015.
- PORZIO, O. et al. The Gly972®Arg amino acid polymorphism in IRS-1 impairs insulin secretion in pancreatic b cells. **J. Clin. Invest.**, v. 104, p. 357–364, 1999.

- POTTIE, K. et al. Recommendations on screening for type 2 diabetes in adults. **CMAJ : Canadian Medical Association journal**, v. 184, n. 15, p. 1687–96, 2012.
- POULSEN, P. et al. Heritability of Type II (non-insulin-dependent) diabetes *mellitus* and abnormal glucose tolerance \pm a population-based twin study. **Diabetologia**, v. 42, p. 139–145, 1999.
- PREVIS, S. F. et al. Contrasting effects of IRS-1 versus IRS-2 gene disruption on carbohydrate and lipid metabolism in vivo. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 50, p. 38990–38994, 2000.
- PRUDENTE, S. et al. Joint effect of insulin signaling genes on insulin secretion and glucose homeostasis. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 98, n. 6, p. 1143–1147, 2013.
- PRUDENTE, S. et al. Pharmacogenetics of oral antidiabetes drugs: Evidence for diverse signals at the IRS1 locus. **Pharmacogenomics Journal**, v. 18, n. 3, p. 431–435, 2018.
- QUEIROZ, J. F. DE. Secreção e sensibilidade periférica à insulina e hormônios contra-regulatórios domorcego hematófago *Desmodus rotundus*. **Dissertação (Mestrado)**, p. 76, 2008.
- QUEIROZ, P. C. DE et al. Prevalence of micro and macrovascular complications and the risk factors in patients with diabetes *mellitus* and metabolic syndrome. **Rev Bras Clin Med**, v. 9, n. 4, p. 254–258, 2011.
- RABBANI, B.; TEKIN, M.; MAHDIEH, N. The promise of whole-exome sequencing in medical genetics. **J Hum Genet.**, v. 59, p. 5–15, 2014.
- RABELO, M. X. **ANÁLISE DE VARIANTES DO GENE IRS1 EM PESSOAS COM DIABETES MELLITUS TIPO 2**. [s.l.] Universidade do Estado do Amazonas, 2019.
- RIDGWELL, K. Genetic tools: PCR and sequencing. **Vox Sanguinis**, v. 87, n. Suppl. 1, p. S6–S12, 2004.
- ROCHA, N. D. S. DA et al. AVALIAÇÃO DO CONTROLE GLICÊMICO PELA GLICEMIA CAPILAR, DE USUÁRIOS DIABÉTICOS TIPO 2, EM UM SERVIÇO DE ATENÇÃO BÁSICA NO MUNICÍPIO DO RECIFE. **Ciências Biológicas e de Saúde Unit**, v. 3, n. 1, p. 83–94, 2017.
- RODRIGUES, A. V. AS CONSEQÜÊNCIAS DO USO DO TABACO EM HIPERTENSOS E DIABÉTICOS : Uma revisão bibliográfica AS CONSEQÜÊNCIAS DO USO DO TABACO EM HIPERTENSOS EDIABÉTICOS : Uma revisão bibliográfica. 2013.
- RODRIGUES, D. F. Prevalência de Fatores de Risco e Complicações do Diabetes *Mellitus* Tipo 2 em Usuários de uma Unidade de Saúde da Família. **Revista Brasileira de Ciências da Saúde**, v. 15, n. 3, p. 277–286, 2011.
- ROSSI, V.; DA SILVA, A.; FONSECA, G. Adesão ao tratamento medicamentoso entre pessoas com diabetes *mellitus* tipo 2. **Revista de Enfermagem do Centro-Oeste Mineiro**, v. 5, n. 3, p. 21–26, 2016.
- RUNG, J. et al. Genetic variant near IRS1 is associated with type 2 diabetes, insulin resistance and hyperinsulinemia. **Nature Genetics**, v. 41, n. 10, p. 1110–1115, 2009.
- SABRINA PRUDENTE, ELEONORA MORINI, LORELLA MARSELLI, R. B. et al. Joint Effect of Insulin Signaling Genes on Insulin Secretion and Glucose Homeostasis. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 98, p. E1143–E1147, 2013.
- SAIKI, R. K. et al. Primer directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. **Science (New York, N.Y.)**, v. 239, n. 4839, p. 487–491, 1988.
- SALOUM DE NEVES MANTA, F. et al. Revisiting the Genetic Ancestry of Brazilians Using Autosomal AIM-Indels. **PLoS ONE**, v. 8, n. 9, p. 1–11, 2013.
- SALTIEL, A. R.; KAHN, C. R. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. **Nature**, v. 414, n. 6865, p. 799–806, 2001a.
- SALTIEL, A. R.; KAHN, C. R. Glucose and Lipid Metabolism. **Nature**, v. 414, n. December, p. 799–806, 2001b.

- SALTIEL, A. R.; PESSIN, J. E. Insulin signaling pathways in time and space. **Trends in cell biology**, v. 12, n. 2, p. 65–71, 2002.
- SANTOS, A. DE L. et al. Microvascular complications in type 2 diabetes and associated factors: A telephone survey of self-reported morbidity. **Ciencia e Saude Coletiva**, v. 20, n. 3, p. 761–770, 2015.
- SANTOS, M. S. DOS; FREITAS, M. N.; PINTO, F. DE O. Diabetes *Mellitus* Tipo 1 e Tipo 2. **Link Science Place**, v. 1, n. 7, p. 1–14, 2014.
- SANTOS, I. C. R. V. et al. Prevalência e fatores associados a amputações por pé diabético. **Ciências & Saúde Coletiva**, v. 18, n. 10, p. 3007–3014, 2013.
- SANTOS, S.; BEÇA, H.; MOTA, C. L. Qualidade de vida e fatores associados na diabetes *mellitus* tipo 2: estudo observacional. **Revista Portuguesa de Medicina Geral e Familiar**, v. 31, p. 186–196, 2015.
- SARAIVA, J. F. K. et al. Diabetes *mellitus* no Brasil : características clínicas , padrão de tratamento e custos associados ao cuidado da doença. **J. Bras Econ Saúde**, v. 8, n. 81, p. 80–90, 2016.
- SCHEFFEL, R. S. et al. Prevalence of micro and macroangiopathic chronic complications and their risk factors in the care of out patients with type 2 diabetes *mellitus*. **Revista da Associação Médica Brasileira (1992)**, v. 50, n. 3, p. 263–267, 2004.
- SCHOFIELD, C. J.; SUTHERLAND, C. Disordered insulin secretion in the development of insulin resistance and Type 2 diabetes. **Diabetic Medicine**, v. 29, n. 8, p. 972–979, 2012.
- SEIGNEMARTIN, B. A. **LETRAMENTO EM SAÚDE E ADESÃO AO TRATAMENTO MEDICAMENTOSO DE PACIENTES DIABÉTICOS TIPO 2 EM UM HOSPITAL TERCIÁRIO**. [s.l.] UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS, 2018.
- SESSO, R. DE C. C. et al. Brazilian dialysis census, 2009. **Jornal brasileiro de nefrologia : órgão oficial de Sociedades Brasileira e Latino-Americana de Nefrologia**, v. 32, n. 4, p. 374–378, 2010.
- SIEVERS, F. et al. Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. **Molecular Systems Biology**, v. 7, n. 539, 2011.
- SILVA-E-OLIVEIRA, J. et al. Heart rate variability based on risk stratification for type 2 diabetes *mellitus*. **Einstein (Sao Paulo, Brazil)**, v. 15, n. 2, p. 141–147, 2017.
- SILVA, A. Educação em saúde a portadores de diabetes *Mellitus* tipo 2 : revisão bibliográfica. p. 146–151, 2009.
- SILVA, B. et al. Proteínas quinases: características estruturais e inibidores químicos. **Química Nova**, v. 32, n. 2, p. 30, 2009.
- SLADEK, R. et al. A genome-wide association study identifies novel risk loci for type 2 diabetes. **Nature**, v. 445, n. 7130, p. 881–885, 2007.
- SMITH A, BOYCOTT KM, J. O. Lake Louise mutation detection meeting 2013: clinical translation of next-generation sequencing requires optimization of workflows and interpretation of variants. **Hum Mutat.**, v. 35, p. 265–269, 2014.
- SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. **Diretrizes Sociedade Brasileira de Diabetes. 2019-2020**. São Paulo: Editora Científica, 2019.
- SOMMERFELD, M. R. et al. In Vitro Phosphorylation of Insulin Receptor Substrate 1 by Protein Kinase C- ζ : Functional Analysis and Identification of Novel Phosphorylation Sites. **Biochemistry**, v. 43, n. 19, p. 5888–5901, 2004.
- SORIGUER, F. et al. Prevalence of diabetes *mellitus* and impaired glucose regulation in Spain: The Di@bet.es Study. **Diabetologia**, v. 55, n. 1, p. 88–93, 2012.
- SOUZA, C. F. DE; GROSS, J. L. Pré-diabetes: diagnóstico, avaliação de complicações crônicas e tratamento. p. 275–284, 2012.

- SPENCER, J. Type 2 diabetes and hypertension in older adults: a case study. **Nursing Standard**, v. 24, n. 32, p. 35–39, 2010.
- SPRAGUE, J. E.; ARBELÁEZ, A. M. NIH Public Access. **Pediatr Endocrinol Rev.**, v. 9, n. 1, p. 463–475, 2011.
- SZENDROEDI, J. et al. Role of diacylglycerol activation of PKC θ in lipid-induced muscle insulin resistance in humans. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 111, n. 26, p. 9597–9602, 2014.
- TANIGUCHI, C. M.; EMANUELLI, B.; KAHN, C. R. Critical nodes in signalling pathways: Insights into insulin action. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 7, n. 2, p. 85–96, 2006.
- TANTI, J. F. et al. Serine/threonine phosphorylation of insulin receptor substrate 1 modulates insulin receptor signaling. **Journal of Biological Chemistry**, v. 269, n. 8, p. 6051–6057, 1994.
- TSCHIEDEL, B. Complicações crônicas do diabetes. **J. bras. med.**, v. 102, n. 5, p. 7–12, 2014.
- TURCATTO, H.; FARIA, G. Desafios para a atenção em saúde : adesão ao tratamento e controle metabólico em pessoas com diabetes *mellitus* tipo 2 , no município de Passos , MG Desafios para a atenção em saúde : adesão ao tratamento e controle metabólico em pessoas com diabetes melli. **Tese**, 2011.
- UMAMAHESH, K. et al. Incidence of cardiovascular diseases and associated risk factors among subjects with type 2 diabetes-An 11-year follow up study. **Indian Heart Journal**, v. 66, n. 1, p. 5–10, 2014.
- VALONES, M. A. A. et al. Principles and applications of polymerase chain reaction in medical diagnostic fields: A review. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 40, n. 1, p. 1–11, 2009.
- VANCEA, D. M. M. et al. Efeito da frequência do exercício físico no controle glicêmico e composição corporal de diabéticos tipo 2. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 92, n. 1, p. 23–30, 2009.
- VASER, R. et al. SIFT missense predictions for genomes. **Nature Protocols**, v. 11, n. 1, p. 1–9, 2016.
- VASSY, J. L.; MEIGS, J. B. Is Genetic testing useful to predict type 2 diabetes? **Best Practice and Research: Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 26, n. 2, p. 189–201, 2012.
- VIANA, M. R.; RODRIGUEZ, T. T. Complicações cardiovasculares e renais no diabetes *mellitus*. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v. 10, n. 3, p. 290–296, 2011.
- VIRKAMÄKI, A. et al. Protein – protein interaction in insulin signaling and the molecular mechanisms of insulin resistance. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 103, n. 7, p. 931–943, 1999.
- VITAL, W. C. et al. RISK PROFILE FOR HIGH GLYCEMIA IN BRAZIL: RESULTS FROM BLUE DIABETES NOVEMBER CAMPAING 2018. **Diabetology & Metabolic Syndrome**, v. 11, n. 1, p. 64, 2019.
- VOIGHT, B. F. et al. Twelve type 2 diabetes susceptibility loci identified through large-scale association analysis. **Nature Genetics**, v. 42, n. 7, p. 579–589, 2010.
- WITHERS, D. J. et al. Disruption of IRS-2 causes type 2 diabetes in mice. **Nature**, v. 391, p. 900–4., 1998.
- XU, D.; ZHANG, Y. Improving the physical realism and structural accuracy of protein models by a two-step atomic-level energy minimization. **Biophysical Journal**, v. 101, n. 10, p. 2525–2534, 2011.
- YANG, J. et al. The I-TASSER suite: Protein structure and function prediction. **Nature Methods**, v. 12, n. 1, p. 7–8, 2014.
- YANG, J.; ZHANG, Y. I-TASSER server: New development for protein structure and function predictions. **Nucleic Acids Research**, v. 43, n. W1, p. W174–W181, 2015.

YONAMINE, C. Y. O Diabetes *Mellitus* induz alterações epigenéticas no gene *Slc2a4* em músculo esquelético que se relacionam com a repressão do gene, e que podem ser revertidas pela insulinoterapia ou pelo resveratrol. [s.l.] Universidade de São Paulo (USP), 2017.

8 APÊNDICE

APÊNDICE A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE.



**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E
ESCLARECIDO (TCLE)
(Paciente Participante)**



Convidamos o(a) Sr(a) para participar da pesquisa “Perfil bioquímico e análise do polimorfismo nos genes IRS1 e IRS2 envolvidos na resistência à insulina em indivíduos com Diabetes Mellitus Tipo 2 em Manaus”, sob a responsabilidade dos pesquisadores M.Sc. Lucivana Mourão e Dr. José Adolfo Mota.

JUSTIFICATIVA DA PESQUISA E OBJETIVO DA PESQUISA

O número de pacientes com T2DM vêm aumentando significativamente nos últimos anos, o que pode ser atribuído aos maus hábitos alimentares, ausência de atividade física associados a fatores genéticos predisponentes. O presente projeto pretende analisar genes cujos produtos participam das vias de sinalização da insulina e que, portanto, estão relacionados a resistência à insulina e desencadeamento da Diabetes Mellitus Tipo 2.

PROCEDIMENTOS UTILIZADOS NA PESQUISA

A sua participação se dará através de uma entrevista e através do fornecimento de amostras biológicas (sangue venoso). Durante a entrevista o Sr.(a) será questionado sobre os seus dados pessoais (nome completo, data de nascimento, endereço, contato de telefone, grau de instrução), informações clínicas e outras informações que forem pertinentes a pesquisa.

As amostras serão coletadas por profissionais membros da equipe de pesquisa devidamente treinados e capacitados. Será colhido 1 mL de sangue por amostra, que será fracionado em três microtubos, destinados ao estudo genético. A partir do sangue coletado será obtido o DNA extraído de células sanguíneas, o qual será analisado através de técnicas moleculares (PCR e Sequenciamento) visando o estudo dos éxons (seqüências com informação genética) dos genes IRS1 e IRS2, cuja expressão está relacionada a sinalização da insulina no organismo. Estudos apontam que pessoas com alterações neste gene, podem desencadear a Diabetes Mellitus Tipo 2.

As suas amostras biológicas serão armazenadas apenas durante o período de realização deste projeto. E, portanto, desprezadas imediatamente após o término desse projeto, que está prevista para agosto de 2018.

BENEFÍCIOS DECORRENTES DA PARTICIPAÇÃO DA PESQUISA

O Sr.(a) será beneficiado pelo retorno dos resultados das análises da pesquisa, para viabilizar a elaboração de condutas e/ou tratamentos adequados pelo médico que o acompanha. Além disso, o Sr.(a) estará contribuindo para geração de conhecimento para entender, prevenir ou aliviar os sintomas e as consequências da Diabetes Mellitus, a partir desses entendimentos será possível tomar novas medidas de controle e até mesmo gerar possibilidades de novas condutas terapêuticas.

Como a análise genética não se refere a um teste preditivo (teste realizado antes da manifestação da doença), não há necessidade de encaminhamento a serviços de aconselhamento genético. Entretanto, a equipe da pesquisa ficará à disposição para qualquer esclarecimento quanto ao resultado genético obtido. Ressaltamos que o Sr. (a) também tem a opção de não querer saber o resultado da pesquisa.

DESCONFORTOS E RISCOS DECORRENTES DA PARTICIPAÇÃO DA PESQUISA

Os riscos decorrentes de sua participação na pesquisa são basicamente o desconforto durante a coleta, onde algumas vezes, durante ou após colher o sangue do braço, ele pode doer um pouco na região da picada da agulha e pode ficar com uma mancha roxa no local (hematoma), ou pode ocorrer punção acidental de uma artéria ou infecção.

MEDIDAS DE SEGURANÇA PARA EVITAR RISCOS

Os riscos que envolvem dor, formação hematomas, punção em local errado serão reduzidos ou evitados pela execução correta dos procedimentos de coleta, que sempre será realizada por profissional capacitado, que fará todos os procedimentos com muita cautela e seguindo-se corretamente todas as etapas. Os riscos relacionados a aquisição de infecção no momento da coleta serão evitados pela correta assepsia do local, que será realizado utilizando-se etanol ou isopropanol a 70%. As situações constrangedoras serão minimizadas através de orientações que visem tranquilizar o paciente.

Garantimos que todos os seus dados sempre serão mantidos em sigilo e nenhuma publicação decorrente do projeto terá sua identificação. Para garantir o sigilo, os dados obtidos por questionário, assim como este documento, serão guardados em armário com chave, com acesso exclusivo pela pesquisadora responsável pelo projeto, e as amostras biológicas identificadas por um código numérico.

PARTICIPAÇÃO NA PESQUISA

O Sr.(a) tem autonomia de recusar-se a participar do projeto de pesquisa ou retirar seu consentimento, em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma, sendo garantido que não haverá nenhum tipo de prejuízo, seja pessoal ou em relação a atendimento na unidade de saúde.

SIGILO E PRIVACIDADE DOS PARTICIPANTES DA PESQUISA

Os resultados da pesquisa serão analisados e publicados, mas sua identidade não será divulgada, sendo guardada em sigilo durante e depois de todas as fases da pesquisa.

DESPESAS E REMUNERAÇÃO DECORRENTES DA PARTICIPAÇÃO NA PESQUISA

O(a) Sr(a) não terá nenhuma despesa, tendo em vista que a coleta será realizada no momento de sua consulta médica ou no local que preferir e também não receberá nenhuma remuneração.

ASSISTÊNCIA, INDENIZAÇÃO E RESSARCIMENTO

É garantido ao(à) Sr.(a) direito de assistência integral e gratuita devido a danos diretos ou indiretos e imediatos ou tardios decorrentes da participação no estudo, pelo tempo que for necessário. Também é garantindo indenização e ressarcimento diante de eventuais danos decorrentes da pesquisa.

INFORMAÇÕES ADICIONAIS

Para qualquer outra informação o(a) Sr(a) poderá entrar em contato com a pesquisadora ou com o CEP/UFAM:

PESQUISADORA RESPONSÁVEL Nome: Lucivana Prata de Souza Mourão Telefone: 98129-0258 E-mail: lpsouza@uea.edu.br Endereço: Av. Carvalho Leal, 1777. Escola Superior de Ciências da Saúde, UEA. Manaus/AM - CEP: 69065-001	COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - CEP/UFAM Telefone: (92) 3305-1181/Ramal: 2004. E-mail: cep@ufam.edu.br cep.ufam@gmail.com Endereço: Rua Teresina, 495, Adrianópolis Manaus/AM – CEP: 69057-070 Escola de Enfermagem de Manaus - Sala 07
---	---

CONSENTIMENTO PÓS-INFORMAÇÃO

Eu, _____, fui informado sobre o que o pesquisador quer fazer e porque precisa da minha colaboração e entendi a explicação.

Por isso, eu concordo em participar do projeto, de forma autônoma, consciente, livre e esclarecida, sabendo que não vou ganhar nada e que posso sair quando quiser, em qualquer fase da pesquisa, que não haverá nenhum tipo de prejuízo, seja pessoal ou em relação ao atendimento na unidade de saúde.

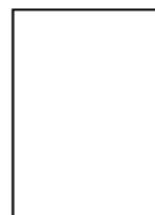
Ainda declaro que estou ciente e de acordo que irei participar dessa pesquisa através de entrevista para o fornecimento de dados e informações pertinentes ao projeto de pesquisa e pelo fornecimento das minhas amostras biológicas (sangue venoso).

Também declaro está ciente e de acordo que a(s) minha(s) amostra(s) serão descartadas logo após o término desse projeto, que está previsto para agosto de 2018 e que os dados resultantes desse estudo serão divulgados, mas a minha identidade será mantida em sigilo durante e depois a execução desse projeto.

Este documento é emitido em duas vias que serão ambas assinadas por mim e pelo pesquisador, ficando uma via com cada um de nós.

Data: ___/___/___

ou



Assinatura do Pesquisador Responsável
ou membro da equipe de pesquisa

Assinatura do paciente participante

Impressão do
dedo polegar do
participante

APÊNDICE B – Instrumento para a obtenção de dados dos participantes da Pesquisa.

PROJETO DE PESQUISA: Investigação de polimorfismo de genes envolvidos na resistência periférica à insulina como fator de risco para o Diabetes Mellitus Tipo 2.

EQUIPE DO PROJETO

Me. Lucivana Mourão, Dr. Adolfo Mota, Mestranda Marjory Ximenes, Acadêmico Ricardo Lyra

Critério de Inclusão: Indivíduos previamente diagnosticados como portador de Diabetes Mellitus tipo 2 ou que apresentarem condições de risco¹ que justifique o rastreamento do DM2 e que aceitem participar da pesquisa, de forma consentida e esclarecida.

Nome: _____ Número de identificação: _____

- | | |
|--|--|
| 1. Sexo: () F () M | () SIM () NÃO |
| 2. Idade atual: _____ | 9. Você fez/faz uso de fumo? |
| 3. Nível de escolaridade: | () SIM, mas não fumo há _____ anos |
| () Ensino Fundamental Incompleto | () SIM, com que frequência? _____ |
| () Ensino Fundamental Completo | () NÃO |
| () Nível Médio Incompleto | 10. Você faz uso de álcool? |
| () Nível Médio Completo | () SIM, mas não bebo há _____ anos |
| () Nível Superior Incompleto | () SIM, com que frequência? _____ |
| () Nível Superior Completo | () NÃO |
| () Pós graduação | 11. Realiza tratamento com medicamentos orais? () SIM () NÃO |
| 4. Ocupação: _____ | 12. Se sim, qual(is) o(s) medicamento(s)? |
| Se aposentado, qual a ocupação anterior? | _____ |
| _____ | _____ |
| 5. Peso: _____ Altura: _____ | _____ |
| 6. Circunferência abdominal: _____ | 13. Realiza tratamento com insulina? (tempo) |
| 7. Há quanto tempo você tem o diagnóstico de diabetes? _____ | () SIM () NÃO |
| 8. APRESENTA: | 14. Com que frequência você come vegetais, frutas ou leguminosas? |
| - Hipertensão? | () Todos os dias |
| () SIM () NÃO | () Não todos os dias |
| - Dislipidemia? | 15. Você realiza atividade física diariamente por pelo menos 30 minutos? |
| () SIM () NÃO | () SIM () NÃO |
| - Complicações oftalmológicas? | 16. Você apresentou glicemia elevada antes do diagnóstico da diabetes (exame de sangue, durante uma doença ou gravidez)? |
| () SIM () NÃO | () SIM () NÃO |
| - Complicações cardíacas? | 17. Possui membros na família com diagnóstico para diabetes tipo 2? |
| () SIM () NÃO | () NÃO |
| - Amputações relacionadas? | () SIM – AVÓS, TIOS, PRIMOS |
| () SIM () NÃO | () SIM – PAIS, IRMÃO, FILHO |
| - Complicações renais? | |
| () SIM () NÃO | |
| - Acidente vascular encefálico? | |

DATA DA COLETA DE DADOS: ___/___/___

Universidade Federal do Amazonas
Universidade do Estado do Amazonas

APÊNDICE C – Artigos

- PUBLICADO

MOURÃO, L.P.S et al. Type 2 Diabetes *Mellitus*: comorbidities, clinical complications and behavioral variables in an amazonas sample. **Diabetology & Metabolic Syndrome**, v. 11, n. 1, p. 266, 2019.

- EM FASE FINAL DE CORREÇÃO

Lucivana Prata de Souza Mourão, Marjory Ximenes Rabelo, Spartaco Astolfi Filho, Adolfo José da Mota. **FAMILIAL AGGREGATION STUDY FOR *rs1801278*: A SNP ASSOCIATED TO TYPE 2 DIABETES.**

ABSTRACT:

Type 2 diabetes (T2D) is the most frequente type of diabetes. It is a chronic disease characterized by hyperglycemia and multifactorial inheritance pattern. The impact on public health is an emerging problem. Insulin resistance (IR) is the main metabolic disorder capable of predicting the chance of development of T2D. IR is a pathological condition that results from an insufficient response of target cells from peripheral tissues to normal levels of circulating insulin. The insulin signaling involves several membrane and cytoplasmic proteins, as the substrate of insulin receptor 1 (IRS1). Studies have correlated single-base polymorphisms (SNPs) in the *IRS1* gene to the increased risk of T2D triggering, among them polymorphism *rs1801278*. The present study evaluated the inheritance of *rs1801278* polymorphism in four generations of a family with clinically diagnosed T2D cases. DNA was extracted from the peripheral venous blood and the exon 1 from *IRS1* gene was amplified by PCR. The amplicons were sequenced and analyzed. We selected a person with T2D and polymorphism *rs1801278*, as proband. For the family aggregation study, seven members of the proband family in four generations, with or without T2D, were included. The occurrence of *rs1801278* polymorphism was confirmed by PCR/RFLP. Five people harbor the polymorphism, four of whom did not present the clinical picture of T2D so far. The inheritance of the SNP under study was observed in the four generations. Models on the molecular mechanism of *rs1801278* polymorphism and its consequence on insulin signaling suggest that this variant reduces phosphorylation of the IRS1 substrate on tyrosine. The data obtained in the present study from the family analysis reinforce that the polymorphism *rs1801278* is relevant in studies of family aggregation and help to clarify why family predisposition is an important risk factor for T2D.

KEY-WORDS: SNP, IRS1, INSULIN RESISTANCE, PCR/RFLP, INSULIN SIGNALING

- EM ELABORAÇÃO

Lucivana Prata de Souza Mourão, Marcos Pessoa, Adolfo José da Mota. **IMPACTO DO SNP *rs1801278* NA TRANSDUÇÃO DO SINAL INSULÍNICO.**

APÊNDICE D – Apresentação em congressos

1. LYRA JUNIOR, R. C.; Mourão, L. P. S.; MOTA, A. J.; RABELO, M. X. Validação de iniciadores e otimização da PCR para estudo do gene IRS1 de humanos. In: XXX Congresso Brasileiro de Genética Médica, 2018, Rio de Janeiro.
2. MOURÃO, L. P. S.; RABELO, M. X., SANTOS, C.S.; LYRA JÚNIOR, R. C.; OLIVEIRA, K. C.; FIGUEIREDO, L. P. G.; MOTA, A. J. Type 2 Diabetes Mellitus: comorbidities, clinical complications and behavioral variables in an Amazonas sample. In: XXII Congresso da Sociedade Brasileira de Diabetes, 2019, Natal.

APÊNDICE E – Orientação de iniciação científica, trabalho de conclusão de curso e apoio em orientação de mestrado.

- Iniciação Científica

Camila Soares Santos. Levantamento dos fatores socioambientais de risco e de suscetibilidade para Diabetes *Mellitus* Tipo 2 em uma amostra na cidade de Manaus. Programa de Apoio à Iniciação Científica (PAIC). Universidade do Estado do Amazonas.

- Trabalho de Conclusão de Curso


Ricardo Cordeiro Lyra Júnior. Validação de iniciadores e otimização da PCR para estudo do gene *IRS1* de humanos. 2018. Trabalho de Conclusão de Curso. (Graduação em Ciências Biológicas) - Universidade do Estado do Amazonas. Orientador: Lucivana Prata de Souza Mourão.

- Apoio em orientação de mestrado

Marjory Ximenes Rabelo. Análise de variantes do gene *IRS1* em pessoas com Diabetes *Mellitus* Tipo 2. 2019. Dissertação. Mestrado em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia. Universidade do Estado do Amazonas, UEA. Orientador: Spartaco Astolfi Filho. Coorientador: Adolfo José da Mota.

9 ANEXO

ANEXO A – Autorização da Secretaria Municipal de Saúde – SEMSA



**PREFEITURA DE
MANAUS**

Av. Mário Ypiranga, 1695 – Adrianópolis –
Manaus – AM
CEP 69057-002 | Tel.: 3236-6987
gesau@pmm.am.gov.br
semsa.manaus.am.gov.br

Autorização para Pesquisa nº 41/2016 – GESAU/SEMSA

Manaus, 19 de dezembro de 2016.

AUTORIZAÇÃO PARA REALIZAÇÃO DA PESQUISA NA SEMSA

Declaramos para os devidos fins que a Gerência de Gestão da Educação na Saúde - GESAU autoriza a realização no âmbito da Secretaria Municipal de Saúde – SEMSA da seguinte pesquisa:

TÍTULO: PERFIL BIOQUÍMICO E ANÁLISE DO POLIMORFISMO NOS GENES IRS1 E IRS2 ENVOLVIDOS NA RESISTÊNCIA À INSULINA EM INDIVÍDUOS COM DIABETES MELLITUS TIPO 2 EM MANAUS.

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: LUCIVANA PRATA DE SOUZA MOURÃO

PROFESSOR ORIENTADOR: ADOLFO JOSÉ DA MOTA

INSTITUIÇÃO DE ENSINO: UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS - UEA

PERÍODO DE REALIZAÇÃO: 01/02/2017 a 31/07/2019


LOCAL DA PESQUISA: Policlínica Dr. Raimundo Franco de Sá.

Informamos que o pesquisador responsável apresentou o parecer ético substanciado (anuência) emitido por um Comitê de Ética em Pesquisa - CEP assegurando que os resultados obtidos serão tratados conforme prevê a Resolução CNS 466/2012 e suas complementares; e os objetivos e a metodologia para seu desenvolvimento não irão interferir no fluxo normal da Instituição; não serão utilizados insumos da SEMSA (recursos humanos, material de expediente etc.); nem gerarão ônus para a Secretaria.

Salientamos que esta autorização foi deferida pelo Departamento de Redes de Atenção - DRA é voluntária, podendo a qualquer momento ser solicitado esclarecimentos sobre a pesquisa que está sendo desenvolvida ou até mesmo ser revogada. A mesma corresponde ao projeto básico encaminhado previamente ao gestor do Local da Pesquisa pela Gerência de Gestão da Educação na Saúde.

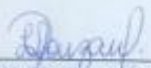
Enfatizamos que o PESQUISADOR RESPONSÁVEL SE COMPROMETE em apresentar cópia deste documento ao gestor do Local da Pesquisa.

Dessa forma, solicitamos que a realização da pesquisa seja acompanhada assegurando o bem-estar dos participantes e pesquisadores.



Ademarina C. J. Pistilli
Gerência de Gestão da Educação na Saúde
SEMSA

ADEMARINA C. J. PISTILLI
Gerência de Gestão da Educação na Saúde
Departamento de Gestão do Trabalho e Educação

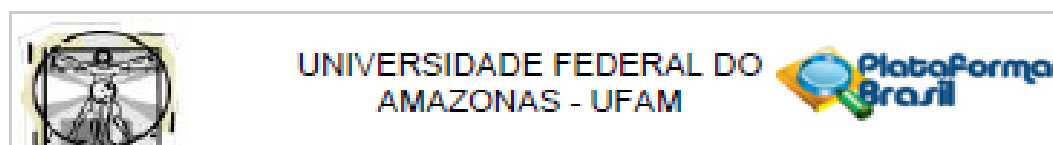


LUCIVANA PRATA DE SOUZA MOURÃO
Pesquisador (a) Responsável

600.963.572-15
CPF

24/01/16
DATA

ANEXO B – Parecer de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Amazonas.



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: PERFIL BIOQUÍMICO E ANÁLISE DO POLIMORFISMO NOS GENES IRS1 E IRS2 ENVOLVIDOS NA RESISTÊNCIA À INSULINA EM INDIVÍDUOS COM DIABETES MELLITUS TIPO 2 EM MANAUS.

Pesquisador: Lucivana Mourão

Área Temática: Genética Humana;

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP);

Versão: 2

CAAE: 60172416.8.0000.5020

Instituição Proponente: UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS

Patrocinador Principal: Universidade Federal do Amazonas - UFAM

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.869.211

Apresentação do Projeto:

Trata-se de resposta do projeto apresentado por Lucivana Mourão, doutoranda no Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia - REDE BIONORTE, Universidade Federal do Amazonas. O projeto foi classificado na Grande Área 2. Ciências Biológicas e na Área Temática Especial Genética Humana: (Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP);

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Detectar indivíduos que apresentem condições de risco que justificam o rastreamento do Diabetes Mellitus tipo 2, tais como hiperglicemia, dislipidemias, excesso de peso, entre outros e analisar o polimorfismo nos genes IRS1 e IRS2 envolvidos na resistência à insulina em indivíduos com Diabetes Mellitus Tipo 2 em Manaus.

Objetivo Secundário:

Caracterizar o perfil clínico e conhecer possíveis fatores ambientais predisponentes em pacientes com Diabetes Mellitus Tipo 2.

Endereço: Rua Teresina, 4950

Bairro: Adrianópolis

CEP: 69.057-070

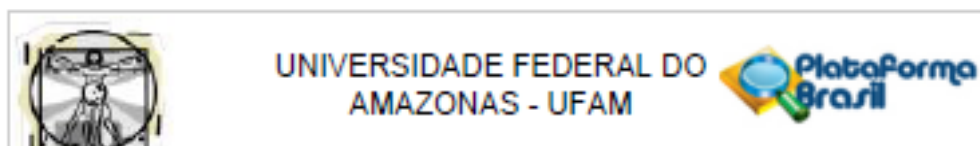
UF: AM

Município: MANAUS

Telefone: (92)3305-5130

Fax: (92)3305-5130

E-mail: cep@ufam.edu.br



Continuação do Pensar: 1.009.211

Relacionar a existência de polimorfismos de base única ou outros tipos de mutações nos genes IRS1 e IRS2, que comprometam a expressão desses genes.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Nesta resposta, a pesquisadora atualizou a redação de riscos no projeto completo:

Os riscos que envolvem dor, formação hematomas, punção em local errado serão reduzidos ou evitados pela execução correta dos procedimentos de coleta, que sempre será realizada por profissional capacitado, que fará todos os procedimentos com muita cautela e seguindo-se corretamente todas as etapas. Os riscos relacionados a aquisição de infecção no momento da coleta serão evitados pela correta assepsia do local, que será realizado utilizando-se etanol ou isopropanol a 70%. As situações constrangedoras serão minimizadas através de orientações que visem tranquilizar o paciente. Garantimos que todos os seus dados sempre serão mantidos em sigilo e nenhuma publicação decorrente do projeto terá sua identificação. Para garantir o sigilo, os dados obtidos por questionário, assim como este documento, serão guardados em armário com chave, com acesso exclusivo pela pesquisadora responsável pelo projeto, e as amostras biológicas identificadas por um código numérico.

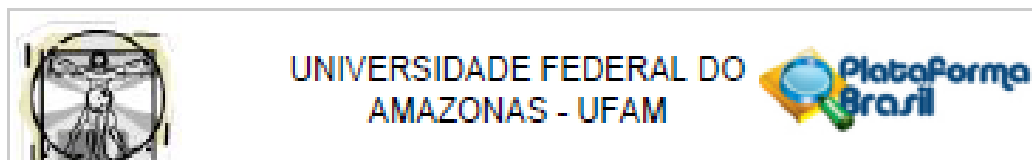
Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Os pacientes incluídos na pesquisa serão avaliados a partir de questionários simples para anamnese e fatores predisponentes associados a DM2, tais como: IMC, patologias associadas, uso de medicamentos para controle da patologia, atividades físicas e recorrência na família. Os dados obtidos serão analisados a partir da estatística descritiva.

A amostra prevista é de 200 participantes, será composta por indivíduos previamente diagnosticados com Diabetes Mellitus tipo 2 (DM2). Os indivíduos serão recrutados pela médica endocrinologista KETTYUSCIA OLIVEIRA (CRM – AM 4030) que atende na POLICLÍNICA RAIMUNDO FRANCO DE SÁ, na cidade de Manaus.

A coleta de material dos indivíduos participantes e a aplicação do questionário serão realizados no próprio local da consulta, e, portanto, não haverá necessidade de deslocamento do paciente para participar da pesquisa. Os indivíduos indicados pela médica, serão convidados a participar da pesquisa, que se fará após esclarecimento e aceitação devidamente documentadas com assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Endereço: Rua Teresina, 4950
 Bairro: Adiantópolis CEP: 69.057-070
 UF: AM Município: MANAUS
 Telefone: (92)3305-5130 Fax: (92)3305-5130 E-mail: cep@ufam.edu.br



Continuação do Projeto: 1.000.211

A composição da amostra ocorrerá no período de fevereiro a dezembro de 2017 podendo este ser estendido de acordo com a necessidade. Os dados serão mantidos em sigilo e nenhuma publicação decorrente do projeto terá identificação dos participantes da pesquisa. Para garantir o sigilo, os dados obtidos por questionário serão guardados em armário com chave, com acesso exclusivo pela pesquisadora responsável pelo projeto, e as amostras biológicas coletadas serão identificadas por um código numérico.

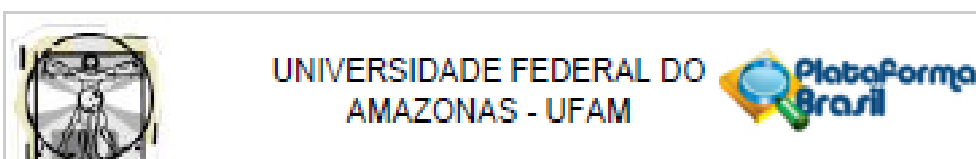
As amostras biológicas serão obtidas de pacientes participantes e então serão processadas para realização de exames bioquímicos e estudo genético. Os procedimentos para coleta de amostras biológicas seguirão as recomendações e legislações vigentes, as quais irão assegurar a qualidade da coleta, sendo executados procedimentos de biossegurança durante todo procedimento de coleta, tais como a higienização das mãos do responsável pelas coletas, antissepsia do local de punção/coleta, uso de EPIs (Equipamentos de Proteção Individual), tais como luvas, jaleco, gorro, sapatos fechados, máscara, etc. O tipo de amostra que pretende-se coletar dos pacientes

corresponde ao sangue venoso, que se fará através do uso de seringas e agulha estéril, que possibilitará obter 10ml de sangue, que serão distribuídos em tubos de coleta para obtenção de soro sanguíneo (tubos de tampa amarela ou vermelha) e sangue total (tubos de tampa roxa, contendo EDTA) destinados à análise bioquímica e microtubos para análise genética.

A análise bioquímica será realizada para triagem dos participantes, que possibilitará confirmar ou detectar alterações que indiquem fatores de risco associado à Diabetes Mellitus, tais como hiperglicemia e dislipidemias.

ANÁLISE GENÉTICA: Para a análise de polimorfismo em genes envolvidos na sinalização celular da Insulina, será extraído DNA total a partir de 1mL de sangue venoso periférico coletado com sistema de seringa e agulha estéreis. Para a extração de DNA será utilizado Kit Purilink® Genomic DNA (Invitrogen™, Thermo), seguindo as recomendações do fabricante. Para a análise, os éxons de cada gene serão amplificados com iniciadores estabelecidos com a ferramenta Primer3web, versão 4.00. Para a reação de amplificação será usado o conjunto de reagentes Taq DNA polimerase pfx ou sistema compatível para reduzir os erros inerentes ao processo in vitro. Os amplicons serão sequenciados com o conjunto de reagentes BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystems™, Thermo) e as sequências serão determinadas em um analisador genético automático ABI 3500XL (Applied Biosystems™, Thermo).

Endereço: Rua Teresina, 4950		
Bairro: Adriánópolis		CEP: 69.057-070
UF: AM	Município: MANAUS	
Telefone: (02)3305-5130	Fax: (02)3305-5130	E-mail: cep@ufam.edu.br



Continuação do Parecer: 1.009.211

A. Critério de Inclusão: Indivíduos previamente diagnosticados com Diabetes Mellitus tipo 2 (DM2) ou aqueles que apresentarem condições de risco que justifique o rastreamento do DM2 tipo 2, maiores de 18 anos. **Critério de Exclusão:** Indivíduos previamente diagnosticado como portador de outras Diabetes Mellitus que não a DM2 ou que não apresentarem condições de risco que justifique o rastreamento do DM2 serão excluídos da composição da amostra.

A pesquisadora informou que **NÃO** haverá retenção de amostras para armazenamento em banco.

Cronograma: Adequado. A etapa de Coleta e processamento das amostras está prevista para início em 01/02/2017 a 29/12/2017.

O apoio financeiro indicado é da Universidade Federal do Amazonas. O orçamento está detalhado e no valor de R\$ 63.000,00 e foi informado que já existe equipamentos e material de consumo destinados a presente pesquisa.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Folha de Rosto: ADEQUADA. [Folha_de_rosto.pdf](#), 01/12/2016 16:42:18. Foi assinada pela pesquisadora responsável e pelo Coordenador Regional da REDE BIONORTE.

Termo de Anuência: ADEQUADO. Foram apresentadas as anuências da Diretora da Policlínica e da médica recrutadora ([Anuencia_Policlinica.pdf](#), 01/12/2016 16:58:59); Anuência do Laboratório de Diagnóstico Molecular da UFAM, assinado pelo Dr. Sparaco Filho ([Anuencia_Laboratorio.pdf](#), 01/12/2016 16:58:26) e Anuência da SEMSA ([Anuencia_SEMSA.pdf](#), 01/12/2016 16:59:2)

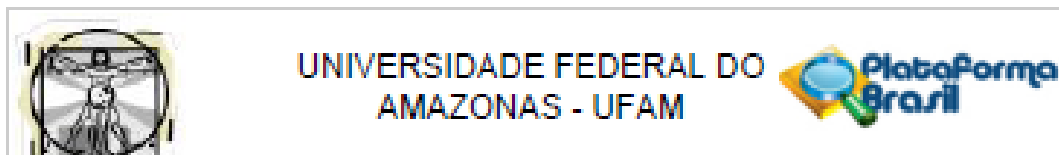
Instrumento de coleta de dados: ADEQUADO. O questionário foi apresentado em [Questionario.pdf](#), 01/12/2016 17:07:11, nesta resposta.

TCLE – ADEQUADO. O modelo corrigido foi apresentado em [TCLE_paciente_corrigido.pdf](#), 01/12/2016 16:50:39.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O protocolo atendeu as pendências apontadas no parecer anterior.

Endereço: Rua Teresina, 4950
 Bairro: Adrianópolis CEP: 69.057-070
 UF: AM Município: MANAUS
 Telefone: (02)3305-5130 Fax: (02)3305-5130 E-mail: cep@ufam.edu.br



Continuação do Parecer: 1.009.211

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_P ROJETO_705616.pdf	01/12/2016 17:17:29		Aceito
Outros	Questionario.pdf	01/12/2016 17:07:11	Ludvana Mourão	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_Corrigido_CEP.pdf	01/12/2016 17:06:11	Ludvana Mourão	Aceito
Outros	Carta_esclarecimento_resposta.pdf	01/12/2016 17:03:45	Ludvana Mourão	Aceito
Outros	Anuencia_SEMSA.pdf	01/12/2016 16:59:21	Ludvana Mourão	Aceito
Outros	Anuencia_Policlinica.pdf	01/12/2016 16:58:59	Ludvana Mourão	Aceito
Outros	Anuencia_Laboratorio.pdf	01/12/2016 16:58:28	Ludvana Mourão	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_paciente_corrigido.pdf	01/12/2016 16:50:39	Ludvana Mourão	Aceito
Outros	Curriculo_Lattes_Ricardo_Lyra.pdf	01/12/2016 16:43:51	Ludvana Mourão	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_rosto.pdf	01/12/2016 16:42:18	Ludvana Mourão	Aceito
Outros	Curriculo_Lattes_Vanda_Santana_Quel roz_Dini.pdf	25/08/2016 13:20:45	Ludvana Mourão	Aceito
Outros	Curriculo_Lattes_Ludvana_Mourao.pdf	25/08/2016 13:20:08	Ludvana Mourão	Aceito
Outros	Curriculo_Lattes_Ana_Paula_Miranda_B arros.pdf	25/08/2016 13:18:40	Ludvana Mourão	Aceito
Outros	Curriculo_Lattes_Adoifo_Jose_da_Mota. pdf	25/08/2016 13:15:56	Ludvana Mourão	Aceito

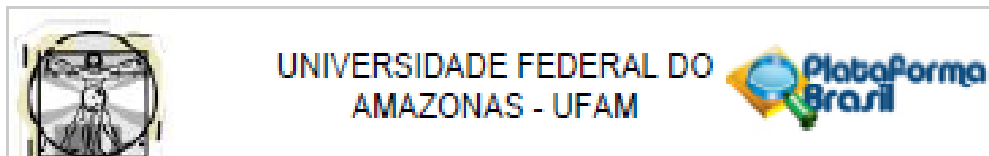
Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Endereço: Rua Teresina, 4050
 Bairro: Adrianópolis CEP: 69.057-070
 UF: AM Município: MANAUS
 Telefone: (02)3305-5130 Fax: (02)3305-5130 E-mail: cep@ufam.edu.br



Continuação do Processo: 1.000.211

MANAUS, 15 de Dezembro de 2015

Assinado por:
Ellana Maria Pereira da Fonseca
(Coordenador)

Endereço: Rua Teresina, 4050
Bairro: Adrianópolis CEP: 69.057-070
UF: AM Município: MANAUS
Telefone: (02)3305-5130 Fax: (02)3305-5130 E-mail: cep@ufam.edu.br

ANEXO C – Sequência de referência do gene *IRS1*, disponível na plataforma NCBI.

```

LOCUS       NG_015830                74474 bp    DNA        linear    PRI 04-MAY-2014
DEFINITION  Homo sapiens insulin receptor substrate 1 (IRS1), RefSeqGene on
            chromosome 2.
ACCESSION   NG_015830
VERSION     NG_015830.1  GI:263191773
KEYWORDS    RefSeq; RefSeqGene.
SOURCE      Homo sapiens (human)
  ORGANISM  Homo sapiens
            Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi;
            Mammalia; Eutheria; Euarchontoglires; Primates; Haplorrhini;
            Catarrhini; Hominidae; Homo.
COMMENT     REVIEWED REFSEQ: This record has been curated by NCBI staff. The
            reference sequence was derived from AC010735.11.
            This sequence is a reference standard in the RefSeqGene project.

            Summary: This gene encodes a protein which is phosphorylated by
            insulin receptor tyrosine kinase. Mutations in this gene are
            associated with type II diabetes and susceptibility to insulin
            resistance. [provided by RefSeq, Nov 2009].
PRIMARY     REFSEQ_SPAN              PRIMARY_IDENTIFIER PRIMARY_SPAN          COMP
            1-74474                  AC010735.11         8898-83371           c
FEATURES             Location/Qualifiers
     source           1..74474
                     /organism="Homo sapiens"
                     /mol_type="genomic DNA"
                     /db_xref="taxon:9606"
                     /chromosome="2"
                     /map="2q36"
     STS              2446..2630
                     /standard_name="RH48420"
                     /db_xref="UniSTS:64081"
     gene             5001..72474
                     /gene="IRS1"
                     /gene_synonym="HIRS-1"
                     /note="insulin receptor substrate 1"
                     /db_xref="GeneID:3667"
                     /db_xref="HGNC:HGNC:6125"
                     /db_xref="MIM:147545"
     mRNA             join(5001..8802,67541..72474)
                     /gene="IRS1"
                     /gene_synonym="HIRS-1"
                     /product="insulin receptor substrate 1"
                     /transcript_id="NM_005544.2"
                     /db_xref="GI:187761322"
                     /db_xref="GeneID:3667"
                     /db_xref="HGNC:HGNC:6125"
                     /db_xref="MIM:147545"
     exon             5001..8802
                     /gene="IRS1"
                     /gene_synonym="HIRS-1"
                     /inference="alignment:Splign:1.39.8"
                     /number=1
     CDS              5053..8781
                     /gene="IRS1"
                     /gene_synonym="HIRS-1"
                     /note="IRS-1"
                     /codon_start=1
                     /product="insulin receptor substrate 1"
                     /protein_id="NP_005535.1"
                     /db_xref="GI:5031805"
                     /db_xref="CCDS:CCDS2463.1"
                     /db_xref="GeneID:3667"
                     /db_xref="HGNC:HGNC:6125"
                     /db_xref="MIM:147545"

```

```

/translation="MASPPESDGFSDVRKVGYLKPKSMHKRFFVLRRAASEAGGPARL
EYYENEKWRHKSSAPKRSIPLESCFNINKRADSKNKHVALYTRDEHFATAADSEAE
QDSWYQALLQLHNRARAGHHDGAAALGAGGGGGSCSGSSGLGEAGEDLSYGDVPPGPAF
KEVWQVILKPKGLGQTKNLIGIYRLCLTSKTI SFVKLNSEAAAVLQLMNIRRCGHSE
NFFPIEVGRSAVTGPGFWMQVDDSVVAQNMHETILEAMRAMSDEFPRRSKSSSSNC
SNPISVPLRRHHLNNPPPSQVGLTRRSRTESITATSPASMVGKPGSFRVVRASDDEGEG
TMSRPASVDGSPVSPSTNRTHAHRHRGSARLHPPPLNHSRSIFMPASRCSFSPATSFPVSL
SSSSTSGHGSTSDCLFRRSSASVSGSPSDGGFISSEYVGSPPCDFRSSFRSVTPDSL
GHTPPARGEELSNYICMGGKGPSTLTAPNGHYILSRGGNGHRCTPGTGLGTSPALAG
DEAASAADLNRFRKRTHSAGTSP TITHQKTPSQSSVASIEEYTEMMPAYPPGGGGGG
RLPGHRHSAPVPTRSYPPEEGLEMHPLERRGGHHRPDSSTLHTDDGYMPMSPGVAPVPS
GRKSGDYMPMSPKSVSAPQIINPIRRHPQRVDPNGYMMSPSGGCSFDIGGGPSSS
SSSSNAVPSGTSYGKLTNGVGGHSHVLPHPKPPVESGGKLLPCTGDYMNMSFVGD
SNTSSPDCYYPEDPQHKPVLSYYSLPRSFKHTQRPGEPEEGARHQHRLRSTSSGRL
LYAATADDSSTSSDSLGGGYCGARLEPSLPHPHQVLQPHLPRKVDTAQAQNSRLA
RPTRLSLGDPKASTLPRAREQQQQQQLLHPPEPKSPGEVUNIEFGSDQSGYLSGPVA
FHSSPSVRCPSQLQPAPREETGTEEYMKMDLGPGRRAAWQESTGVEMGRLGPAFFGA
ASICRPTRAVPSRRGDYMTMQMSCPRQSYVDTSAPAPVSYADMRTGIAAEVSLPRAT
MAAASSSAASASPTGPGQAAELAHSLLGGPQPGGMSAFTRVNLSFNRNQSAKVI
RADPQGCRRRHSSETFSSSTPSATRVGNVTFPGAGAAVGGGGSSSSSESDVKRHSASF
ENVWLRPGLGGAPKEPAKLCGAAGGLENLNYIDLDLVKDFKQCPQECTPEPQPPPP
PPPHQPLGSGESSSTRSSSEDLASAYASISFQKQPEDRQ"
6422..6689
/ gene="IRS1"
/ gene_synonym="HIRS-1"
/ standard_name="GDB:456117"
/ db_xref="UniSTS:157470"
STS 7651..8148
/ gene="IRS1"
/ gene_synonym="HIRS-1"
/ standard_name="PMC86565P4"
/ db_xref="UniSTS:273537"
STS 7808..8070
/ gene="IRS1"
/ gene_synonym="HIRS-1"
/ standard_name="GDB:456125"
/ db_xref="UniSTS:157472"
STS 10454..10620
/ gene="IRS1"
/ gene_synonym="HIRS-1"
/ standard_name="RH69408"
/ db_xref="UniSTS:68843"
STS 11487..11613
/ gene="IRS1"
/ gene_synonym="HIRS-1"
/ standard_name="WI-18042"
/ db_xref="UniSTS:11534"
STS 21826..22056
/ gene="IRS1"
/ gene_synonym="HIRS-1"
/ standard_name="D282389"
/ db_xref="UniSTS:49035"
STS 40107..40440
/ gene="IRS1"
/ gene_synonym="HIRS-1"
/ standard_name="SHGC-82871"
/ db_xref="UniSTS:103348"
STS 61005..61157
/ gene="IRS1"
/ gene_synonym="HIRS-1"
/ standard_name="RH68643"
/ db_xref="UniSTS:34203"
exon 67541..72474
/ gene="IRS1"

```


2101 ccattttccaa atatctgcta ttaatatgcct tgctgtagtg ggcaactgtg cccacatcac
 2161 caagctgtca gaggaaaaaaggaggagggt ttcaattcaa catgtgtact caaattatag
 2221 attaaccagg tttagatgag gctgcatgac gaccgggaac aggaagggga gaggagaaac
 2281 gagaggctcc caggcttggg tggggaggag cccctctgca gatgccaat cccctaat
 2341 tacgtatcgc acacccctga atggcgccba tggttctttt tctccttcab catcatcac
 2401 ttctttttct ttttttacta cgctttgcaa cctaccttg taccctcaac ccttctaccc
 2461 ccccttccc tctgcagtgc aaggcttgaa aaacaggcca tcccaccaat cagcaggcct
 2521 ccccgggaaa ctgcctccgc cctcagccc cattgggccc aggcgcgctc ccccgggcc
 2581 cgccgggtcc cagccactga gcatgcccag cgcctcgact gctgagtgc cagccagcat
 2641 cctgcagtgc ctgggagcct gaggccgagg aggtcccgg cgtagttaaag gggcggcaac
 2701 cccaaaccgg ccaggcatca aaatgagaca gcattaaacc gactgacatc tctgtgggtc
 2761 cttagtgccca ggcgagcaag cagggacaaa ctgcttgttt ataggctggc tbaaaaaata
 2821 aaaaaactct ggggagcgtt tgtttgtggg gagactgata ccgcaagggt accctgaaag
 2881 gggcgttca agtagaccca ggctgctgat ctggctcact catgaagtaa ccattttcct
 2941 gtacagttga gctggcacca tccctgtttt cctctgttta tcttgtgggt caaggttaa
 3001 aacttatagg gtggttcaat ggggtgtggg cctgtgtgtg aaacaaacat ttcagccaat
 3061 atttgcacag tagggttttg gccttatgaa cctctgaaag gtccctaaca gctttttaa
 3121 gtcacgggata gacttcggaa tatgataaag gacctctcat tccccctccc ccattgccc
 3181 agccttaggt gtgagtcccc ccgtcacacg gatgggcaag gggagcagga gaaaagggtg
 3241 tatttacatt ttctccctac ttgatcagca actaattcca cagcgcggga cgtgagacac
 3301 ttcttgggga tccctgttct ccttttgtag tgaccataac tgccccagt cactgccc
 3361 ggcgttcccc ctgttccctc caggtaacct acgtgggat cctgagggat cccaaggtg
 3421 aaggctggcc cagaagtccc ttagaaaaac cttaaaaaat acagatcccc tcaccatggc
 3481 ctatgcacct gaagccgaaa tctagctttt aaatttcttg ggggaaacag ccttgactag
 3541 aaacctcccc ccggtgggtc agtcttacct gataggtaag aggcagcccc gctccggcgc
 3601 ccccgccctc ccccgccctc ccaactcggg ctctgtagcc gcagtgcctc cccgtggccc
 3661 cccacctca ctctgcgctc ttcccagact cgccccctcc cgttttccca gactcccc
 3721 gtgctttcgg gttagccacc aaacaccccc gcctgcgccc gcccggggga tctctgggg
 3781 ccggggggcg cccggttggc gcgcgtgtag cgcggcgtg tgggagcctg cgcggcgg
 3841 cagggggcgt gtccctagcgc tgcgccccgg tggcgcggg cgcggcgtca gcacggcgtg
 3901 gggggcggga gggggcggcg cggggcgggc tgggccccga atgtagagac ccggggcggg
 3961 gcctccccgg ggcggctgcc cggctgccga gcgaggagg tccgtcacgt gttttctcc
 4021 tccgagtgag accggcggcg ggtcggagg ggcggcggc cagagccaga cgcggcggc
 4081 tgttttgggt ggggctctcg gcaactctcc gaggaggagg aggaggagg aggaggagg
 4141 aagtaactgc agcggcagc cctcccagg aacaggcgtc tccccgaac ccttcccaa
 4201 cctccccat cccctctcgc cctgttccc tccccctc cccagagct cccagagct
 4261 ggcagggatg agtctgtccc tccggccgg tcccagctgc agtggtgct cggtatcgt
 4321 tgcgatggaa aagccaactb ctccaccgc cgagatgggc ccggatgggg gctgcagagg
 4381 accgccccgc gggcggcggc agcagcagca gcagcagcag cagcaacagc aacagccgca
 4441 gcgcccgggt ctctgcgact gagctgggat ttggggcgg ggtggcggct gggacgggtg
 4501 ggggggtggg gagggcgaag gaggaggagg aaccccgtgc aacgttggga cttggcaacc
 4561 cgcctcccc aagcccaagg tatbtaattt gcctcgggaa tgcgtgcttc cagagggaa
 4621 ctccaggagg aaggcgcgcg cgcgcgcgc ctctggagg ggcaccgag ggaacccga
 4681 ctgtgcctc cctgtgccg actccagcc gggcgaagc agatgcatc tgcctcctc
 4741 ctggtggcgg cggcggctga gaggagact ggctctcgg ggatcggggc tgccctcacc
 4801 ccggacgcac tgcctcccc cggggcgtga agcgcgccaa aactccggc gggctctctc
 4861 ctgggctcag cagctgcgtc ctccctcagc tgccccctcc cggcgcgggg ggcggcgtg
 4921 atttcagagt cggggtttct gctgcctcca gccctgtttg catgtgccc ggcggcggg
 4981 ggagcctccg cccccacc ggttgttttt cggagcctcc ctctgctcag cgttgggtg
 5041 ggcgggtgca gcaatggcag cctccggag agcgatggct tctcggact gcgcaagggt
 5101 ggctacctgc gcaaacccaa gacatgcac aaacgcttct tctactgct cgcggccagc
 5161 gaggctgggg gcccgggcgc cctcagatc tacgagaac agaagaagt gcgcaacaag
 5221 tcgagcgcgc ccaaacgctc gatccccctt gagagctgct tcaacatcaa caagcgggt
 5281 gactccaaga acaagcactt ggtggctctc tacacccggg acgagcact tgcctcggc
 5341 gccgacagcg aggcgagca agacagctgg taccaggctc tctacagct gcacaaccgt
 5401 gctaagggcc accacagcgg agctgcggc ctggggcgg gagggtgtg ggcagctgc
 5461 agcggcagct ccggccttgg tgaggctgg gaggacttga gctacgggtg cgtccccca
 5521 ggacccgcat tcaaaagagt ctggcaagt atcctgaag ccaagggcct gggctcagaca
 5581 aagaacctga ttggtatcta ccgcttttgc ctgaccagca agaccatcag ctctgtgag
 5641 ctgaactcgg aggcagcggc cgtgggtgct cagctgatga acatcaggcg ctgtggccac
 5701 tcggaaaact tcttcttcat cgagggtggc cgttctgccc tgacggggcc cggggagttc
 5761 ttgatgcagg ttgatgact tgtgggtggc cagaacatgc acgagaccat cctgtaggcc
 5821 atgcgggcca tgagtatga ctctccgccc cgcagcaaga gccagctctc gtcccaactc
 5881 tctaacccca tcagcgtccc ctgcgcgg caccatctca acaatcccc gccacgccag

5941 gtggggctga cccgcccgatc accgactgag agcatcaccg ccacctcccc gggcagcatg
6001 gtggggcgga agccaggctc cttccgtgtc cgcgcctcca gtgacggcga aggcaccatg
6061 tcccggcccag cctcgggtgga cggcagccct gtgagtccca gcaccaacag aaccaccgcc
6121 caccggcacc cggggcagcgc cgggctgcac ccccgcctca accacagccg cteccatccc
6181 atgcccggctt cccgctgtct gccttcggcc accagcccgg tcagtctgtc gtccagttagc
6241 accagtggcc atggctccac ctccggtgtt ctcttcccac ggcgatctag tgcttcgggtg
6301 tctgggtccc ccagcgtatg cggtttccatc tcctcggatg agtatggctc cagtccctgc
6361 gatttcccga gttccttccc cagtgtcact cgggattccc tgggccacac cccaccagcc
6421 cgcggtgagg aggagctaaag caactabata tgcattgggtg gcaaggggcc cteccacctg
6481 accgccccca accggtcacta cttttgtct cggggtggca atggccaccg ctgccccca
6541 ggaacaggct tgggcacgag tccagccttg gctggggatg aagcagccag tgctgcagat
6601 ctggataaat gggtcccgaag gagaactcac tggcaggcca cteccctcac cattaccacc
6661 cagaagaccc cgtcccagtc ctccagtggc tccattgagg agtacacaga gatgatgcct
6721 gcctaccacc caggagggtg cagtggaggc cgaactggcg gacacaggca ctccgccttc
6781 gtgcccaccc gctcctaccg agaggagggt ctggaaatgc accccttggg cgttcggggg
6841 gggcaccacc gccccagacag ctccaccctc cacacggatg atggctacat gcccattgtc
6901 ccagggggtg ccccagtgcc cagtggccga aagggcagtg gagactabat gcccattgagc
6961 cccaagagcg tatctgcccc acagcagatc atcaatccca tcagacgcca tcccagaga
7021 gtggacccca atggctacat gatgatgtcc cccagcgggtg gctgctctcc tgacattgga
7081 ggtggcccca gcagcagcag cagcagcagc aacgcctgct ctctcgggga cagtatggga
7141 aagctgtgga caaacggggt agggggccac cactctcatg tcttgcctca cccccaaacc
7201 ccagtggaga gcagcgggtg taagctctta ccttgccacg gtgactacat gaacatgtca
7261 ccagtggggg actccaacac cagcagcccc tccgactgct actaccggcc tgaggacccc
7321 cagcacaagc cagtcctctc ctactactca ttgccaagat cctttaagca caccacggc
7381 cccgggggag cggaggaggg tgcccggcat cagcacctcc gcctttccc tagctctggg
7441 cgccttctct atgctgcaac agcagatgat tcttctctct cccaccagag cgacagcctg
7501 ggtgggggat actgcccggc taggctggag cccagccttc cacatcccca ccatcagggt
7561 ctgcagcccc atctgctctg aaagggtggc acagctgtct agaccaatag cgcctgggcc
7621 cggcccacga ggctgtccct ggggggatccc aaggccagca ccttacctcg gggccgagag
7681 cagcagcagc agcagcagcc cttgtctgca cctccagagc ccaagagccc gggggaatat
7741 gtcaaatatt aatttgggag tgatcagctt ggtactctgt ctggcccggg ggctttccc
7801 agctcacctt ctgtcaggtt tccatcccag ctccagccag ctcccagaga ggaagagact
7861 ggcactgagg agtacatgaa gatggacctg gggccgggcc ggaggggcagc ctggcaggag
7921 agcactgggg tcgagatggg cagactgggc cctgcacctc cgggggctgc tagcatttgc
7981 aggcctaccc gggcagtgcc cagcagccgg ggtgactaca tgaccatgca gatgagttgt
8041 ccccgctcaga gctacgtgga cacctcgcga gctgcccctg taagctatgc tgacatgga
8101 acaggcattt ctgcagagga ggtgagcctg cccagggcca ccatggctcg tgctcctca
8161 tccctcagcag cctctgcttc cccgactggg cctcaagggg cagcagagct ggctcccac
8221 tcgtccctgc tggggggccc acaaggacct gggggcatga ggccttccac cgggtggaac
8281 ctccagctca accgcaacca gagtgcctaaa gtgatccgtg cagaccacac aggggtgccg
8341 cggaggcata gctccgagac tttctcctca acaccagtg ccaccgggtt gggcaacaca
8401 gtgccccttg gagcgggggg agcagtaggg ggcgggtggc gttagcagcag cagcagcag
8461 gatgtgaaac gccacagctc tgcttccctt gagaatgtgt ggctgagcc tggggagctt
8521 gggggagccc ccaaggagcc agccaaactg tgtgggctg ctggggggtt ggagaatggt
8581 cttaactaca tagacctgga tttggtcaag gacttcaaac agtgcccctc ggagtgacc
8641 cctgaaccgc agcctccccc acccccaccc cctcatcaac cctggggcag cggtgagagc
8701 agctccaccc gccgctcaag tgaggattta agcgcctatg ccagcctcag tttccagaag
8761 cagccagagg accgtcagta gctcaactgg acatcacagc aggtgcgctt catggtgaca
8821 aagtcaaga aaaaaactgc ttttaacctt gtccttgaat tctgttcttc gcctctgcc
8881 ctctctgttc tttcccactg ctctctcagg gagaatgcac ttacattctc agggcacaca
8941 agatgctcac cccacactga catctggcag agagtcaaac aaacatgtag gagcagccac
9001 aggagggtct tttcgtttga gaattcccaa gtgaagtatg tactgcagta tttttaaaa
9061 atatatccca tgccagttct gcgttttcta gactcctcc gtaagaagct tgatttgggt
9121 gttgaaagttt tcttttcaat atatattagt gtcagccctt ggaagggaca gttctacaaa
9181 aaatatttgt taacacaggg gctaaaacct tcttatctt aaactatctt aatagttct
9241 gggagccctt aagggtgatc ttatcaagtt gttctctgta cttttgttct gtgatctcat
9301 aatactaggg caacataaac agcagcggga agcattgatt tctattcacc ctgcccataa
9361 aagatcagga gtaagagctt tttagaataa tgbatttaga gagaagtacc taccatattt
9421 gtgatctctc aagaaaagtaa ttatgggtga cgttctctct ttgttcatgt accagatttt
9481 gtgaaatatt attcacacac cgacccacca tcccacgggc ctggcctctc ttgtacagga
9541 tatgcaggaa actctgtatg tgtctgggac ccattattaa gagttatggg agttcatcct
9601 aggatgtctg ccttatagtt atctctctct gcaactgagac attacagata tcatttgggg
9661 gctactatat atcttctgta aaattacttt tatttgttga gaagaatgca tactaagtca
9721 ggaacatgcc ttaatttgtt ttgttttgca ttgagtagaa gggctaaact gtataccctc

ANEXO D – Declaração de publicação.



DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins de justificativa, que a doutoranda Lucivana Prata de Souza Mourão CPF de nº 600.963.572-15 é autora principal do Resumo Científico "TYPE 2 DIABETES MELLITUS: COMORBIDITIES, CLINICAL COMPLICATIONS AND BEHAVIORAL VARIABLES IN AN AMAZONAS SAMPLE" aprovado para publicação na revista *Diabetology & Metabolic Syndrome (DMS)*, o qual será apresentado pela mesma, em forma de pôster, durante o XXII Congresso da Sociedade Brasileira de Diabetes, a se realizar no período de 16 a 18 de outubro de 2019, no Centro de Convenções de Natal/RN.

Natal, 29 de setembro de 2019.

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'Lucivana Prata de Souza Mourão', is written over a faint, light-colored rectangular stamp or watermark.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES

CNPJ: 30.902.670/0001-64