



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de São José do Rio Preto

Programa de Pós-graduação em Genética

ANA CAROLINA BONINI DOMINGOS

**Avaliação dos polimorfismos nos genes da
enzima conversora de angiotensina e adenosina
deaminase em pacientes com Diabetes melito
Tipo 2**

Dissertação apresentada para
obtenção do título de Mestre em
Genética junto ao Programa de Pós-
Graduação em Genética do Instituto
de Biociências, Letras e Ciências
Exatas da Universidade Estadual
Paulista "Julio de Mesquita Filho",
Campus de São José do Rio Preto.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Carlos de Mattos

São José do Rio Preto – SP
2010

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Hemoglobinas e Genética das Doenças Hematológicas, do Departamento de Biologia do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, UNESP de São José do Rio Preto, com auxílio financeiro da Capes.

ANA CAROLINA BONINI DOMINGOS

**AVALIAÇÃO DOS POLIMORFISMOS NOS GENES DA ENZIMA
CONVERSORA DE ANGIOTENSINA E ADENOSINA DEAMINASE EM
PACIENTES COM DIABETES MELITO TIPO 2**

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Luiz Carlos de Mattos

Professor Adjunto Doutor

FAMERP - São José do Rio Preto

Presidente e Orientador

Prof. Dr. Antonio Carlos Pires

Professor Adjunto II-D

FAMERP: São José do Rio Preto

Prof. Dr. Haroldo Wilson Moreira

Professor Titular

UNESP - Araraquara

São José do Rio Preto, 18 de Fevereiro de 2010.

Dedico esse trabalho à minha amada família e a Deus.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por tudo.

Aos meus pais Luis e Claudia, minha irmã, Ana Luiza e minha avó Nadir, pelos ensinamentos diários, apoio, carinho e amor incondicional em todos os momentos de minha vida. Por acreditarem em mim e me ajudarem concretizar esse sonho. Sem vocês, nada disso seria possível.

Aos meus avôs Waldemar (in memorian) e Joaquim (in memorian) e ao tio Beto (in memorian) que sempre me protegeram, estiveram ao meu lado em todos os momentos.

Ao meu noivo Marcos, pelo amor que me completa, pelo carinho e apoio, pelos momentos maravilhosos e pela sabedoria que tanto me ensina.

Aos amigos do Laboratório de Hemoglobinas e Genética das Doenças Hematológicas (LHGDH) pelo apoio e amizade, auxílio em boa parte do meu trabalho, ensinamentos e pelas boas risadas que aliviavam as tensões do dia-a-dia.

À amiga Luciana Ondeí pelo auxílio com as análises estatísticas, pela amizade e carinho.

Ao Dr. Octávio Ricci e à Dra. Dorotéia Rossi pelo carinho, atenção e valorosa colaboração durante a qualificação.

Às amigas do laboratório de Imunogenética, pela amizade, carinho e apoio em todos os momentos.

Ao Edi Carlos Iacida, pelo auxílio com as amostras do trabalho e sua disposição para ajudar sempre.

AGRADECIMENTO

*Ao meu orientador, **Prof. Dr. Luiz Carlos de Mattos**, por ter me acolhido em um momento de dificuldade, por seus ensinamentos que me auxiliaram tanto em meus estudos, pelo apoio, carinho e amizade.*

Meu eterno agradecimento.

*“Seja qual for o seu sonho - comece. Ousadia tem genialidade,
poder e magia.”*

Goethe

SUMÁRIO

CAPÍTULO I

1 INTRODUÇÃO GERAL	14
1.1 Diabetes melito	14
1.1.1 Diabetes melito tipo 2.....	17
1.2 Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona.....	19
1.2.1 Polimorfismo do gene da ECA	22
1.3 Adenosina Deaminase	23

CAPÍTULO II

2 OBJETIVOS	28
2.1 Gerais.....	28
2.2 Específicos.....	28

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Casuística.....	28
3.2 Considerações Éticas	33
3.3 Métodos	33

CAPÍTULO III

Artigo: Polimorfismo da Enzima Conversora de Angiotensina (ECA) em indivíduos com Diabetes Melito tipo 2 no Brasil.....38

CAPÍTULO IV

Artigo: Diabetes melito tipo 2 e frequência do polimorfismo *ADA**2 do gene da adenosina deaminase em população miscigenada.....58

CAPÍTULO V

4. Discussão Geral.....	75
5. Conclusões.....	77
6. Referências.....	78

APÊNDICE 1 – Planilha com dados demográficos e testes laboratoriais de diagnóstico em diabéticos..... 89

APÊNDICE 2 - Planilha com dados demográficos e testes laboratoriais de diagnóstico em diabéticos com elevado risco de doença cardiovascular.....99

APÊNDICE 3 – Protocolo de Extração do DNA 102

APÊNDICE 4 - Análise do Polimorfismo I/D do gene da ECA.....104

APÊNDICE 5 - Análise do polimorfismo *TaqI* do gene da *ADA*..... 107

RESUMO..... 10311

SUMMARY.....113

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 - Sistema Clássico Renina-Angiotensina-Aldosterona.....20

FIGURA 2 - Novo Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona.22

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Classificação etiológica dos distúrbios de glicemia.....	16
TABELA 2 - Valores de referência dos testes bioquímicos utilizados.....	30
TABELA 3 - Informações demográficas e de testes laboratoriais dos grupos de estudo.....	32

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DM – Diabetes melito
DMT1 – Diabetes melito tipo 1
DMT2 – Diabetes melito tipo 2
TTG – Teste oral de tolerância à glicose
Hb A1c – Hemoglobina glicada
SRAA – Sistema Renina Angiotensina Aldosterona
PA – Pressão arterial
ECA – Enzima Conversora de Angiotensina
AngI – Angiotensina I
AngII – Angiotensina II
cAMP – AMP cíclico
ADA – Adenosina Deaminase
HDLc – HDL colesterol
LDLc – LDL colesterol
Asp - Ácido aspártico
Asn – Asparagina
HCl – Ácido clorídrico
MgCl₂ - Cloreto de magnésio
NaCl – Cloreto de sódio
KCl – Cloreto de potássio
EDTA – Ácido etilenodiaminotetracético
DMSO – Dimetilsulfóxido
TE – Tampão Tris-EDTA
PCR – Reação em Cadeia da Polimerase
OR – Odds Ratio
IC – Intervalo de Confiança
IAM – Infarto Agudo do Miocárdio
OMS – Organização Mundial de Saúde
A.D.A. – Associação Americana de Diabetes
cAMP – AMP cíclico
UCP1 – Proteína desacopladora mitocondrial 1
SNC – Sistema Nervoso Central

Ang-(1-7) – Angiotensina-(1-7)

PCR-RFLP – Reação em Cadeia da Polimerase com Polimorfismo de Fragmento de Restrição

ACP1 – Fosfatase ácida 1

CAPÍTULO I

1 INTRODUÇÃO GERAL

1.1 Diabetes melito

O diabetes melito (DM) é um grupo heterogêneo de alterações metabólicas caracterizado por hiperglicemia crônica, com alterações do metabolismo de carboidratos, ácidos graxos e proteínas. A observação mais freqüente é a hiperglicemia em jejum, mas que também pode ser reconhecido durante estágios menos evidentes, pela presença de intolerância à glicose. Geralmente é causado por defeitos na secreção e/ou ação da insulina, podendo também estar relacionado à resposta diminuída do tecido em um ou mais pontos da via de ação desse hormônio. Vários processos patogênicos estão envolvidos no desenvolvimento desta doença, como destruição auto-imune das células β pancreáticas, responsáveis pela produção de insulina, e alterações que resultam na resistência à ação deste hormônio (COTRAN et al., 2000; AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2009).

Os sintomas de hiperglicemia incluem poliúria, polidipsia, perda de peso, polifagia, alterações visuais, diminuição do crescimento e suscetibilidade a infecções. Em formas mais graves, podem ocorrer cetoacidose ou estado hiperglicêmico hiperosmolar que, na ausência de tratamento efetivo, leva a estupor, coma e morte. Muitas vezes, a hiperglicemia suficiente para causar alterações patológicas funcionais, pode estar presente por um longo período de tempo do diagnóstico. Em consequência, o diabetes é frequentemente descoberto em decorrência de resultados anormais de exames de sangue ou urina de rotina, ou da presença de complicações (KHAN et al., 1994; THE EXPERT COMMITTEE ON THE DIAGNOSIS AND CLASSIFICATION OF DIABETES MELLITUS, 2009).

A hiperglicemia crônica do diabetes está associada a danos em longo-prazo, disfunções e insuficiência de vários órgãos, especialmente olhos, rins, nervos, coração e vasos sanguíneos. No sistema nervoso central (SNC) é comum o aparecimento de microangiopatias, infartos vasculares cerebrais e hemorragias. Periféricamente observa-se neuropatia com risco de úlceras de pé, amputações e artropatia “charcot”. Na neuropatia autônoma são relatadas alterações distúrbios gastrintestinais geniturinários e disfunção sexual. Nos microangiopáticos, retinopatia, catarata, glaucoma; distúrbios cardiovasculares, como aterosclerose, hipertensão e infarto agudo do miocárdio (IAM).

Os danos renais incluem nefrosclerose, com glomerulosclerose, arteriosclerose e glomerulonefrite. O diabetes também aumenta o risco de obesidade, dislipidemias e alterações nos fatores de coagulação (SAVAGE, 1996; COTRAN et al., 2000; THE EXPERT COMMITTEE ON THE DIAGNOSIS AND CLASSIFICATION OF DIABETES MELLITUS, 2009).

Embora inúmeras causas específicas do DM tenham sido identificadas, a etiologia e a patogênese dos tipos mais comuns são menos claramente compreendidas. A maioria dos casos de diabetes é classificada em duas categorias etiopatogênicas amplas, denominadas diabetes melito tipo 1 (DMT1), e diabetes melito tipo 2 (DMT2), mas a extensão da heterogeneidade entre esses tipos permanece incerta. Em decorrência do número crescente de formas de diabetes para os quais uma etiologia específica pode ser atribuída, a classificação clínica atual, proposta pela Associação Americana de Diabetes (American Diabetes Association – A.D.A.), em 1997 e adotada pela Organização Mundial de Saúde (OMS) em 1999 e que substitui a classificação previamente reconhecida internacionalmente de 1985 da OMS, classifica o diabetes de acordo com os estádios clínicos e tipos etiológicos. Os estádios clínicos refletem que o diabetes progride durante sua história natural e que os indivíduos podem se mover de um estágio para o outro em qualquer direção. (WHO STUDY GROUP, 1985; SECRETARIA DE ESTADO DE SAÚDE DE MINAS GERAIS, 2006; THE EXPERT COMMITTEE ON THE DIAGNOSIS AND CLASSIFICATION OF DIABETES MELLITUS, 2009).

Indivíduos que desenvolvem diabetes passam por vários estádios clínicos durante a evolução da doença. Inicialmente, a regulação da glicose é normal e nenhuma anormalidade glicêmica pode ser identificada, mesmo se esses indivíduos passarem por um teste oral de tolerância à glicose (TTG). No entanto, neste estágio já podem ser observadas lesões histológicas pancreáticas nesses indivíduos. Depois ocorre um período, de duração variável, no qual a regulação da glicose é comprometida. Esses indivíduos podem apresentar anormalidade da concentração da glicose em jejum, ou demonstrar intolerância à glicose no TTG. O diagnóstico pode ser realizado por glicemia em jejum alterada, anormalidades marcadas de tolerância à glicose. (SAVAGE, 1996; GRUPO INTERDISCIPLINAR DE PADRONIZAÇÃO DA HEMOGLOBINA GLICADA, 2009).

A classificação etiológica do DM atualmente recomendada pela OMS e pela A.D.A. é apresentada na Tabela 1. Essa classificação difere daquela previamente

recomendada, que utilizava os termos diabetes insulino-dependente e diabetes não-insulino-dependente (WHO STUDY GROUP, 1985). Esses termos, utilizados erroneamente, apenas classificavam os pacientes com base nas necessidades de tratamento, ao invés de características etiológicas. Os termos DMT1 e DMT2 foram adotados para as formas mais comuns de DM.

Tabela 1 - Classificação etiológica dos distúrbios de glicemia.

CLASSIFICAÇÃO	CARACTERÍSTICAS
Diabetes tipo 1 (DMT1)	Destruição das células β pancreáticas, geralmente levando à deficiência absoluta de insulina. Pode ter causas A) Auto-ímmunes (DMT1-A; B) Idiopáticas (DMT1-B).
Diabetes tipo 2 (DMT2)	Varia entre resistência à insulina com relativa deficiência dessa a um defeito predominantemente secretor com ou sem resistência à esse hormônio.
Diabetes gestacional	Caracteriza-se pela intolerância a carboidratos, associada à hiperglicemia de gravidade variável, com o início ou primeiro reconhecimento durante a gravidez. Está associado a um risco maior de morte fetal intra-uterina, hipoglicemia, icterícia, policitemia e hipocalcemia neonatal, macrossomia e prematuridade.
Outros tipos específicos	Defeitos genéticos da função da célula β . Defeitos genéticos na ação da insulina. Doença do pâncreas exócrino. Endócrinopatias. Induzido por drogas ou químicos. Infecções. Formas incomuns de diabetes imuno-mediado. Outras síndromes genéticas às vezes associadas ao diabetes.

Referência: KAHN et al., 2009. (modificado)

1.1.1 Diabetes melito tipo 2

Esta forma de diabetes, antigamente referida como diabetes não-insulino-dependente ou diabetes adulta, é a forma mais comum da doença. Caracteriza-se principalmente por modificações da ação e secreção de insulina. Embora sua etiologia, genética e fisiopatologia específicas não sejam completamente determinadas, a destruição auto-imune das células β não ocorre, e os pacientes não apresentam outras causas de diabetes (REAVEN et al., 1976; DEFRONZO et al., 1979; TURNER et al., 1979; OLEFSKY et al., 1982).

Ao contrário do DMT1, que resulta de um único mecanismo fisiopatológico - a destruição auto-imune das células β e conseqüente ausência de insulina endógena - a maioria dos pacientes com DMT2 apresenta dois defeitos aparentemente diferentes: **A.** deterioração na capacidade dos tecidos muscular e adiposo em responder à insulina, ou seja, resistência à esse hormônio, e **B.** deficiência da célula β em compensar essa resistência à insulina com aumentos na secreção desse hormônio (KAHN, 1994).

O DMT2 frequentemente permanece não diagnosticado por muitos anos, pois a hiperglicemia se desenvolve gradualmente e, em estágios mais precoces, não é grave o bastante para a notificação dos sintomas clássicos pelo paciente. A cetoacidose raramente ocorre espontaneamente neste tipo de diabetes, e quando identificada, geralmente está associada ao estresse ou outra doença como, por exemplo, infecções. No entanto, estes pacientes apresentam elevado risco de desenvolvimento de complicações macro e microvasculares (MOSS et al., 1984; FUJIMOTO et al., 1987; HARRIS, 1989; UUSITUPA et al., 1993; KUUSISTO et al., 1994; ANDERSSON; SVAARDSUDD, 1995; BUTKIEWICZ et al., 1995; UMPIERREZ et al., 1995).

A maioria dos pacientes com esta forma de diabetes são obesos, ou apresentam acúmulo de gordura na região abdominal, fatores que por si só causam diversos graus de resistência à insulina. Nestes indivíduos, a secreção de insulina é defeituosa e ineficiente para compensar a resistência do organismo, fator que pode ser contornado por meio da redução de peso e/ou tratamento farmacológico da hiperglicemia, mas que raramente retornará ao normal (KAHN et al., 2009).

O risco de desenvolvimento do DMT2 aumenta com a idade, obesidade e sedentarismo, ocorrendo frequentemente em indivíduos hipertensos e/ou dislipidêmicos, apresentando frequência variável em diferentes grupos étnicos. Associa-se à elevada

predisposição genética, mais do que a forma auto-imune, mostrando forte agregação familiar, de modo que as pessoas com um dos pais ou irmão com a doença apresentam maior risco de desenvolvimento (BARNETT et al., 1981; KOLTERMAN et al., 1981; KISSEBAH et al., 1982; SCARLETT et al., 1982; SIMONSON et al., 1984; BOGARDUS et al., 1985; FIRTH et al., 1986; HENRY et al., 1986; FUJIMOTO et al., 1987; NEWMAN et al., 1987; ZIMMET et al., 1992; WING et al., 1994; HARRIS et al., 1995).

A contribuição de fatores genéticos para o desenvolvimento da resistência à insulina, deterioração da secreção de insulina e o DMT2 é conhecida há muitos anos (PINCUS; WHITE, 1933; HARRIS, 1950). As evidências que fornecem suporte científico a essa hipótese incluem agrupamento familiar dessas características, taxa de concordância mais elevada do DMT2 entre gêmeos monozigóticos *versus* gêmeos dizigóticos, e alta predominância em determinados grupos étnicos (GOTTLIEB, 1980; NEWMAN et al., 1987; KNOWLER et al., 1990; FLEGAL et al., 1991). Todavia, os fatores ambientais também desempenham papel importante no aparecimento da doença, como por exemplo, dieta e estilo de vida (KAWATE, et al., 1979; POULSEN et al., 1999; MOKDAD et al., 2000). Conseqüentemente, o diabetes é considerado um distúrbio complexo, com fatores genéticos que aumentam a suscetibilidade sobre a qual os fatores ambientais atuam, viabilizando o desenvolvimento da hiperglicemia. Estima-se que entre 25% e 70% das ocorrências do DMT2 sejam atribuídos a fatores genéticos (POULSEN et al., 1999).

Estudos de padrões hereditários indicam que vários genes provavelmente estejam envolvidos na etiopatogenia do DMT2, embora seu número e contribuições relativas não sejam muito precisos. Diferentes *loci* podem contribuir para a etiologia, interagindo entre si. Entretanto, os genes podem também, pertencer a caminhos diferentes, cada um sendo responsável pelo desenvolvimento do diabetes em diferentes subconjuntos de indivíduos (heterogeneidade genética) (RICH, 1990; COOK et al., 1994).

A frequência do DMT2 varia consideravelmente entre diferentes subgrupos étnicos. Indivíduos com descendência indígena, polinésia ou micronésia, asiático-indiana, hispânica ou afroamericana têm risco maior do que indivíduos de origem européia (WEBER, 1990; LANDER et al., 2001). Pesquisas populacionais indicam aumentos na predominância dessa doença, especialmente em indivíduos mais jovens, com um aumento total de 33% e de 70% na faixa etária de 30 a 39 anos, no período de

1990 a 1998 (MOKDAD et al., 2000). A prevalência do DMT2 na população adulta brasileira era de 8 % no final da década de 80, e em 2006, aproximadamente 11% da população com idade igual ou superior a 40 anos apresentava essa doença (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006). Outro fato que têm preocupado os órgãos de saúde é o elevado número de diagnósticos de DMT2 na faixa pediátrica (GLASER, 1997). O número crescente de indivíduos afetados, juntamente com a lista extensiva de complicações de longo prazo, incluindo aterosclerose acelerada, nefropatia, retinopatia e neuropatia, fazem do DMT2 um sério problema de saúde pública (DIABETES RESEARCH WORKING GROUP, 1999). A ocorrência desses fatores criou a necessidade de entendimento da genética e do ambiente na etiologia dessa doença, indicando caminhos para a compreensão de seus defeitos primários e permitindo a realização de testes para identificação de indivíduos com alto risco de desenvolvimento da doença e suas complicações. O conhecimento gerado pelas pesquisas conduzirá a novas formas de tratamento e prevenção que auxiliarão no aumento e melhora da qualidade de vida das populações.

1.2 Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona

Desde sua descoberta em 1898 o Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona - (SRAA) foi descrito como um sistema hormonal em que os rins influenciam a regulação cardiovascular sistêmica. Corresponde a um complexo sistema hormonal, cujo papel fundamental está relacionado ao controle da pressão arterial sistêmica (PA), a longo e curto prazo, e homeostasia hidroeletrolítica do organismo (Figura 1). Quando ocorre depleção da volemia, redução da pressão arterial sistêmica, redução na pressão de perfusão arterial renal, redução na carga de sódio na mácula densa, aumento da atividade simpática do nervo renal e ação de hormônios como, vasopressina e prostaglandinas, as células justaglomerulares renais liberam renina ativa na circulação. No sangue, essa aspartil protease cliva o angiotensinogênio, uma glicoproteína secretada principalmente pelo fígado, mas também pelo coração, rins, glândula adrenal, intestino delgado, pâncreas, tecido adiposo marrom e branco, formando o decapeptídeo Angiotensina I (AngI) (CAMPBELL; HABENER, 1986; GOMEZ et al., 1990; MENARD, 1993; REUDELHUBER, 1995; DZAU et al., 1987; FLEMING et al., 2005).

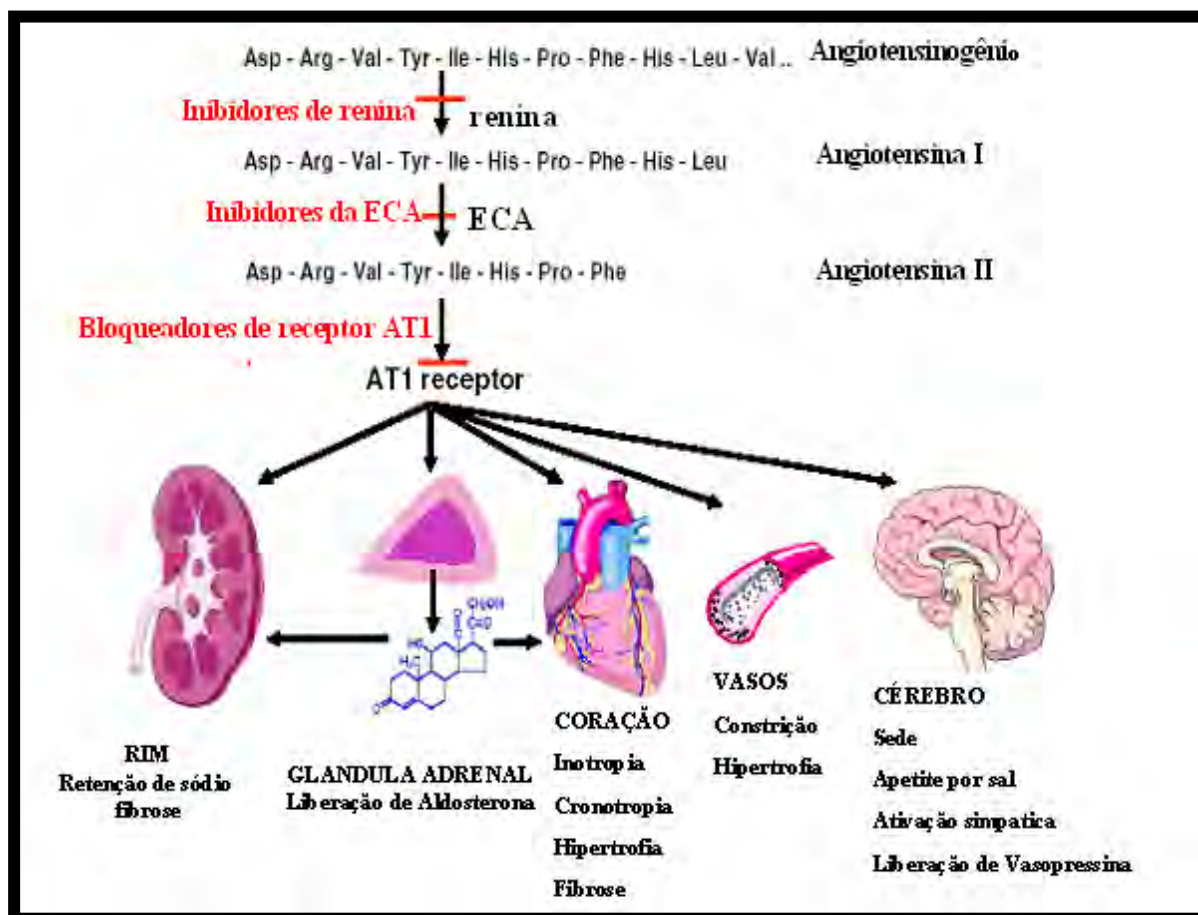


Figura 1. Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona Clássico. Seus componentes, interações, sítios de intervenção de drogas e efeitos principais em diferentes órgãos. Modificado de BADER; GANTEN, 2008. Abreviaturas: ECA- Enzima Conversora de Angiotensina.

A Enzima Conversora de Angiotensina (ECA), uma metaloprotease contendo zinco, produzida pelas células endoteliais pulmonares, age sobre a AngI removendo dois aminoácidos C-terminais, gerando o octapeptídeo, Angiotensina II (AngII). A AngII mantém e modula a pressão arterial (PA), o controle da volemia, a regulação da circulação sistêmica e renal, influenciando tanto a filtração glomerular como a reabsorção tubular de sódio, e regula a secreção de renina. Além disso, desempenha funções intracelulares, incluindo a indução de hiperplasia e/ou hipertrofia celular. É capaz também de regular e estimular diversos fatores que modificam o metabolismo do tecido adiposo marrom e branco, como as prostaglandinas, enzimas lipogênicas (G3PHD e FAS), cAMP, catecolaminas, proteína desacopladora mitocondrial 1 (UCP1), prolactina, dentre outros. (HOMMA et al., 1990; REUDELHUBER, 1995; WOLF, 1995; WANG; GIEBISCH, 1996; CAREY et al., 1997; MATSUSAKA; ICHIKAWA, 1997; TANK et al., 1997).

A ação da AngII está relacionada ao tipo de receptor com que interage. Existem quatro subtipos de receptores descritos, AT1, AT2, AT3 e AT4 (WRIGHT; HARDING, 1994), sendo que essa liga-se preferencialmente aos receptores AT1 e AT2, expressos em diversos tecidos, dentre eles o cardiovascular e adiposo (MALLOW et al., 2000). Ambos pertencem à classe de receptores acoplados à proteína G, com sete domínios transmembrana, localizados no coração, rins, gônadas, placenta, glândula pituitária, glândula adrenal, vasculatura periférica e SNC (GOMEZ et al., 1990; REUDELHUBER, 1995). Os receptores AT1 conferem as ações mais clássicas como vasoconstrição, liberação de aldosterona, retenção salina nos túbulos proximais, e estimulação no sistema nervoso simpático via receptores cerebrais.

Foram descritos diversos SRAA locais em tecidos com capacidade local de formação e atuação da AngII. Acredita-se que todos os componentes desse sistema possam ser encontrados no cérebro, coração, vasos, tecido adiposo, pâncreas, placenta e rins (GRIENDLING et al., 1993; DANSER; SCHALEKAMP, 1996; ENGELI et al., 2000; NIELSEN et al., 2000; BADER et al., 2001; SERNIA, 2001; MORIMOTO; SIGMUND, 2002; CAREY; SIRAGY, 2003; FLEMING et al., 2005).

Em adição aos componentes clássicos do SRAA, novos componentes foram descritos, como a ECA2, uma proteína homóloga à ECA, cuja função é degradar a AngII produzindo Ang-(1-7). Além disso, uma proteína recentemente descoberta, a P(RR), ativa renina e pro-renina em tecidos. Os papéis fisiológicos desses componentes ainda não foram completamente elucidados, mas acredita-se que exerçam impacto considerável na geração local de AngII e mediação de efeitos em tecidos (TIPNIS et al., 2000; DONOGHUE et al., 2000; BADER; GANTEN, 2008). A figura 2 ilustra a via metabólica com os novos componentes descritos.

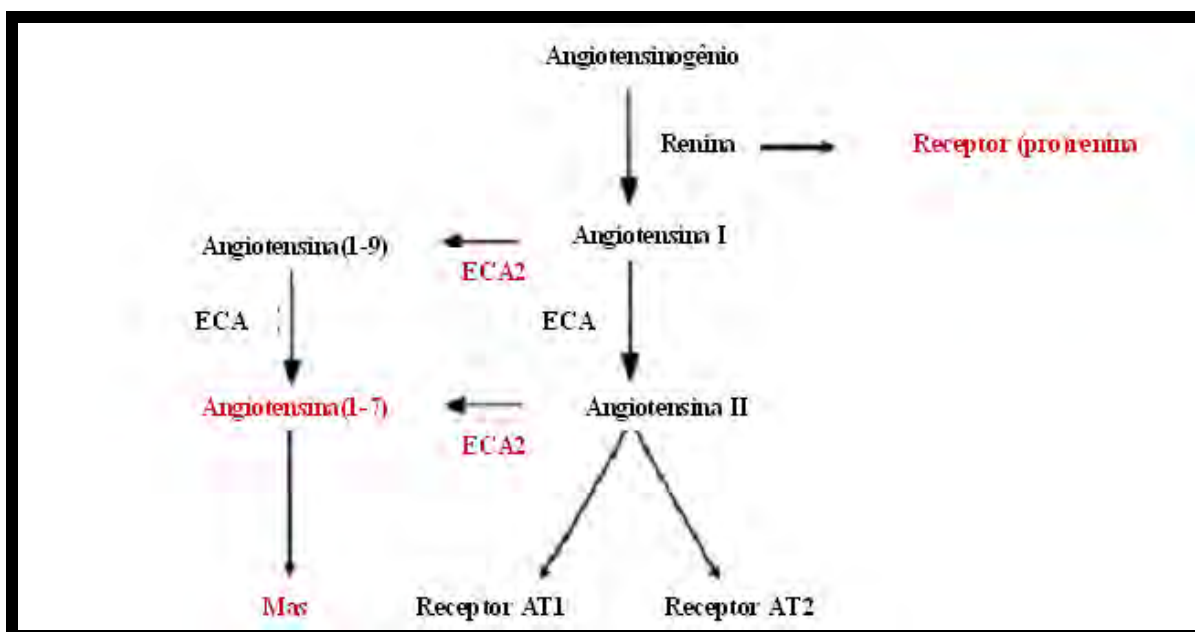


Figura 2. Novo SRAA. Os novos componentes descobertos. Modificado de BADER; GANTEN, 2008. Abreviaturas: ECA – Enzima Conversora de Angiotensina, ECA2 – Enzima Conversora de Angiotensina 2.

1.2.1 Polimorfismo do gene da ECA

Modificações no SRAA trazem conseqüências para as células dos tecidos endotelial e muscular que incluem: inflamações, trombozes e complicações cardiovasculares. No diabetes esses efeitos parecem ser ampliados, com aterosclerose e microangiopatias. O SRAA pode ter papel importante no desenvolvimento da nefropatia diabética e de outras complicações do DM, e os polimorfismos do gene da ECA podem influenciar no aparecimento dessas complicações. Um destes polimorfismos decorre da inserção/deleção (I/D) de um fragmento de 287 pares de

bases no íntron 16 do gene que codifica para a ECA, no locus gênico 17q23.3 (DEINUM; CHATURVERDI, 2002).

Ainda que o polimorfismo se encontre em um íntron, sabe-se que o genótipo *D/D* é acompanhado de concentrações plasmáticas e celulares elevadas da ECA. Observa-se também maior quantidade tecidual e plasmática de AngII do que no genótipo *I/I*, sendo que indivíduos que apresentam o genótipo *I/D* apresentam concentrações intermediárias da enzima. A presença do alelo *D* pode acarretar um possível desenvolvimento de hipertensão e dano glomerular, levando à instalação da nefropatia diabética. A associação entre o desenvolvimento da nefropatia com a predisposição genética para a hipertensão arterial parece ser também um precursor de complicações coronarianas. Pacientes que possuem nefropatia diabética podem apresentar maior prevalência de cardiopatias, seguidos de um aumento da pressão arterial (NAKAI et al., 1994; DANSER et al., 1995).

A influência dos polimorfismos da ECA e a susceptibilidade a doenças demonstraram relação significativa em indivíduos com genótipo *D/D*, para doença coronariana e infarto agudo do miocárdio, em diabéticos com complicações renais. Em indivíduos não diabéticos, a presença do genótipo *D/D* está associada a maior risco de infarto do miocárdio e miocardiopatia dilatada (ESPINOSA et al., 1998; HADJADJ et al., 2001).

1.3 Adenosina Deaminase

A Adenosina Deaminase (ADA) é uma enzima que participa do metabolismo de nucleotídeos, presente em plantas e animais, em diferentes tecidos de invertebrados e também em humanos. Localiza-se no citosol, e age como um receptor de membrana “ecto ADA”. Sua função é catalisar a desaminação hidrolítica irreversível da adenosina e 2'-desoxiadenosina em inosina e 2'-desoxinosina, respectivamente. Em mamíferos, a ADA é filogeneticamente conservada, e apresenta-se amplamente distribuída em diferentes tecidos. No entanto, os maiores níveis desta enzima estão presentes no trato digestório, timo e baço, refletindo seu papel crítico na maturação de células T tímica e extratímica. Sua atividade muda marcadamente durante o desenvolvimento e diferenciação celular em diferentes espécies (GEIGER et al., 1991; WILSON; QUIOCHO, 1993; MOHAMEDALI et al., 1993; SHARMA et al., 1994; SINGH;

SHARMA, 1995).

A ADA é considerada um indicador de imunidade celular, apresentando fundamental importância para diferenciação e proliferação linfocitárias. Sua ausência em humanos resulta em imunodeficiência grave, conhecida como Síndrome da Imunodeficiência Severa Combinada, em que os linfócitos T e B são incapazes de proliferar-se e sobrepor os desafios antigênicos (WIGINTON et al., 1986; GEIGER; NAGY, 1990; PRIEBE; NELSON, 1991; BLACKBURN; KELLEMS, 2005).

O papel biológico da ADA no metabolismo da adenosina parece ser um evento importante para a regulação do fluxo sanguíneo, da neurotransmissão, da atividade da musculatura lisa e da agregação plaquetária. Além disso, há grande variedade de efeitos que a adenosina exerce por meio de sua ligação a receptores específicos de superfície celular, incluindo mecanismos imunorregulatórios (LUCARINI et al., 1989; DONG et al., 1996).

Essa enzima apresenta importante função diagnóstica em diversas doenças, como infecções causadas por microrganismos intracelulares, malignidade ou empiemas, auxiliando no diagnóstico de doenças como febre tifóide, brucelose, toxoplasmose aguda, leishmaniose visceral, rickettsiose, hepatites A e B, catapora, mononucleose, tuberculose, dentre outras (GAKIS et al., 1982, 1989, 1991, 1994; PIRAS; GAKIS, 1973).

O gene *ADA*, localizado no braço longo do cromossomo 20 (20q13.11), possui 12 éxons distribuídos em 32 kilobases. Numerosas mutações e polimorfismos foram descritos nesse gene, sendo em sua maioria, alelos não funcionais, comuns em pacientes portadores de Imunodeficiência Severa Combinada (HIRSCHHORN et al., 1994; PERSICO et al., 2000).

Dois alelos co-dominantes, frequentes em populações caucasóides, o *ADA*1*(G22), alelo selvagem, e o *ADA*2* (A22), diferem entre si pela substituição de uma guanina por uma adenina no éxon 1. Essa transição leva à substituição de um ácido aspártico por uma asparagina no aminoácido de número 8 (*Asp8Asn*). A enzima codificada pelo alelo *ADA*2* apresenta função catalítica 35% menor do que a enzima produzida pelo alelo *ADA*1*, o que leva a aumento da concentração tecidual de adenosina. Esse polimorfismo pode ser identificado pelo método de Reação em Cadeia da Polimerase com polimorfismo de fragmento de restrição (PCR-RFLP), pois, no alelo *ADA*2*, a mutação acarreta a perda de um sítio de restrição para a enzima *TaqI*. Os alelos *ADA*1* e *ADA*2* foram identificados em caucasóides europeus com frequências

alélicas iguais a 96% e 39%, respectivamente (BATTISTUZZI et al., 1981; HIRSCHHORN et al., 1994; BARANKIEWICZ et al., 1997; NICOTRA et al., 1998; PERSICO et al., 2000).

A influência significativa da variante *ADA*2* foi postulada em vários estados patológicos, assim como no DMT2. Outros estudos científicos evidenciam a elevada frequência desse alelo em pacientes com asma brônquica e baixa em pacientes com Doença de Cröhn. Foi sugerido ainda, que mulheres portando o alelo *ADA*2* apresentam menor risco de aborto espontâneo recorrente e uma maior taxa de fertilidade (BOTTINI; GLORIA-BOTTINI, 1999; BOTTINI et al., 2001, 2005; LIU et al., 2006; NICOTRA et al., 2007). Safranow et al., (2007) observaram uma baixa prevalência do alelo *ADA*2* em pacientes portadores de doença arterial coronariana, levando a crer que na população sem essa doença, esse alelo pode estar relacionado à um possível efeito protetor ou que leve a um atraso na progressão da doença.

A adenosina tem uma importante função na modulação da ação da insulina e no metabolismo da glicose em diferentes tecidos. Segundo Kurtul et al., (2004) a insulina age nos tecidos estimulando o transporte de glicose, estoque de glicogênio, glicólise e também como um inibidor da rede de produção hepática de glicose. A adenosina age diretamente estimulando a atividade da insulina, por meio de diversos processos, como transporte de glicose, síntese lipídica, atividade da piruvato desidrogenase, oxidação de leucina e atividade fosfodiesterase de nucleotídeos cíclicos (MORTIMORE et al., 1967; JEFFERSON et al., 1968; TAYLOR; HALPERIN, 1979; RODBELL, 1980; FELIG et al., 1982; PILKIS et al., 1983; BUDOHOSKI et al., 1984; JAMAL; SAGGERSON, 1987; McLANE et al., 1990; RUTKIEWICZ; GORSKI, 1990; HOSHINO et al., 1994).

Há indícios de que a insulina pode afetar o metabolismo da adenosina por meio de mudanças na atividade das principais enzimas envolvendo a produção e degradação de nucleosídeos, ou seja, 5'-nucleotidase e ADA. A atividade da 5'-nucleotidase em membranas das células musculares mostrou-se reduzida por meio da ação da insulina. (RUTKIEWICZ; GORSKI, 1990). Rutkiewicz e Górski (1990) ainda mostraram que a insulina pode modular sua própria ação no metabolismo da glicose em tecidos, por mudar a atividade da ADA e, portanto, a concentração local de adenosina. Seus estudos com ratos tratados com insulina e estreptozotocina indicaram que o efeito inibidor da insulina na atividade da ADA não é uma consequência da hipoglicemia, mas sim resultante de ação direta do hormônio. Por outro lado, ratos com diabetes causado por estreptozotocina mostraram significativa elevação da ação da ADA em todos os tecidos

estudados, como músculo sóleo, plantar, coração, fígado e sangue, sugerindo que a insulina exerça um efeito inibitório tônico na atividade da ADA em tecidos de ratos. Um outro estudo realizado por Singh e Sharma (1998) demonstrou que o diabetes induzido em ratos por aloxan, um derivado do ácido úrico que degenera as células β pancreáticas, estimulou a atividade da ADA de forma tecido/idade específica. No entanto, o mecanismo correto da ação da ADA no diabetes ainda não foi completamente elucidado.

O DMT2 é uma doença multifatorial, e relatos científicos evidenciam que a ECA e a ADA apresentam papéis importantes na sua patogênese. No entanto, não se conhece corretamente todos os mecanismos envolvidos no desenvolvimento desta doença, a exata ação destes genes, se existe uma possível interação entre estes e o DMT2, e a real frequência desses polimorfismos em pacientes diabéticos e em indivíduos sadios no Brasil.

CAPÍTULO II

2 OBJETIVOS

2.1 Gerais

Avaliar os polimorfismos dos genes *ECA* e *ADA* em indivíduos com e sem DMT2.

2.2 Específicos

1. Avaliar a frequência do polimorfismo inserção/deleção (*I/D*) no gene *ECA*;
2. Avaliar a frequência do polimorfismo *TaqI* (*ADA**1/*2) no gene *ADA*;
3. Comparar as frequências destes polimorfismos em pacientes e controles.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Casuística

No presente estudo, foram analisadas 322 amostras de sangue periférico, sendo 162 indivíduos com DMT2 e 160 indivíduos sem essa doença. O grupo de pacientes com DM, denominado grupo teste, foi composto por indivíduos independente do sexo, com etnia mista (PENA et al., 2000) e faixa etária variando entre 37 e 89 anos. Para a composição desse grupo foram selecionados pacientes com quadro clínico de DMT2, independente do uso de insulina, determinado por médicos da Unidade Básica de Saúde de Tupã, local de proveniência dos pacientes e das análises bioquímicas das amostras. Para o diagnóstico, foram realizadas dosagens de glicemia de jejum, Hb A1c e avaliação de histórico clínico. Os testes complementares realizados em 75,93% (123) dos pacientes foram: colesterol total, HDLc, LDLc (Fórmula de Friedwald), triglicerídeos, uréia, creatinina, sódio, potássio, urina tipo 1 e hemograma completo. Na tabela 2, estão descritos os valores de referência utilizados para cada exame realizado.

A A.D.A. (2004) relatou que, pacientes diabéticos com HDLc abaixo de 40mg/dl ou LDLc acima de 100 mg/dl ou triglicerídeos acima de 150 mg/dl apresentam maior

risco de doença cardiovascular. Com base nesse parâmetro, foram reagrupados 81 indivíduos com esse perfil para compor um grupo denominado “Com risco de doença cardiovascular”.

As informações sobre os grupos teste e com risco de doença cardiovascular, assim como os resultados de todos os testes laboratoriais realizados, apresentam-se nas planilhas localizadas nos apêndices 1 e 2. É importante ressaltar que cada paciente apresentava de dois a quatro resultados para os exames de glicemia, HDLc, LDLc, Triglicérides, Uréia e Creatinina. Para a obtenção dos dados de análise estatística desse grupo, foi realizada primeiramente a média das dosagens de cada paciente e depois a média do grupo em questão. Como alguns pacientes apresentavam medidas abaixo dos níveis considerados adequados para o diagnóstico de diabetes, pois, encontravam-se em tratamento, algumas médias apresentaram índices dentro da faixa de normalidade, fato que não significa a ausência de diabetes para tais indivíduos.

O grupo controle foi formado por indivíduos doadores de sangue não-diabéticos, de ambos os sexos, etnia mista (PENA et al., 2000) e faixa etária variando entre 40 e 85 anos. Todos esses indivíduos já haviam participado de outras pesquisas aprovadas pelo Comitê de Ética em Pesquisa e suas amostras estavam depositadas na UNESP. A decisão de utilizá-los deveu-se à padronização prévia de seus dados e condições de saúde. A proposta inicial para este trabalho era de realizar um estudo caso-controle pareado. No entanto, isso não foi possível devido à dificuldade em parear indivíduos saudáveis e pacientes. Portanto, como o DMT2 é uma doença que geralmente acomete indivíduos com idade acima de 40 anos, todos os indivíduos selecionados para o grupo controle apresentavam idade igual ou superior a 40 anos. A tabela 3 mostra as informações demográficas e de testes laboratoriais do grupo de estudo.

Tabela 2 - Valores de referência dos testes bioquímicos utilizados.

Teste	Valor de Referência
Glicemia de jejum	≥ 126 mg/dl
Hb A1c	4,8 a 6,0%
Colesterol total	< 200 mg/dl
HDLc	> 40 mg/dl para homens e > 50 mg/dl para mulheres
LDLc	< 100 mg/dl
Triglicerídeos	< 150 mg/dl
Uréia	10 – 50 mg/dl
Creatinina	<i>Masculino superior a 12 anos: 0,70 – 1,20 mg/dl.</i> <i>Feminino superior a 12 anos: 0,50 – 1,00 mg/dl</i>
Sódio	148 mmol/l
Potássio	3,5-5,2 mmol/l

Fonte: A.D.A. 2004.

Tabela 3 - informações demográficas e de testes laboratoriais dos grupos de estudo.

	Sexo	Idade*	Glicemia		Hb A1c (%)*	Colesterol total (mg/dl)*	HDLc (mg/dl)*	LDLc (mg/dl)*	Triglicérides (mg/dl)*
			Jejum (mg/dl)*						
Diabéticos (n = 162)	M (66)	65,17 ± 10,23	154,20 ± 61,49	7,14 ± 0,38	189,74 ± 35,41	42,84 ± 7,57	110,5 ± 26,79	159,98 ± 85,27	
	F (96)	63,77 ± 11,10	154,07 ± 46,05	7,18 ± 0,52	210,25 ± 33,14	47,74 ± 9,63	128,10 ± 29,64	170,94 ± 73,43	
Com Risco de Doença	M (32)	63,59 ± 9,61	170,09 ± 76,21	7,17 ± 0,4	196,72 ± 31,61	43,23 ± 31,61	117,45 ± 25,20	183,26 ± 88,58	
	F (49)	63,08 ± 11,50	153,63 ± 50,90	7,02 ± 0,40	217,11 ± 31,00	46,80 ± 8,90	132,90 ± 29,14	191,65 ± 75,05	
Controle (n=160)	M (101)	47,16 ± 5,92	80,00 ± 3,00						
	F (59)	48,56 ± 7,76	80,00 ± 3,00						

* Média e Desvio Padrão; HbA1c – Hemoglobina Glicada (HPLC); HDLc – HDL colesterol; LDLc – LDL colesterol

3.2 Considerações Éticas

Esse projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa desta Instituição de Ensino Superior sob o nº 0002.0.229.000-09. Após o esclarecimento e assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, foi determinado um código para a identificação do paciente, colocado em sua ficha e tubo de coleta. Todas as coletas foram realizadas no Laboratório da Unidade Básica de Saúde de Tupã, sob supervisão e responsabilidade do biólogo e colaborador desse projeto Edi Carlos Iacida. Foi obtido Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, após a orientação sobre a pesquisa. Para a coleta, primeiramente a pele dos pacientes foi higienizada diversas vezes com algodão embebido em etanol a 70% a fim de garantir a correta assepsia, evitando assim, possíveis infecções locais. O material para o procedimento foi aberto pelo coletador na presença do paciente, no momento da coleta, após confirmação dos dados de identificação. Após esse procedimento, foi realizada a punção venosa para coleta de sangue em tubos contendo EDTA como anticoagulante. As amostras ficaram armazenadas em temperatura entre 4°C a 8°C até o momento da retirada do plasma, e depois encaminhadas ao Laboratório de Hemoglobinas e Genética das Doenças Hematológicas do IBILCE/UNESP, onde foram armazenadas a -20°C até o momento da extração do material genômico.

3.3 Métodos

3.3.1 Extração de DNA

Todas as amostras de sangue foram submetidas à extração de DNA genômico pelo método de fenol-clorofórmio modificado, previamente à amplificação com os iniciadores específicos para cada polimorfismo (PENA et al., 1991; SAIKI, 1992).

Após a extração do material genômico, todas as amostras foram quantificadas e qualificadas por espectrofotometria (Nanodrop 2000c® – ThermoScientific) para garantir a qualidade da amostra requerida para a amplificação, utilizando como parâmetros concentração em torno de 100ng/ul e pureza entre 1,8 e 1,9. As amostras que não apresentavam este padrão foram descartadas e o DNA reextraído (Apêndice 3).

3.3.2 Estratégias adotadas para atingir o objetivo específico 1

O DNA genômico extraído foi submetido à amplificação com iniciadores específicos para a região de interesse do gene *ECA* (1). O fragmento amplificado foi verificado em gel de agarose a 1,5% e, na presença do genótipo *D/D*, foi realizada uma nova amplificação de DNA genômico com outro par de iniciadores (2), que permitiu a confirmação do genótipo, de acordo com metodologia descrita por FÉRNANDEZ-LLAMA et al., (1999). (Apêndice 4)

Iniciadores (1):

Senso: 5'CTG GAG ACC ACT CCC ATC CTT TCT 3'

Antisenso: 5' GAT GTG GCC ATC ACA TTC GTC CAG AT 3'

Iniciadores (2):

Senso: 5'TGG GAC CAC AGC GCC CGC CAC TAC 3'

Antisenso: 5'TCG CCA GCC CTC CCA TGC CCA TAA 3'

3.2.3 Estratégias adotadas para atingir o objetivo específico 2

O DNA genômico extraído foi submetido à amplificação com iniciadores específicos para a região de interesse do gene *ADA*. O fragmento amplificado foi então digerido com a enzima de restrição *TaqI*, específica para a identificação dos alelos *ADA*1* e *ADA*2*. Posteriormente à digestão enzimática, o produto obtido foi submetido à eletroforese em gel de agarose a 1,5% e coloração com brometo de etídeo, que permitiu a visualização em iluminação UV e determinação dos polimorfismos dos fragmentos de restrição, de acordo com metodologia descrita por Safranow et al., (2007). (Apêndice 5)

Iniciadores:

Senso 5'GCC CGG CCC GTT AAG AAG AGC 3'

Antisenso 5' GGT CAA GTC AGG GGC AGA AGC AGA 3'

3.2.4 Análise Estatística

Para comparar as frequências dos polimorfismos analisados foram utilizados os testes qui-quadrado (χ^2) e exato de Fisher, aceitando-se erro alfa de 5%. Quando as premissas para a realização do teste qui-quadrado foram violadas, foi utilizada a estimativa por máxima verossimilhança. Também foi avaliado o Odds Ratio (OR) para os polimorfismos analisados e Equilíbrio de Hardy-Weinberg. Os cálculos foram realizados utilizando-se o software Statística (versão 7.0).

CAPÍTULO III

Artigo a ser submetido para a Revista Diabetes Research and
Clinical Practice.

Fator de Impacto: 1.888

Qualis: B1

Polimorfismo da Enzima Conversora de Angiotensina (ECA) em indivíduos com Diabetes melito tipo 2 no Brasil.

Angiotensin Converting Enzyme Polymorphism in Type 2 Diabetes mellitus subjects from Brazil.

Autores: Ana Carolina Bonini Domingos^{I, II}; Claudia Regina Bonini-Domingos^I, Rafael Monteiro de Oliveira^I, Edi Carlos Iacida^I, Luiz Carlos de Mattos^{II}.

I. Laboratório de Hemoglobinas e Genética das Doenças Hematológicas – LHGDH – Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas – IBILCE, Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho – UNESP.

II. Laboratório de Imunogenética – Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, SP.

Endereço para correspondência:

Ana Carolina Bonini Domingos

UNESP/IBILCE, Laboratório de Hemoglobinas e Genética das Doenças Hematológicas
Rua Cristóvão Colombo, 2265, Jardim Nazareth.

São José do Rio Preto, SP, CEP 15054-000.

Telefone: (17) 3221-2392; Fax: (17) 3221-2390

E-mail: anacarolinabonini@gmail.com

Suporte Financeiro: Capes.

Resumo

O diabetes melito tipo 2 (DMT2), caracteriza-se por modificações da ação e secreção de insulina, sendo geralmente associado à elevada predisposição genética. Existem relatos de que o polimorfismo *I/D* do gene *ECA* esteja relacionado ao DMT2 e às suas complicações cardiovasculares. No presente estudo foram analisados 162 pacientes com DMT2 e 160 indivíduos sem essa doença. Dentre o grupo de pacientes diabéticos, foi selecionado um grupo de 81 indivíduos com risco de desenvolvimento de doenças cardiovasculares, por meio de avaliação dos exames de HDLc, LDLc e triglicédeos. Para a identificação dos polimorfismos foram realizadas duas reações em cadeia da polimerase, na primeira foram identificados todos os polimorfismos e na segunda, foi confirmada a presença do alelo *I*. As frequências obtidas foram: pacientes diabéticos *I/I* (19,1%); *I/D* (52,5%); *D/D* (28,4%); grupo controle *I/I* (12,5%); *I/D* (55,6%); *D/D* (31,9%) e grupo de diabéticos com riscos de doença cardiovascular *I/I* (16%); *I/D* (59,3%); *D/D* (24,7%). Não foram observadas diferenças estatisticamente significantes entre as frequências alélicas e genotípicas nos grupos estudados. Nas populações caucasóides e do leste asiático foram relatadas associações entre o alelo *D* e o DMT2. No entanto, em populações miscigenadas, como a brasileira, não foi encontrada tal relação. Esse fato não descarta a necessidade de maiores estudos acerca das frequências desse polimorfismo na população brasileira e também da associação com os fatores de risco, que podem comprometer a qualidade de vida dos pacientes com DMT2 na população brasileira.

Palavras-chave: diabetes melito tipo 2; polimorfismo da enzima conversora de angiotensina; risco de doença cardiovascular.

Introdução

O diabetes melito (DM), um distúrbio da homeostase da glicose, afeta aproximadamente 5% da população mundial, sendo caracterizado por deficiência absoluta ou relativa de insulina e/ou resistência a esse hormônio. O diabetes melito tipo 2 (DMT2), considerado a forma mais comum de DM, caracteriza-se por modificações da ação e secreção de insulina, sendo geralmente associado à predisposição genética ^[1]. Apresenta-se relacionado a complicações que incluem risco de desenvolvimento de aterosclerose, doenças cardiovasculares, nefropatia, retinopatia e neuropatia tornando a condição um sério problema de saúde pública ^[1,2]. A Enzima Conversora de Angiotensina (ECA) catalisa a conversão da angiotensina-I (Ang-I) em angiotensina-II (Ang-II), que mantém e modula a pressão arterial (PA), o controle da volemia, a regulação da circulação sistêmica e renal, influenciando tanto a filtração glomerular como a reabsorção tubular de sódio. Desempenha funções intracelulares, incluindo a indução de hiperplasia e/ou hipertrofia celular, com ação pró-inflamatória e pró-oxidante, o que resulta em toxicidade celular e apoptose. Modificações no sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA) trazem conseqüências para as células dos tecidos endotelial e muscular que incluem: processo inflamatório, eventos trombóticos e complicações cardiovasculares. Alguns estudos demonstraram que um processo inflamatório crônico de baixo grau prediz um risco de intolerância à glicose e DMT2. ^[3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10].

Existem relatos de diversos polimorfismos relacionados à ECA, e um destes decorre da inserção/deleção (*I/D*) de um fragmento de 287 pares de bases no íntron 16 do gene que codifica para a ECA, no locus gênico 17q23.3 ^[11]. Ainda que esse polimorfismo se encontre em um íntron, sabe-se que o alelo D codifica uma enzima com maior atividade que o alelo I ^[12, 13]. Alguns estudos associam a presença do alelo D e do genótipo D/D à predisposição ao desenvolvimento de doença coronariana e infarto agudo do miocárdio em indivíduos diabéticos e sem essa doença ^[14, 15]. Tendo em vista a quantidade de variáveis que influenciam, tanto o aparecimento como a evolução e prognóstico do diabete, há a necessidade do entendimento das relações existentes entre os fatores ambientais e genéticos da doença. Assim sendo, o objetivo do presente estudo foi avaliar a frequência do polimorfismo *I/D* da ECA em indivíduos com DMT2 e sem essa doença.

Casuística

Foram analisadas amostras de sangue de 162 indivíduos com DMT2 e 160 indivíduos sem essa doença. O grupo dos pacientes com diabetes, denominado grupo teste, foi composto por indivíduos com idade entre 37 e 89 anos, independente do sexo e com etnia mista ^[16]. Para o diagnóstico foram realizadas dosagens de glicemia de jejum (valor de referência: 70 a 99,00 mg/dl), Hb A1c (valor de referência: 4,8 a 6,0%) e avaliação do histórico clínico. Os testes complementares foram: colesterol total (valor de referência: < 200 mg/dl), HDLc (valor de referência: > 40mg/dl), LDLc (valor de referência: < 130 mg/dl – Fórmula de Friedwald) e triglicerídeos (valor de referência: < 150mg/dl). A A.D.A. (2004) relatou que, pacientes diabéticos com HDLc abaixo de 40mg/dl ou LDLc acima de 100 mg/dl ou triglicerídeos acima de 150 mg/dl ^[17] apresentam maior risco de desenvolvimento de doença cardiovascular. Com base nesse parâmetro, foram reagrupados 81 indivíduos com esse perfil para compor um grupo denominado “Com risco de doença cardiovascular”. O grupo controle foi composto por 160 indivíduos saudáveis, com idade entre 40 e 85 anos, independente do sexo e com etnia mista.

Material e método

Após consentimento informado, foram coletados 5ml de sangue periférico em tubos contendo EDTA como anticoagulante de cada um dos participantes. Esse material foi armazenado à temperatura de 8°C até o momento da extração de DNA, que não excedeu uma semana.

Para a identificação do polimorfismo primeiramente foi realizada a extração do DNA genômico pelo método de fenol-clorofórmio modificado ^[18]. Após a quantificação e qualificação do DNA por meio de espectrofotometria (Nanodrop-2000c® – ThermoScientific), foi realizada Reação em Cadeia da Polimerase ^[19] em volume de 25ul que continha 1,5mM de MgCl₂, tampão 10x sem MgCl₂, 0,12mM de dNTP, 0,8 U de Taq Polimerase (Biotools®), 100ng de DNA genômico e 0,2 uM de cada iniciador: 5’CTG GAG ACC ACT CCC ATC CTT TCT 3’ e (senso) 5’GAT GTG GCC ATC ACA TTG GTC AGA T 3’ (antisenso). Foi realizada uma primeira desnaturação a 95°C durante 5 min, seguida de 35 ciclos que consistiam de desnaturação a 95°C durante 30s, anelamento a 58°C por 30s e extensão a 72°C durante 1 min, finalizando o processo com extensão a 72°C durante 5 min. Os iniciadores flanqueiam a região polimórfica e

permitem identificar o fragmento de 490 pb que corresponde à inserção (I) e outro fragmento de 190pb que corresponde à deleção (D). Devido à possibilidade de erro na classificação de heterozigotos *I/D* como *D/D* em torno de 10%, decorrente da amplificação preferencial do alelo *D* e inadequada do alelo *I*, foi realizada uma segunda amplificação de todas as amostras classificadas como *D/D* para a confirmação do genótipo. Os iniciadores utilizados foram: 5´TGG GAC CAC AGC GCC CGC CAC TAC 3´(senso) e 5´TCG CCA GCC CTC CCA TGC CCA TAA 3´ (antisenso)^[20]. A reação em cadeia da polimerase foi realizada sob as mesmas condições da primeira reação, com exceção da temperatura de anelamento que foi de 64°C. Na presença do alelo *I*, o produto da reação foi de 335pb, e na presença do alelo *D* não houve amplificação. A separação dos fragmentos foi realizada mediante eletroforese em gel de agarose a 1,5%, com brometo de etídeo e visualizada em luz ultravioleta.

Análise estatística

Foi utilizado o teste qui-quadrado, aceitando-se o erro alfa de 5% para as frequências dos polimorfismos, com uso do software Statistica (Versão 7.0). As frequências genótípicas foram avaliadas entre si, ou seja, *D/D* vs *I/D* vs *I/I* e também *D/D* vs *I/D* + *I/I*; *D/D* + *I/D* vs *I/I* e *D/D* vs *I/I* a fim de observar possíveis efeitos codominantes, recessivos, dominantes e aditivos do alelo *D*, respectivamente. Também foi avaliado o Odds Ratio (OR) com intervalo de confiança de 95%, e cálculos para Equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Resultados

A distribuição dos genótipos relacionados ao polimorfismo *I/D* da ECA apresentou-se em Equilíbrio de Hardy-Weinberg. Quanto aos genótipos obtidos nesse estudo, foram observadas frequências maiores de heterozigose (*I/D*), seguida por homozigose do alelo *D* (*D/D*) e por fim, homozigose do alelo *I* (*I/I*) em todos os grupos analisados. As tabelas 1 e 2 mostram as frequências genótípicas dos grupos teste, controle e com risco de doença cardiovascular, e o cálculo de OR para cada grupo em relação ao grupo controle. Foram observadas frequências maiores para o alelo *D* em todos os grupos estudados. Nas tabelas 3 e 4 podem ser verificadas as frequências alélicas do polimorfismo avaliado em cada um dos grupos analisados e o cálculo de OR para cada grupo comparado ao controle. No entanto, não foram observadas diferenças estatisticamente significantes entre as frequências genótípicas e alélicas em nenhum dos

grupos analisados. Quando feita a comparação das frequências genótípicas entre pacientes e controles sob o modelo dominante ($D/D + I/D$ vs I/I), foi observado $p = 0,07$ e para o mesmo grupo sob o modelo aditivo (D/D vs I/I) $p = 0,08$. Ainda foi avaliado o OR com intervalo de confiança que apresentou valores de OR 2,45; IC 1,01 – 5,91; $p = 0,07$.

O risco de desenvolvimento de diabetes ou doenças cardiovasculares foi calculado para os indivíduos do sexo masculino e feminino e também para os grupos teste, controle e diabéticos com risco de doença cardiovascular conforme as tabelas 1, 2, 3 e 4. No entanto, não foram observados valores significantes em nenhum dos grupos e modelos de herança analisados.

Discussão

Nossos resultados corroboram os de Costa, et al., (2002) que estudaram a frequência do polimorfismo I/D do gene da *ECA*, em pacientes brasileiros com DMT2, não encontrando relação entre o mesmo e a doença em estudo ^[21]. Nos estudos de Stephens et al., (2005), encontraram associação entre o DMT2 e o polimorfismo I/D do gene da *ECA* em populações caucasóides. Esses dados são corroborados pela metanálise realizada por Zhou et al., (2009) que relataram associação entre o alelo D e o DMT2 em populações caucasóides e do leste asiático, mas não em populações turcas e miscigenadas, como a brasileira.

Em relação ao grupo de pacientes com risco de doença cardiovascular, também não foram observadas diferenças significantes entre as frequências alélicas e genótípicas do polimorfismo da *ECA* em comparação com os grupos de pacientes diabéticos e controles. Alguns estudos revelaram a associação do alelo D com doença cardiovascular em populações turcas, francesas e chinesas ^[24, 25, 26]. Zintzaras et al., (2008) verificaram associação do alelo D com doença arterial coronariana em indivíduos caucasóides e turcos quando feita análise estatística sob o modelo aditivo (D/D vs I/I). Em indivíduos do Leste asiático, foram observadas associações quando realizada análise sobre o modelo recessivo (DD vs $D/I + I/I$) e, em populações negras, latinas e do leste indiano não foram observadas associações significantes. Stephens et al., (2005) em seu estudo em população caucasóide relataram não haver diferenças entre as frequências genótípicas e alélicas nos grupos de pacientes diabéticos com e sem doença cardiovascular. Nossos dados são coincidentes com os dos autores supracitados, pois, nossa população de estudo é miscigenada, com contribuição de diversos grupos étnicos

formadores, como as populações caucasóide, latina e negra^[16].

As frequências genotípicas e alélicas observadas em nosso estudo apresentaram-se similares ao estudo de Costa et al., (2002), que avaliaram a associação entre o polimorfismo *I/D* do gene *ECA* e Síndrome Metabólica em pacientes com DMT2 da região sul do Brasil e ao estudo de Sakuma et al., (2004), que avaliaram esse mesmo polimorfismo em afrodescendentes com doença arterial coronariana residentes no estado do Mato Grosso do Sul, Brasil. Em ambos os estudos foram observadas maiores frequências do genótipo *I/D*, seguidas por *D/D* e *I/I*. Observamos também frequências genotípicas e alélicas similares às das populações espanhola, europeia em geral, libanesa e afro-americana, que encontram-se entre as principais etnias formadoras da população de nossa região de estudo^[16]. As frequências obtidas em nosso trabalho diferiram de outros realizados em populações brasileiras, como o estudo de Freitas et al., (2007) que relataram 78,21% (*I/I*), 16,0% (*I/D*) e 5,13% (*D/D*) em indivíduos residentes na região noroeste do Amazonas, e no estudo de Corrêa et al., (2009) que avaliaram esse polimorfismo em mulheres com e sem câncer de mama no estado de São Paulo, obtendo frequências de 46% (*D/D*), 37% (*I/D*) e 17% (*I/I*). Acreditamos que as diferenças entre nossos dados e os obtidos no estudo de Freitas et al., (2007) devem-se às diferenças genéticas intrínsecas dos grupos formadores das populações do Sul e Sudeste com as do Norte do Brasil^[16]. A conformidade na análise do Equilíbrio de Hardy-Weinberg evidencia que os dados obtidos são concisos e demonstram a realidade da população estudada.

Foram relatadas variações das frequências alélicas e genotípicas em relação aos diversos grupos étnicos e, acreditamos que esse fato, relacionado à elevada miscigenação da população brasileira e à presença de haplótipos no polimorfismo *I/D* da *ECA*^[31], são fatores que contribuem para as diferenças observadas entre nosso estudo e os estudos realizados em outras populações

Mettimano et al., (2001) revelaram que idade avançada, sedentarismo, sobrepeso, etilismo e tabagismo são fatores de risco para o desenvolvimento de diabetes e complicações relacionadas, especialmente quando associados ao genótipo *D/D* da *ECA*. Portanto, para uma correta classificação do risco de desenvolvimento e complicações relacionadas ao DMT2, acreditamos ser necessária a análise de polimorfismos genéticos, dos haplótipos, de outros genes que podem relacionar-se ao gene da *ECA*, interações pós-transcricionais e pós-traducionais e ainda fatores externos como sedentarismo, idade e alimentação.

Apesar de nossos resultados não demonstrarem relação entre o polimorfismo *I/D* da ECA, o DMT2 e o risco de complicações cardiovasculares, é importante salientar que a presença do alelo *D*, verificada em 131 pacientes de nosso grupo teste, deve ser considerada, a fim de evitar possíveis complicações ao paciente diabético. Para uma correta classificação dos fatores genéticos que interferem no aparecimento e complicações dessa doença na população brasileira, acreditamos serem necessários maiores estudos acerca desse polimorfismo e seus haplótipos, assim como a relação entre esses e os fatores de risco ambientais que influenciam a qualidade de vida do paciente diabético. Além do mais, os conhecimentos gerados pelas pesquisas conduzem a novas formas de tratamento e prevenção, sendo esse último, o principal objetivo da OMS ^[33] e da Associação Americana de Diabetes para o controle dessa doença que é considerada uma epidemia mundial nessa década ^[34].

Tabela 1 - Frequências genotípicas dos polimorfismos para o gene *ECA*, e comparação de OR entre os grupos teste e controle.

	Pacientes						Controles						OR	IC 95%	p	
	Masculino			Feminino			Masculino			Feminino						Total
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%				
<i>I/I</i>	14	21,2	17	17,7	31	19,1	10	9,9	10	16,9	20	12,5	1,65	0,89 – 3,05	0,13	
<i>I/D</i>	32	48,5	53	55,2	85	52,5	53	52,5	36	61	89	55,6	0,88	0,57 – 1,37	0,58	
<i>D/D</i>	20	30,3	26	27,0	46	28,4	38	37,6	13	22	51	31,9	1,18	0,73 – 1,90	0,54	
Total	66	100	96	100	162	100	101	100	59	100	160	100				

OR: Odds Ratio com intervalo de confiança de 95%.

p = valor de significância (< 0,05) – Teste Exato de Fisher

Tabela 2 - Frequências genotípicas dos polimorfismos para o gene *ECA*, e comparação de OR entre os grupos de diabéticos com risco de doença cardiovascular e grupo controle.

	Risco de Doença Cardiovascular						Controles						OR	IC 95%	p	
	Masculino			Feminino			Masculino			Feminino						Total
	n	%	%	n	%	%	n	%	%	n	%	%				
<i>I/I</i>	6	46,1	7	53,8	13	16,0	10	9,9	10	16,9	20	12,5	1,34	0,63 – 2,85	0,44	
<i>I/D</i>	18	37,5	30	62,5	48	59,3	53	52,5	36	61	89	55,6	1,16	0,67-1,99	0,68	
<i>D/D</i>	8	40	12	60	20	24,7	38	37,6	13	22	51	31,9	0,70	0,38-1,28	0,29	
Total	32	100	49	100	81	100	101	100	59	100	160	100				

OR: Odds Ratio com intervalo de confiança de 95%.

p = valor de significância ($< 0,05$) – Teste Exato de Fisher

Tabela 3 - Frequências dos alelos *I* e *D* do gene *ECA* e comparação de OR entre os grupos teste e grupo controle.

	Pacientes						Controles						OR	IC 95%	P						
	Masculino			Feminino			Total			Masculino						Feminino			Total		
	n	%		n	%		n	%		n	%					n	%		n	%	
Alelo I	60	45,5		87	45		147	45,4		73	36,3		56	47,5		129	40,3		1,23	0,89-1,68	0,20
Alelo D	72	54,5		105	55		177	54,6		129	64,2		62	52,5		191	59,7				
Total	132	100		192	100		324	100		202	100		118	100		320	100				

OR: Odds Ratio com intervalo de confiança de 95%.

p = valor de significância (< 0,05) – Teste Exato de Fisher

Tabela 4 - Frequências dos alelos *I* e *D* do gene *ECA* e comparação de OR entre os grupos de diabéticos com risco de doença cardiovascular e grupo controle.

	Risco de Doença Cardiovascular												OR	IC 95%	P	
	Masculino						Feminino									Total
	N	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%				
Alelo I	30	40,5	44	47,8	74	47,4	73	36,3	56	47,5	129	40,3				
Alelo D	34	59,5	48	52,2	82	52,6	129	64,2	62	52,5	191	59,7	1,34	0,91–1,96	0,17	
Total	64	100	92	100	156	100	202	100	118	100	320	100				

OR: Odds Ratio com intervalo de confiança de 95%.

p = valor de significância (< 0,05) – Teste Exato de Fisher.

Referências

1. AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Position Statement: Diagnosis and Classification of Diabetes mellitus. *Diabetes Care*. 2009; 32(1):S62 – S67.
2. DIABETES RESEARCH WORKING GROUP. Conquering diabetes: A strategic plan for the 21st century. Bethesda, M.D: National Institutes of Health, 1999. NIH publication n. 99-4398.
3. WOLF G. Angiotensin as a renal growth promoting factor. In Mukhopadhyay, A.K.; Raizada, M.K. eds. *Tissue Renin-Angiotensin Systems*. 1° ed. New York: Plenum Press, 1995.
4. REUDELHUBER TL, Molecular Biology of Renin. In Schlöndorff, D.; Bonventre, J.V. eds. *Molecular Nephrology*. 1° ed. New York: Dekker, 1995.
5. WANG T, GIEBISCH G. Effects of angiotensin II on electrolyte transport in the early and late distal tubule in rat kidney. *Am J Physiol*. 1996;271(1 Pt 2):F143-9.
6. CAREY RM, MCGRATH HE, PENTZ ES, GOMEZ RA, BARRETT PQ. Biomechanical coupling in renin-releasing cells. *J Clin Invest*. 1997;100(6):1566-74.
7. MATSUSAKA T, ICHIKAWA I. Biological functions of angiotensin and its receptors. *Annu Rev Physiol*. 1997;59:395-412.
8. TANK JE, HENRICH WL, MOE OW. Regulation of glomerular and proximal tubule renin mRNA by chronic changes in dietary NaCl. *Am J Physiol*. 1997 Dec;273(6 Pt 2):F892-8.
9. PHILLIPS MI, KAGIYAMA S. Angiotensin II as a pro-inflammatory mediator.

Curr Opin Investig Drugs. 2002;3(4):569-77

10. SESHIAH PN, WEBER DS, ROCIC P, VALPPU L, TANIYAMA Y, GRIENGLING KK. Angiotensin II stimulation of NAD(P)H oxidase activity: upstream mediators. *Circ Res*. 2002;91(5):406-13.
11. DEINUM, J.; CHATURVEDI, N. The Renin-Angiotensin system and vascular disease in diabetes. *Semin Vasc Med*. 2002;2(2):149-56.
12. NAKAI K, ITOH C, MIURA Y, HOTTA K, MUSHA T, ITOH T, MIYAKAWA T, IWASAKI R, HIRAMORI K. Deletion polymorphism of the angiotensin I-converting enzyme gene is associated with serum ACE concentration and increased risk for CAD in the Japanese. *Circulation*. 1994;90(5):2199-202.
13. DANSER AH, SCHALEKAMP MA, BAX WA, VAN DEN BRINK AM, SAXENA PR, RIEGGER GA, SCHUNKERT H. Angiotensin-converting enzyme in the human heart. Effect of the deletion/insertion polymorphism. *Circulation*. 1995;92(6):1387-8.
14. ESPINOSA, J.S RUEDA E, MUÑOZ E, MONTIEL A, MARTÍNEZ S, DIÉGUEZ JL, RIUS F, REYES A, DE TERESA E. Association between myocardial infarction and angiotensin converting enzyme gene polymorphism in young patients. *Med Clin (Barc)*. 1998;110(13):488-91.
15. HADJADJ S, BELLOUM R, BOUHANICK B, GALLOIS Y, GUILLOTEAU G, CHATELLIER G, ALHENC-GELAS F, MARRE M. Prognostic value of angiotensin-I converting enzyme I/D polymorphism for nephropathy in type 1 diabetes mellitus: a prospective study. *J Am Soc Nephrol*. 2001 Mar;12(3):541-9.
16. PENA, S.D., CARVALHO-SILVA DR, ALVES-SILVA J, PRADO FV,

- SANTOS FR. Retrato molecular do Brasil. *Ciência Hoje*. 2000 Abr; 27(159):16-25.
17. AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Dyslipidemia Management in Adults with Diabetes. *Diabetes Care*. 2004 Jan; 27(1).
18. PENA SDJ, MACEDO AM, GONTIJO NF, MEDEIROS AM, RIBEIRO JC. DNA bioprints simple non – isotopic DNA fingerprints with biotinylated probes. *Electrophoresis*. 1991 Feb-Mar;12(2-3):146-52.
19. SAIKI, R. K. The design and optimization of the PCR. I: Erlich, H. A. (Ed.) PCR technology – Principles and applications for DNA amplification. Oxford University Press, New York, 1992.
20. FERNÁNDEZ-LLAMA P, POCH E, ORIOLA J, BOTEY A, DE LA SIERRA A, REVERT L, RIVERA F, DARNELL A. Polimorfismos genéticos Del sistema renina-angiotensina e hipertension arterial esencial. *Med Clin (Barc)*. 1999;112(15):561-4.
21. COSTA L A, CANANI LH, MAIA AL, GROSS JL. The ACE Insertion/Deletion Polymorphism is not associated with the metabolic syndrome (WHO definition) in Brazilian type 2 diabetic patients. *Diabetes Care*. 2002;25(12):2365-6
22. STEPHENS JW, DHAMRAIT SS, COOPER JA, ACHARYA J, MILLER GJ, HUREL SJ, HUMPHRIES SE. The D allele of the ACE/ID common gene variant is associated with type 2 diabetes mellitus in Caucasian subjects. *Mol Genet Metab*. 2005;84(1):83-9.
23. ZHOU JB, YANG JK, LU JK, AN YH. Angiotensin-Converting Enzyme gene polymorphism is associated with Type 2 Diabetes: a meta-analysis. *Mol Biol Rep*. 2010;37(1):67-73.
24. ARAZ M, YILMAZ N, GÜNGÖR K, OKAN V, KEPEKCI Y, SÜKRÜ

- AYNACIOGLU A. Angiotensin-converting enzyme gene polymorphism and microvascular complications in Turkish type 2 diabetic patients. *Diabetes Res Clin Pract.* 2001;54(2):95-104.
25. HADJADJ S, GALLOIS Y, ALHENC-GELAS F, CHATELLIER G, MARRE M, GENES N, LIEVRE M, MANN J, MENARD J, VASMANT D; DIABHYCAR STUDY GROUP. Angiotensin-I-converting enzyme insertion/deletion polymorphism and high urinary albumin concentration in French Type 2 diabetes patients. *Diabet Med.* 2003;20(8):677-82.
26. THOMAS GN, CRITCHLEY JA, TOMLINSON B, COCKRAM CS, CHAN JC. Peripheral vascular disease in Type 2 diabetic Chinese patients: associations with metabolic indices, concomitant vascular disease and genetic factors. *Diabet Med.* 2003;20(12):988-95.
27. ZINTZARAS E, RAMAN G, KITSIOS G, LAU J. Angiotensin-Converting Enzyme Insertion/Deletion Gene Polymorphic Variant as a Marker of coronary artery disease. *Arch Intern Med.* 2008;168(10):1077-1089.
28. SAKUMA T, HIRATA RD, HIRATA MH. Five polymorphisms in gene candidates for cardiovascular disease in Afro-Brazilian individuals. *J Clin Lab Anal.* 2004;18(6):309-16.
29. FREITAS SR, CABELLO PH, MOURA-NETO RS, DOLINSKY LC, BÓIA MN. Combined analysis of genetic and environmental factors on essential hypertension in a brazilian rural population in the Amazon region. *Arq Bras Cardiol.* 2007;88(4):447-51.
30. ALVES CORRÊA SA, RIBEIRO DE NORONHA SM, NOGUEIRA-DE-SOUZA NC, VALLETA DE CARVALHO C, MASSAD COSTA AM, JUVENAL LINHARES J, VIEIRA GOMES MT, GUERREIRO DA SILVA ID. Association between the angiotensin-converting enzyme (insertion/deletion) and

- angiotensin II type 1 receptor (A1166C) polymorphisms and breast cancer among Brazilian women. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst.* 2009;10(1):51-8.
31. KEAVNEY B, MCKENZIE CA, CONNELL JM, JULIER C, RATCLIFFE PJ, SOBEL E, LATHROP M, FARRALL M. Measured haplotype analysis of the angiotensin-I converting enzyme gene. *Hum Mol Genet.* 1998;7(11):1745-51.
32. METTIMANO M, LANNI A, MIGNECO A, SPECCHIA ML, ROMANO-SPICA V, SAVI L. Angiotensin-related genes involved in essential hypertension: allelic distribution in an Italian population sample. *Ital Heart J.* 2001;2(8):589-93.
33. WHO Study Group. Prevention of diabetes mellitus report of WHO Study Group. *WHO Tech Rep. Ser.*, 1994; 844: 1-100.
34. AMERICAN DIABETES ASSOCIATION AND NATIONAL INSTITUTE OF DIABETES, Digestive and Kidney Diseases. The prevention or delay of type 2 diabetes. *Diabetes Care*, 2002; 25:403 – 414.

CAPÍTULO IV

Artigo a ser submetido para a Revista Archives of Medical Science.

Fator de Impacto:0,77

Diabetes melito tipo 2 e frequência do polimorfismo ADA*2 do gene da adenosina deaminase em população miscigenada

Autores: Ana Carolina Bonini Domingos^{1,2}; Rafael Monteiro de Oliveira¹, Edi Carlos Iacida¹, Claudia Regina Bonini-Domingos¹, Luiz Carlos de Mattos².

1. UNESP - Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas – IBILCE–Laboratório de Hemoglobinas e Genética das Doenças Hematológicas – LHGDH .
2. FAMERP– Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, Laboratório de Imunogenética.

Endereço para correspondência:

Ana Carolina Bonini Domingos

UNESP/IBILCE, Laboratório de Hemoglobinas e Genética das Doenças Hematológicas

Rua Cristóvão Colombo, 2265, Jardim Nazareth.

São José do Rio Preto, SP, CEP 15054-000.

Telefone: (17) 3221-2392; Fax: (17) 3221-2390

E-mail: anacarolinabonini@gmail.com

Suporte Financeiro: Capes.

Resumo

O diabetes melito tipo 2 (DMT2), caracteriza-se por modificações da ação e secreção de insulina, sendo geralmente associado à elevada predisposição genética. Aproximadamente 90% dos casos de diabetes melito (DM) estão associados a esta forma da doença. Existem relatos de atividade aumentada da enzima adenosina deaminase em indivíduos com DM e doença coronariana. No presente estudo foram analisadas amostras de 162 pacientes com DMT2 e 160 indivíduos sem essa doença. Dentre o grupo de pacientes diabéticos, foi selecionado um grupo de 81 indivíduos com risco de desenvolvimento de doenças cardiovasculares, por meio de avaliação dos exames de HDLc, LDLc e triglicérides. Para a verificação do polimorfismo *TaqI* do gene *ADA*, foi realizada uma PCR-RFLP, que possibilitou a identificação dos alelos *ADA*1* e *ADA*2*. As frequências genótípicas obtidas foram: em pacientes diabéticos *ADA*1/*1* (89,31%); *ADA*1/*2* (10,06%); *ADA*2/*2* (0,63%); grupo controle *ADA*1/*1* (91,25%); *ADA*1/*2* (7,50%); *ADA*2/*2* (1,25%); pacientes com risco cardiovascular *ADA*1/*1* (91,20%); *ADA*1/*2* (7,50%); *ADA*2/*2* (0,0%). Não foram observadas diferenças estatisticamente significantes entre as frequências alélicas e genótípicas nos grupos estudados. No entanto, esse fato não descarta a necessidade de maiores estudos acerca das frequências desse polimorfismo na população brasileira e também da associação desse com a atividade enzimática da ADA, além dos fatores de risco, que podem comprometer a qualidade de vida dos pacientes com DMT2 na população brasileira.

Palavras-chave: diabetes melito tipo 2; polimorfismo da enzima adenosina deaminase; risco de doença cardiovascular.

Introdução

O diabetes melito (DM), é uma síndrome de etiologia múltipla que ocorre em aproximadamente 5% da população mundial, sendo considerado um dos maiores problemas de saúde pública. É decorrente da deficiência absoluta ou relativa de insulina e/ou resistência a esse hormônio e caracteriza-se por alterações no metabolismo de carboidratos, lipídios e proteínas. O diabetes melito tipo 2 (DMT2), considerado a forma mais comum de DM, acomete aproximadamente 90% dos pacientes com DM. Caracteriza-se por: resistência à ação da insulina e deficiências na secreção desse hormônio, sendo geralmente associado à elevada predisposição genética¹. Apresenta-se relacionado a complicações que incluem risco de desenvolvimento de aterosclerose, doenças cardiovasculares, nefropatia, retinopatia e neuropatia, tornando a condição um sério problema de saúde pública^{1,2}.

A Adenosina deaminase (ADA) é uma enzima que participa do metabolismo de nucleotídeos, mais especificamente da via de salvação das purinas. Apresenta-se amplamente distribuída em diferentes tecidos, com maiores níveis presentes no trato digestório, timo e baço, o que reflete seu papel crítico na maturação de células T tímica e extratímica^{3,4,5,6,7}. Sua principal função é catalisar a desaminação hidrolítica de adenosina e 2'-desoxiadenosina em inosina e 2-desoxinosina. É uma enzima essencial para a diferenciação e proliferação linfocitárias e do sistema monocítico-macrofágico. Tem sido utilizada para monitoramento de diversas doenças em que a imunidade está alterada^{8,9}. O interesse nessa enzima foi estimulado pelos achados de pacientes com deficiências hereditárias de ADA que desenvolviam imunodeficiências combinadas.

O papel biológico da ADA no metabolismo da adenosina parece ser um evento importante para a regulação do fluxo sanguíneo, neurotransmissão, atividade da

musculatura lisa e agregação plaquetária. Além disso, há grande variedade de efeitos que a adenosina exerce por meio de sua ligação a receptores específicos de superfície celular, incluindo mecanismos imunorregulatórios^{10,11}.

O gene *ADA*, localizado no braço longo do cromossomo 20 (20q13.11), possui 12 éxons distribuídos em 32 kilobases^{12,13}. Dois alelos co-dominantes, freqüentes em populações caucasóides, o *ADA*01* e o *ADA*02*, diferem entre si pela substituição de uma guanina por uma adenina no éxon 1. Essa transição leva à substituição do ácido aspártico por uma asparagina no aminoácido de número 8 (*Asp8Asn*). A enzima codificada pelo alelo *ADA*2* apresenta função catalítica 35% menor do que a enzima produzida pelo alelo *ADA*1*, o que leva a aumento da concentração tecidual de adenosina^{12,13,14,15,16}.

O DMT2 é uma doença multifatorial e relatos científicos evidenciam que a *ADA* apresenta um papel importante na sua patogênese^[17,18]. No entanto, os mecanismos envolvidos no desenvolvimento desta doença, a exata ação desse gene, e a frequência de seus polimorfismos em pacientes diabéticos e em indivíduos sadios no Brasil, não são conhecidos. Com base no exposto acima, o objetivo do presente estudo foi avaliar a frequência do polimorfismo *TaqI* (*ADA*1/*2*) da enzima adenosina deaminase em pacientes diabéticos brasileiros, comparando os resultados com um grupo controle combinado.

Casuística

Foram analisadas amostras de sangue de 159 indivíduos com DMT2 e 160 indivíduos sem essa doença. O grupo dos pacientes com diabetes, denominado grupo teste, foi composto por indivíduos com idade entre 37 e 89 anos, independente do sexo e com etnia mista^[19]. Para o diagnóstico foram realizadas dosagens de glicemia de jejum

(valor de referência: 70 a 99,00 mg/dl), de Hb A1c (valor de referência: 4,8 a 6,0%) e avaliação do histórico clínico. Os testes complementares foram: colesterol total (valor de referência: < 200 mg/dl), HDLc (valor de referência: > 40mg/dl), LDLc (valor de referência: < 130 mg/dl – Fórmula de Friedwald) e triglicerídeos (valor de referência: < 150mg/dl). A Associação Americana de Diabetes (2004) relatou que, pacientes diabéticos com HDLc abaixo de 40mg/dl ou LDLc acima de 100 mg/dl ou triglicerídeos acima de 150 mg/dl ^[20] apresentam maior risco de doença cardiovascular. Com base nesse parâmetro, foram reagrupados 78 indivíduos com esse perfil para compor um grupo denominado “Com risco de doença cardiovascular”. O grupo controle foi composto por 160 indivíduos saudáveis com idade entre 40 e 85 anos independente do sexo e com etnia mista.

Após consentimento informado, foram coletadas amostras de sangue periférico em tubos contendo EDTA como anticoagulante. Esse material foi armazenado à temperatura de 8°C até o momento da extração de DNA, que não excedeu uma semana.

Material e Método

O DNA genômico foi obtido pelo método de fenol-clorofórmio modificado ^[21]. Para a identificação do polimorfismo foi realizada Reação em Cadeia da Polimerase ^[22] em volume de 25uL que continha tampão 10X sem MgCl₂; 1,5mM de MgCl₂; 1,07mM DMSO; 8mM de β-mercaptoetanol; 0,2uM de dNTP; 1 U de *Taq* DNA Polimerase (Invitrogen®), 20ng/ul de DNA genômico e 0,05uM de cada iniciador: 5´ - GCCCGGCCCGTTAAGAAGA- GC-3´ (senso) e 5´ - GGTC AAGTCAGGGGCAGAAGCAGA-3´ (antisenso) (GenBank No. M13792), segundo Safranow et al., (2007). O mix sem a enzima *Taq* Polimerase foi colocado em

termociclador (Bio-Rad®) para uma primeira desnaturação (HotStart) a 94°C por 15 minutos. Após esse procedimento, foi adicionada a Polimerase e então realizados 36 ciclos que consistiam de desnaturação a 94°C durante 40s, anelamento a 68°C por 80s e extensão a 72°C durante 80 segundos, finalizando o processo com extensão a 72°C durante 8 min. Os iniciadores flanqueiam a região polimórfica e permitem identificar o fragmento de 397 pb que corresponde à região amplificada. Para a identificação do polimorfismo foi realizada digestão com enzima de restrição *TaqI* (Biolabs®). Foi incubada uma alíquota de 8,5 uL de produto de PCR com 5 U de *TaqI* a 65°C por 3 horas. Os fragmentos foram separados por eletroforese em gel de agarose a 1,5% corado com brometo de etídeo e visualizado sob luz UV. O produto da digestão do alelo *ADA*1*(G22) foi clivado em fragmentos de 245pb e 152pb, e do alelo *ADA*2* (A22) foi identificado pela falta do sítio de restrição para a enzima, com um fragmento de 397pb.

Análise estatística

Foram utilizados os testes qui-quadrado e exato de Fisher, aceitando-se o erro alfa de 5% para as frequências dos polimorfismos com o software Statistica (Versão 7.0). Também foi avaliado o Odds Ratio (OR) com intervalo de confiança de 95% e Equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Resultados

Quanto aos genótipos, foram observadas frequências maiores de homozigose para o alelo *ADA*1*, seguida por heterozigose (*ADA*1/*2*) e por fim, homozigose do alelo *ADA*2* em todos os grupos analisados. As tabelas I e II revelam as frequências genotípicas dos grupos teste, controle e com risco de doença cardiovascular e os

cálculos de OR de cada grupo em relação ao grupo controle.

Foram observadas frequências maiores do alelo *ADA*1* em todos os grupos estudados. Nas tabelas III e IV podem ser verificadas as frequências alélicas de cada um dos grupos analisados e os cálculos de OR para cada grupo, comparado ao controle. Não foram observadas diferenças estatisticamente significantes entre as frequências genóticas e alélicas em nenhum dos grupos avaliados, mesmo quando separados por sexo e faixa etária. A frequência dos alelos *ADA*1/*2* estava em equilíbrio de Hardy-Weinberg em todos os grupos avaliados.

A análise de OR, utilizada para verificar o risco de desenvolvimento de DM ou doenças cardiovasculares na presença dos polimorfismos avaliados, foi calculado para os indivíduos do sexo masculino e feminino e também para os grupos teste, controle e diabéticos com risco de doença cardiovascular. No entanto, não foram observados valores significantes em nenhum dos grupos analisados.

Discussão

O alelo *ADA*1* codifica para uma enzima com maior atividade catalítica do que a codificada pelo alelo *ADA*2*, assim, os portadores dos genótipos *ADA*1/*2* e *ADA*2/*2* apresentam menor atividade catalítica dessa enzima do que os portadores do genótipo *ADA*1/*1*, levando a uma maior concentração de adenosina, maior atividade dos receptores e tolerância diminuída à glicose^[24]. As frequências genóticas e alélicas encontradas em nosso estudo estão de acordo com os estudos de atividades enzimáticas, que verificaram a presença de maior atividade da ADA em pacientes com DM^[17,18,25,26]

Os dados de frequências alélicas e genóticas desse polimorfismo na população brasileira evidenciam uma maior frequência do genótipo *ADA*1/*1* e do alelo *ADA*1*.

Safranow et al., (2007) avaliando a frequência do polimorfismo na população polonesa e Liu et al., (2006) na população chinesa também encontraram frequências similares às que observamos em nosso grupo da população brasileira, com maior proporção de *ADA*1/*1*, seguido por *ADA*1/*2* e *ADA*2/*2*.

Em relação ao grupo com risco de doença cardiovascular, foram encontradas baixas frequências do alelo *ADA*2*. De acordo com os estudos de Safranow et al., (2007) e Banci et al., (2009), existe uma frequência menor do alelo *ADA*2* em indivíduos com doença arterial coronariana (DAC) em relação aos indivíduos sem essa doença. Os autores acreditam que o efeito cardioprotetor da adenosina possa influenciar no desenvolvimento da DAC ^[15]. Em nosso estudo, foi encontrada baixa frequência do alelo *ADA*2* no grupo com risco de doença cardiovascular, no entanto, não houveram diferenças estatisticamente significantes em relação aos outros grupos de estudo. Mesmo não havendo diferenças entre as frequências alélicas nos grupos analisados, acreditamos ser necessário um maior acompanhamento dos pacientes diabéticos com risco de doença cardiovascular e genótipo *ADA*1/*1*, pois a maior atividade da ADA nesses pacientes, diminui a concentração de adenosina ^[23, 28].

Ainda não se sabe corretamente quais os mecanismos pelo qual a ADA age no metabolismo da glicose, mas há relatos de que a adenosina tem uma importante função na modulação da ação da insulina e no metabolismo da glicose em diferentes tecidos ^[17, 25, 26, 36]. Segundo Kurtul et al., (2004) a insulina age nos tecidos estimulando o transporte de glicose, estoque de glicogênio, glicólise e também como inibidor da rede de produção hepática de glicose. A adenosina age diretamente estimulando a atividade da insulina, via diversos processos, como transporte de glicose, síntese lipídica, atividade da piruvato desidrogenase, oxidação de leucina e atividade fosfodiesterase de

nucleotídeos cíclicos [17, 25, 26, 29, 30,31, 32, 33, 34, 35, 36].

Rutkiewicz e Górski (1990) demonstraram que a insulina pode modular sua própria ação no metabolismo da glicose em tecidos, por mudar a atividade da ADA e, portanto, a concentração local de adenosina. Seus estudos com ratos tratados com insulina e estreptozotocina indicaram que o efeito inibidor da insulina na atividade da ADA não é uma consequência da hipoglicemia, mas sim resultante de uma ação direta do hormônio. Han et al., (1998), observaram que após a remoção da adenosina com ADA ou bloqueio de sua ação com antagonistas, houve diminuição no transporte de glicose para os músculos esqueléticos. Os autores acreditam que esse fenômeno foi causado pela redução no número de canais GLUT4 na superfície celular ou diminuição na atividade de transporte de glicose intrínseco do GLUT4. Esses canais são proteínas presentes principalmente na membrana de tecidos muscular e adiposo, responsável pelo transporte de glicose para o interior da célula. Apesar da possível correlação observada em outros relatos, entre a maior frequência do alelo *ADA*1* e o DM e doenças cardiovasculares, não verificamos em nosso estudo diferenças estatisticamente significantes que co-relacionassem esse polimorfismo ao DM com o grupo em estudo.

A população brasileira é miscigenada [19] e essa característica influencia a relação de certos genes com a susceptibilidade e desenvolvimento de complicações do DM, uma doença multifatorial. Acreditamos serem necessários maiores estudos acerca dos polimorfismos genéticos e atividades enzimáticas da ADA na população brasileira, com e sem DM, assim como a investigação de outros fatores, que influenciem a fisiopatologia do DM2, como mecanismos pós-traducionais e transcricionais e interações gênicas [38].

Tabela I - Frequências genotípicas para os polimorfismos do gene ADA, e comparação de OR entre os grupos teste e controle.

ADA	Pacientes						Controles						OR	IC 95%	p	
	Masculino			Feminino			Masculino			Feminino						Total
	n	%		n	%		n	%		n	%					
<i>*1/*1</i>	58	89,23	84	84,4	142	89,31	92	91,1	54	91,52	146	91,25	0,80	0,38-1,68	0,58	
<i>*1/*2</i>	7	10,8	9	9,6	16	10,06	7	6,93	5	8,47	12	7,50	1,38	0,63-3,02	0,44	
<i>*2/*2</i>	0	0	1	1,10	1	0,63	2	1,98	0	0	2	1,25	0,50	0,04-5,57	1,00	
Total	65	100	94	100	159	100	101	100	59	100	160	100				

OR: Odds Ratio com intervalo de confiança de 95%.

p = valor de significância (< 0,05) – Teste Exato de Fisher

Tabela II - Frequências genotípicas para os polimorfismos do gene *ADA*, e comparação de OR entre os grupos com risco de doença cardiovascular e controle.

<i>ADA</i>	Risco de Doença Cardiovascular				Controles				OR	IC 95%	p				
	Masculino		Feminino		Masculino		Feminino					Total			
	n	%	n	%	n	%	n	%							
<i>*1*1</i>	27	87,09	44	93,62	71	91,02	92	91,1	54	91,52	146	91,25	0,97	0,38-2,52	1,00
<i>*1*2</i>	4	12,9	3	6,38	7	8,97	7	6,93	5	8,47	12	7,5	1,21	0,46-3,22	0,79
<i>*2*2</i>	0	0	0	0	0	0	2	1,98	0	0	2	1,25	0,40	0,02-8,52	1,00
Total	31	100	47	100	78	100	101	100	59	100	160	100			

OR: Odds Ratio com intervalo de confiança de 95%.

p = valor de significância (<0,05) - Teste exato de Fisher

Tabela III - Frequências dos alelos *ADA*1* e *ADA*2* do gene *ADA* e comparação de OR entre os grupos teste e grupo controle.

<i>ADA</i>	Pacientes						Controles						OR	IC 95%	P
	Masculino		Feminino		Total		Masculino		Feminino		Total				
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%			
<i>Alelo ADA*1</i>	123	94,61	177	94,15	300	94,34	191	94,55	113	95,76	304	95,0			
<i>Alelo ADA*2</i>	7	5,38	11	5,85	18	5,6	11	5,44	5	4,34	16	5,0	0,88	0,44-1,75	0,73
Total	130	100	188	100	318	199	202	100	188	100	320	100			

OR: Odds Ratio com intervalo de confiança de 95%.

p = valor de significância (< 0,05) – Teste Exato de Fisher

Tabela IV - Frequências dos alelos *ADA*1* e *ADA*2* do gene *ADA* e comparação de OR entre os grupos de diabéticos com risco de doença cardiovascular e grupo controle.

<i>ADA</i>	Risco de Doença Cardiovascular						Controle				OR	IC 95%	P		
	Masculino		Feminino		Total		Masculino		Feminino					Total	
	N	%	n	%	n	%	n	%	n	%				n	%
<i>Alelo ADA*1</i>	58	93,54	91	96,8	149	95,5	191	94,55	113	95,76	304	95,0			
<i>Alelo ADA*2</i>	4	6,46	3	3,19	7	4,48	11	5,44	5	4,34	16	5,0	1,12	0,45-2,78	1,00
Total	62	100	94	100	156	100	202	100	118	100	320	100			

OR: Odds Ratio com intervalo de confiança de 95%.

p = valor de significância (< 0,05) – Teste Exato de Fisher

Referências

1. American Diabetes Association. Position Statement: Diagnosis and Classification of Diabetes mellitus. *Diab Care* 2009; 32: S62 – S67.
2. Diabetes Research Working Group. Conquering diabetes: A strategic plan for the 21st century. Bethesda, M.D: National Institutes of Health, 1999. NIH publication n. 99-4398.
3. Geiger JD. et al. In Adenosine and Adenine Nucleotides as Regulators of Cellular Function. Boca Raton: CRC Press, 1991. 71-84 p.
4. Wilson DK, Quioco FA. A pre-transition-state mimic of an enzyme: X-ray structure of adenosine deaminase with bound 1-deazaadenosine and zinc-activated water. *Biochemistry*. 1993 Feb 23;32(7):1689-94.
5. Mohamedali KA, Guicherit OM, Kellems RE, Rudolph FB. The highest levels of purine catabolic enzymes in mice are present in the proximal small intestine. *J Biol Chem*. 1993 Nov 5;268(31):23728-33
6. Singh LS, Sharma R. Developmental expression and corticosterone inhibition of adenosine deaminase activity in different tissues of mice. *Mech Ageing Dev*. 1995 May 12;80(2):85-92.
7. Sharma RC, Singh P, Ojha TN, Tiwari SA quantitative analysis of binding affinities of ligands active at adenosine receptors. *Drug Des Discov*. 1994 Nov;12(2):169-77.
8. Aldrich Mb, Blackburn Mr, Kellems Re. The importance of adenosine deaminase for lymphocyte development and function. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000 Jun 7;272(2):311-5. Review.
9. Martínez-Hernández D, Arenas-Barbero J, Navarro-Gallar F, García-Esteban R, Santos-Sancho J, Gomez-de-Terrerros F. Adenosine deaminase in the acquired immunodeficiency syndrome. *Clin Chem*. 1988 Sep;34(9):1949.
10. Lucarini N, Borgiani P, Ballarini P, Bottini E. Erythrocyte acid phosphatase (ACP1) activity. In vitro modulation by adenosine and inosine and effects of adenosine deaminase (ADA) polymorphism. *Hum Genet*. 1989 Jan;81(2):185-7.
11. Dong RP, Kameoka J, Hegen M, Tanaka T, Xu Y, Schlossman SF, Morimoto C. Characterization of adenosine deaminase binding to human CD26 on T cells and its biologic role in immune response.. *J Immunol*. 1996 Feb 15;156(4):1349-55
12. Hirschhorn R, Yang DR, Israni A. An Asp8Asn substitution results in the adenosine deaminase (ADA) genetic polymorphism (ADA 2 allozyme):

- occurrence on different chromosomal backgrounds and apparent intragenic crossover. *Ann Hum Genet.* 1994 Jan;58(Pt 1):1
13. Persico AM, Militerni R, Bravaccio C, Schneider C, Melmed R, Trillo S, Montecchi F, Palermo MT, Pascucci T, Puglisi-Allegra S, Reichelt KL, Conciatori M, Baldi A, Keller F. Adenosine deaminase alleles and autistic disorder: case-control and family-based association studies. *Am J Med Genet.* 2000 Dec 4;96(6):784-90
 14. Battistuzzi G, Iudicone P, Santolamazza P, Petrucci R. Activity of adenosine deaminase allelic forms in intact erythrocytes and in lymphocytes. *Ann Hum Genet.* 1981 Feb;45(Pt 1):15-9.
 15. Barankiewicz J, Danks AM, Abushanab E, Makings L, Wiemann T, Wallis RA, Pragnacharyulu PV, Fox A, Marangos PJ. Regulation of adenosine concentration and cytoprotective effects of novel reversible adenosine deaminase inhibitors. *J Pharmacol Exp Ther.* 1997 Dec;283(3):1230-8.
 16. Nicotra M, Bottini N, Grasso M, Gimelfarb A, Lucarini N, Cosmi E, Bottini E. Adenosine deaminase and human reproduction: a comparative study of fertile women and women with recurrent spontaneous abortion. *Am J Reprod Immunol.* 1998 Apr;39(4):266-70.
 17. Hoshino T, Yamada K, Masuoka K, Tsuboi I, Itoh K, Nonaka K, Oizumi K. Elevated adenosine deaminase activity in the serum of patients with diabetes mellitus. *Diabetes Res Clin Pract.* 1994 Sep;25(2):97-102.
 18. Kurtul N, Pence S, Akarsu E, Kocoglu H, Aksoy Y, Aksoy H. Adenosine deaminase activity in the serum of type 2 diabetic patients. *Acta Medica (Hradec Kralove).* 2004;47(1):33-5
 19. Pena SDJ, Carvalho-Silva DR, Alves-Silva J, Prado FV, Santos FR. Retrato molecular do Brasil. *Ciência Hoje.* 2000 Abr; 27(159):16-25.
 20. American diabetes association. Dyslipidemia Management in Adults with Diabetes. *Diabetes Care.* 2004 Jan; 27(1).
 21. Pena SDJ, Macedo AM, Gontijo NF, Medeiros AM, Ribeiro JC. DNA bioprints simple non – isotopic DNA fingerprints with biotinylated probes. *Electrophoresis.* 1991 Feb-Mar;12(2-3):146-52.
 22. Saiki RK The design and optimization of the PCR. I: Erlich, H. A. (Ed.) *PCR technology – Principles and applications for DNA amplification.* Oxford University Press, New York, 1992.

23. Safranow K, Rzeuski R, Binczak-Kuleta A, Czyzycka E, Skowronek J, Jakubowska K, Wojtarowicz A, Loniewska B, Ciechanowicz A, Kornacewicz-Jach Z, Chlubek D. ADA*2 allele of the adenosine deaminase gene may protect against coronary artery disease. *Cardiology*. 2007;108(4):275-81. Epub 2007 Feb 8.
24. Xu B, Berkich DA, Crist GH, LaNoue KF. A1 adenosine receptor antagonism improves glucose tolerance in Zucker rats. *Am J Physiol*. 1998 Feb;274(2 Pt 1):E271-9.
25. Jamal Z, Saggerson ED. Enzymes involved in adenosine metabolism in rat white and brown adipocytes. Effects of streptozotocin-diabetes, hypothyroidism, age and sex differences. *Biochem J*. 1987 Aug 1;245(3):881-6.
26. Rutkiewicz J, Górski J. On the role of insulin in regulation of adenosine deaminase activity in rat tissues. *FEBS Lett*. 1990 Oct 1;271(1-2):79-80.
27. Liu Y, Saccucci P, Qi H, Wu HC, Zhao F, Dai Y, Bottini N, Gloria-Bottini F ADA polymorphisms and asthma: a study in the Chinese Han population. *J Asthma*. 2006 Apr;43(3):203-6.
28. Banci M, Saccucci P, D'Annibale F, Dofcaci A, Trionfera G, Magrini A, Bottini N, Bottini E, Gloria-Bottini F. Adenosine deaminase genetic polymorphism and coronary artery disease. *Cardiology*. 2009;112(1):74-5. Epub 2008 Jun 18.
29. Mortimore GE, King E Jr, Mondon CE, Glinsmann WH. Effects of insulin on net carbohydrate alterations in perfused rat liver. *Am J Physiol*. 1967 Jan;212(1):179-83.
30. Jefferson LS, Exton JH, Butcher RW, Sutherland EW, Park CR. Role of adenosine 3',5'-monophosphate in the effects of insulin and anti-insulin serum on liver metabolism. *J Biol Chem*. 1968 Mar 10;243(5):1031-8.
31. Taylor WM, Halperin ML. Stimulation of glucose transport in rat adipocytes by insulin, adenosine, nicotinic acid and hydrogen peroxide. Role of adenosine 3':5'-cyclic monophosphate. *Biochem J*. 1979 Feb 15;178(2):381-9.
32. Rodbell M. The role of hormone receptors and GTP-regulatory proteins in membrane transduction. *Nature*. 1980 Mar 6;284(5751):17-22.
33. Felig P, Cherif A, Minagawa A, Wahren J. Hypoglycemia during prolonged exercise in normal men. *N Engl J Med*. 1982 Apr 15;306(15):895-900.
34. Pilkis SJ, Chrisman TD, El-Maghrabi MR, Colosia A, Fox E, Pilkis J, Claus TH. The action of insulin on hepatic fructose 2,6-bisphosphate metabolism. *J Biol Chem*. 1983 Feb 10;258(3):1495-503

35. Budohoski L, Challiss RA, McManus B, Newsholme EA. Effects of analogues of adenosine and methyl xanthines on insulin sensitivity in soleus muscle of the rat. *FEBS Lett.* 1984 Feb 13;167(1):1-4.
36. McLane MP, Black PR, Law WR, Raymond RM. Adenosine reversal of in vivo hepatic responsiveness to insulin. *Diabetes.* 1990 Jan;39(1):62-9.
37. Han DH, Hansen PA, Nolte LA, Holloszy JO. Removal of adenosine decreases the responsiveness of muscle glucose transport to insulin and contractions. *Diabetes.* 1998 Nov;47(11):1671-5.
38. Gloria-Bottini F, Lucarelli P, Lucarini N, Bottini E. Adenosine deaminase-acid phosphatase association and the environment: A study in a continental Italian population. *Am J Hum Biol.* 2000 Mar;12(2):214-220.

CAPÍTULO V

4 DISCUSSÃO GERAL

Em nosso estudo não foram observadas diferenças estatisticamente significantes entre as frequências alélicas e genótípicas dos genes *ECA* e *ADA* nos grupos de pacientes, diabéticos com risco de doença cardiovascular e controle. Stephens et al., (2005), em seu estudo com populações caucasóides, verificaram associação entre o polimorfismo *I/D* da *ECA* e *DMT2*. Zhou et al., (2009) em sua metanálise, verificaram que a associação do alelo *D* com essa doença, apenas ocorre em populações caucasóides e do leste asiático, mas não em populações turcas e miscigenadas, como a brasileira. Provavelmente nosso resultado esteja relacionado ao número amostral e sugerimos ampliação do número de pacientes para melhor relação dos polimorfismos.

A associação desse polimorfismo com as doenças cardiovasculares também não foi observada em nosso estudo. Foram descritas associações entre o alelo *D* e doenças cardiovasculares nas populações turcas, francesas, chinesas, caucasóides e do leste asiático. (ARAZ et al., 2001; HADJADJ et al., 2003; THOMAS et al., 2003;. ZINTZARAS et al., 2008). No entanto, em populações negras, latinas e do leste indiano não foram observadas associações significantes (ZINTZARAS et al., 2008). Nossos dados são coincidentes com os dos autores supracitados, pois, nossa população de estudo é miscigenada, com contribuição de diversos grupos étnicos formadores, como populações caucasóide, latina e negra (PENA et al., 2000).]

As frequências alélicas e genótípicas observadas em nosso estudo são coincidentes com as observadas por Costa et al., (2002) e Sakuma et al., (2004) que estudaram esse mesmo polimorfismo e indivíduos com *DMT2* e doença coronariana em populações brasileiras de outras regiões do país. Em ambos os estudos foram observadas maiores frequências do genótipo *I/D*, seguidas por *D/D* e *I/I*. Observamos também frequências genótípicas e alélicas similares às de estudos nas populações espanhola, européia em geral, libanesa e afro-americana, que encontram-se entre as principais etnias formadoras da população de nossa região de estudo (PENA et al., 2000).

Quanto às análises do polimorfismo *TaqI* para o gene da *ADA*, também não foi observada relação entre o mesmo e o *DMT2* e doenças cardiovasculares. Foram encontradas maiores frequências do alelo *ADA*1* em todos os grupos analisados. Nossos resultados estão de acordo com os trabalhos que avaliaram a atividade

enzimática da ADA em pacientes com DMT2, observando uma maior atividade da enzima nesses indivíduos (JAMAL; SAGGERSON, 1987; RUTKIEWICZ ; GORSKI, 1990; HOSHINO et al., 1994; KURTUL et al., 2004).

As frequências alélicas e genótípicas encontradas são semelhantes aos estudos de Safranow et al., (2007), na população polonesa e Liu et al., (2006) na população chinesa que obtiveram maiores frequências do genótipo *ADA*1/*1*, seguido por *ADA*1/*2* e *ADA*2/*2* em seus grupos de estudo.

Para o grupo de estudo com risco de doença cardiovascular, foram observadas menores frequências do alelo *ADA*2*, assim como no estudo de Safranow et al., (2007) que avaliaram esse polimorfismo em pacientes com doença arterial coronariana, encontrando uma correlação entre a baixa frequência desse alelo e a presença da doença. Em nosso estudo essa correlação não foi verificada, pois, não houveram diferenças estatisticamente significantes entre as frequências alélicas e genótípicas nos grupos analisados. Mesmo sem essa associação, acreditamos ser necessário o acompanhamento dos pacientes diabéticos com risco de doença cardiovascular que apresentem os genótipos *ADA*1/*1* e *ADA*1/*2*, pois, a maior atividade da ADA nesses pacientes, diminui a concentração de adenosina, um potente cardioprotetor (SAFRANOW et al., 2007; BANCI et al., 2009).

Ainda não se sabe corretamente quais os mecanismos pelo qual a ADA relaciona-se ao DM, apenas sabemos que sua atividade apresenta-se elevada em pacientes com essa doença. Kurtul et al., (2004) relataram que a adenosina age diretamente estimulando a atividade da insulina em diversos tecidos, o que diminuiria a intolerância à glicose. Han et al., (1998) observaram que após a remoção da adenosina com ADA ou bloqueio de sua ação com antagonistas, houve uma diminuição no transporte de glicose para os músculos esqueléticos e diminuição do número de canais GLUT4 nesses tecidos. Esses canais são proteínas presentes principalmente na membrana de tecidos muscular e adiposo, responsáveis pelo transporte de glicose para o interior da célula.

Acreditamos serem necessários maiores estudos relacionando os polimorfismos dos genes *ECA* e *ADA* com o DMT2, para que ocorra um melhor entendimento dos mecanismos pelos quais esses genes atuam na etiopatogênese da doença, assim como a investigação de outros fatores (mecanismos), que influenciem o DMT2, como mecanismos pós-traducionais e transcricionais e interações gênicas.

5 CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos concluímos que:

1. Existe maior frequência do genótipo *I/D* e do alelo *D*, tanto em diabéticos quanto no grupo controle, compatível com os dados da literatura para a população brasileira.
 2. Existe maior frequência do genótipo *ADA*1/*1* e do alelo *ADA*1*, tanto em diabéticos quanto no grupo controle, compatível com os dados da literatura. Esse é o primeiro relato para a população brasileira.
- São necessários estudos sobre haplótipos do gene *ECA* assim como, estudos sobre a atividade enzimática da ADA e correlação com seus polimorfismos genéticos na população brasileira com e sem DM. São necessários também estudos sobre interações dos genes estudados com outros genes e com fatores pós-transcricionais e traducionais, além dos fatores externos, que se apresentam altamente relacionados a essa doença.

6 REFERÊNCIAS

Essas referências são relacionadas à introdução e discussão geral, conforme normas do Programa de Pós-graduação em genética e segue o formato ABNT NBR6023/2002.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Position Statement: Diagnosis and Classification of Diabetes mellitus. **Diabetes Care**, v.32, sup. 1, p. S62 – S67, Jan, 2009.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. American diabetes association. Dyslipidemia Management in Adults with Diabetes. **Diabetes Care**, v. 27, s. 1, Jan, 2004.

ANDERSSON, D.K.G.; SVAARDSUDD, K. Longterm glycemc control relates to mortality in type II diabetes. **Diabetes Care**, v. 18, n. 12, p. 1534–1543, Dec, 1995.

ARAZ, M. et al. Angiotensin-converting enzyme gene polymorphism and microvascular complications in Turkish type 2 diabetic patients. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v. 54, n. 2, p. 95-104, Nov, 2001.

BADER, M. et al. Tissue renin-angiotensin systems: new insights from experimental animal models in hypertension research. **Journal of Molecular Medicine**, v. 79, n. 2-3, p. 76-102, Apr, 2001.

BADER, M.; GANTEN, D. Update on tissue renin-angiotensin systems. **Journal of Molecular Medicine**, v.86, n. 6, p. 615-621, Jun, 2008.

BANCI, M. et al. Adenosine deaminase genetic polymorphism and coronary artery disease. **Cardiology**, v. 112, n. 1, p. 74-75, Jun, 2009.

BARANKIEWICZ, J. et al. Regulation of adenosine concentration and cytoprotective effects of novel reversible adenosine deaminase inhibitors. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapy**, v. 283, p. 1230–1238, Dec, 1997.

BARNETT, A.H. et al. Diabetes in identical twins. **Diabetologia**, v. 20, n. 2, p. 87–93, Feb, 1981.

BATTISTUZZI, G. et al. Activity of adenosine deaminase allelic forms in intact erythrocytes and in lymphocytes. **Annals of Human Genetics**, v. 45, p. 15-19, Feb, 1981.

BLACKBURN, M.R.; KELLEMS, R.E. Adenosine deaminase deficiency: metabolic basis of immune deficiency and pulmonary inflammation. **Advances in Immunology**, v. 86, p. 1-41, 2005.

BOGARDUS, C. et al. Relationship between degree of obesity and in vivo insulin action in man. **The American Journal of Physiology**, v. 248, n. 3, p. E286– E291, Mar, 1985.

BOTTINI, E.; GLORIA-BOTTINI, F. Adenosine deaminase and body mass index in non-insulin-dependent diabetes mellitus. **Metabolism**, v. 48, p. 949–951, 1999.

BOTTINI, N. et al. Autism: evidence of association with adenosine deaminase genetic polymorphism. **Neurogenetics**, v. 3, n. 2, p. 111–113, Mar, 2001.

BOTTINI, N. et al. Genetic polymorphism and Th1/Th2 orientation. **International Archives of Allergy and Immunology**, v. 138, n. 4, p. 328–333, Dec, 2005.

BUDOHOSKI, L. et al. Effect of analogues of adenosine and methyl xanthines on insulin sensitivity in soleus muscle of the rat. **FEBS Letters**, v. 167, n. 1, p. 1–4, Feb, 1984.

BUTKIEWICZ, E.K. et al. Insulin therapy for diabetic ketoacidosis. **Diabetes Care**, v. 18, n. 8, p. 1187–1190, Aug, 1995.

CAMPBELL, D.J.; HABENER, J.F. Angiotensinogen gene is expressed and differentially regulated in multiple tissues of the rat. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 78, n. 1, p. 31-39, Jul, 1986.

CAREY, R.M. et al. Biomechanical coupling in renin-releasing cells. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 100, n. 6, p. 1566-1574, Sep, 1997.

CAREY, R.M.; SIRAGY, H.M. The intrarenal renin-angiotensin system and diabetic nephropathy. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, v. 14, n. 6, p. 274-281, Aug, 2003.

CAREY, R.M.; SIRAGY, H.M. Newly recognized components of the renin-angiotensin system: potential roles in cardiovascular and renal regulation. **Endocrinology Reviews**, v. 24, n. 3, p. 261-271, Jun, 2003.

COOK, J. T. et al. Segregation analysis of NIDDM in Caucasian families. **Diabetologia**, v. 37, n.12, p. 1231-1240, Dec, 1994.

COSTA, L.A. et al. The ACE Insertion/Deletion Polymorphism is not associated with the metabolic syndrome (WHO definition) in Brazilian type 2 diabetic patients. **Diabetes Care**.v. 25, n. 12, p. 2365-2366, Dec, 2002.

COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. (Org.).**Patologia Estrutural e Funcional**. 6 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A, 2000. 1251p.

DANSER, A.H. et al. Angiotensin-converting enzyme in the human heart. Effect of the deletion/insertion polymorphism. **Circulation**, v. 95, n. 6, p. 1387-1388, Set, 1995.

DANSER, A.H.; SCHALEKAMP, M.A. Is there an internal cardiac renin-angiotensin system. **Heart**, v. 76, s. 3, p. 28-32, Nov. 1996.

DEFRONZO, R. et al. Insulin sensitivity and insulin binding to monocytes in maturity-onset diabetes. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 63, n. 5, p. 939–946, May, 1979.

DEINUM, J.; CHATURVEDI, N et al. **The Renin-Angiotensin system and vascular disease in diabetes**. Department of Internal Medicine, Erasmus Medical Center, Rotterdam, v. 02, n. 02, p. 149-156, May, 2002.

DONG, R.P. et al. Characterization of adenosine deaminase binding to human CD26 on T cells and its biologic role in immune response. **Journal of Immunology**, v. 156, n. 4, p. 1349-1355, Feb, 1996.

DONOGHUE, M., et al., A novel angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin 1-9. **Circulation Research**, v. 87, n. 5, p. E1-E9, Sep, 2000.

DZAU, V.J. et al. A comparative study of the distributions of renin and angiotensinogen messenger ribonucleic acids in rat and mouse tissues. **Endocrinology**, v. 120, n. 6, p. 2334-2338, Jun, 1987.

ENGELI, S. et al. Physiology and pathophysiology of the adipose tissue renin-angiotensin system. **Hypertension**, v. 35, n. 6, p. 1270-1277, Jun, 2000.

ESPINOSA, J.S. et al. Association between myocardial infarction and angiotensin converting enzyme gene polymorphism in young patients. **Medicina Clinica (Barc)**, v. 110, n. 13, p. 488-491, Apr, 1998.

FELIG, P. et al. Hypoglycemia during prolonged exercise in normal men. **The New England Journal of Medicine** v. 306, n. 15, p. 895-900, Apr, 1982.

FERNÁNDEZ-LLAMA, P. et al. Polimorfismos genéticos del sistema renina-angiotensina e hipertension arterial esencial. **Medicina Clinica (Barcelona)**, v. 112, p.561-564, 1999.

FIRTH, R.G. et al. Effects of tolazamide and exogenous insulin on insulin action in patients with non-insulin- dependent diabetes mellitus. **The New England Journal of Medicine**, v. 314, n. 20, p.1280–1286, May, 1986.

FLEGAL, K. M. et al. Prevalence of diabetes in Mexican-Americans, Cubans and Puerto Ricans from the Hispanic-Health and Nutrition Examination Survey, 1982-1984. **Diabetes Care**, v. 14, supp. 3, p. 628-638, 1991.

FLEMING, I. et al. New fACEs to the renin-angiotensin system. **Physiology (Bethesda)**, v. 20, p.91-95, Apr, 2005.

FUJIMOTO, W.Y. et al. Prevalence of complications among second- generation Japanese-American men with diabetes, impaired glucose tolerance or normal glucose tolerance. **Diabetes**, v. 36, n. 6, p. 730–739, Jun, 1987.

GAKIS, C. et al. Unusual biochemical pattern of serum adenosine deaminase activity in acute lymphoblastic leukemia. **Haematologica**, v. 67, p. 199–206, 1982.

GAKIS, C. et al. Serum adenosine deaminase activity in HIV-positive subjects: a hypothesis on the significance of ADA-2. **Panminerva Medica**, v. 31, n. 3, p. 107–113, Jul-Sep, 1989.

GAKIS, C. et al. Serum and pleural adenosine deaminase activity, correct interpretation of the findings. **Chest**, v. 99, n. 6, p. 1555–1556, Jun, 1991.

GEIGER, J. D. et al. **In Adenosine and Adenine Nucleotides as Regulators of Cellular Function**. Boca Raton: CRC Press, 1991. 71-84 p.

GEIGER, J. D. and NAGY, J. I. . In Adenosine and adenosine Receptors. Clifton N. J. Humana Press. 1990.

GLASER, N.S. Non-insulin dependent diabetes mellitus in childhood and adolescence. **Pediatric Clinics of North America**, v. 44, n. 2, p. 307-337, Apr, 1997.

GOMEZ, R.A. et al. Molecular biology of the renal renin-angiotensin system. **Kidney International**, v. 38, p. S18-S23, Nov, 1990.

GOTTLIEB, M.S. Diabetes in offsprings and siblings of juvenile and maturity onset type diabetics. **Journal of Chronic Diseases**, v. 33, n. 6, p. 331-339, 1980.

GRIENGLING, K.K. et al. Molecular biology of the renin-angiotensin system. **Circulation**, v. 87, n. 6, p. 1816-1828, Jun, 1993.

GRUPO INTERDISCIPLINAR DE PADRONIZAÇÃO DA HEMOGLOBINA GLICADA – A1c. **Atualização Sobre A Hemoglobina Glicada (A1c) Para Avaliação Do Controle Glicêmico E Para O Diagnostico Do Diabetes: Aspectos Clínicos E Laboratoriais**. Posicionamento Oficial, 3 ed., 2009.

HADJADJ, S. et al. Prognostic value of angiotensin-I converting enzyme I/D polymorphism for nephropathy in type 1 diabetes mellitus: a prospective study. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 12, n. 3, p. 541-549, Mar, 2001.

HADJADJ, S. et al. Angiotensin-I-converting enzyme insertion/deletion polymorphism and high urinary albumin concentration in French Type 2 diabetes patients. **Diabetic Medicine: a journal of the British diabetic association**, v. 20, n. 8, p. 677-682, Aug, 2003.

HAN, D. H. et al. Removal of adenosine decreases the responsiveness of muscle glucose transport to insulin and contractions. **Diabetes**, v. 47, n. 11, p. 1671-1675, Nov,

1998.

HARRIS, H. The familial distribution of diabetes: a study of the relatives of 1241 diabetic propostiti. **Ann. Eugenet**, v. 15, p. 95-119, 1950.

HARRIS, M.I. Impaired glucose tolerance in the U.S. population. **Diabetes Care**, v.12, n.7, p. 464–474, Jul, 1989.

HARRIS, M.I. et al. (Eds.). **Diabetes in America**. 2nd. ed. Washington DC: U.S.Govt. Printing Office, 1995.

HENRY, R.R. et al. Effects of weight loss on mechanisms of hyperglycemia in obese non-insulin-dependent diabetes mellitus. **Diabetes**, n. 35, n. 9, p.990– 998, Sep, 1986.

HIRSCHHORN, R. et al. An Asp8Asn substitution results in the adenosine deaminase (ADA) genetic polymorphism (ADA 2 allozyme): occurrence on different chromosomal backgrounds and apparent intragenic crossover. **Annals of Human Genetics**, v. 58, p. 1-9, Jan, 1994.

HOMMA, T. et al. Angiotensin II induces hypertrophy and stimulates collagen production in cultured rat glomerular mesangial all. **Clinical Research**, v. 38, p. 358, 1990.

HOSHINO, T. et al. Elevated adenosine deaminase activity in the serum of patients with DM. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v. 25, n. 2, p. 97–102, Sep, 1994.

JAMAL, Z.; SAGGERSON, E. D. Enzymes involved in adenosine metabolism in rat white and brown adipocytes: effects of streptozotocin-diabetes, hypothyroidism, age and sex differences. **The Biochemical Journal**, v. 245, n. 3, p. 881–886, Aug, 1987.

JEFFERSON, L.S. et al. Role of adenosine 3',5'-monophosphate in the effects of insulin and anti-insulin serum on liver metabolism. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 243, n. 5, p. 1031–1038, Mar, 1968.

KAHN, C. R. Insulin action, diabetogenes, and the cause of type II diabetes. **Diabetes**, v. 43, p. 1066-1084, 1994.

KAHN, R. et al. **Joslin: diabetes melito**. 14 ed. Porto Alegre: Artmed, 2009. 1224p.

KAWATE, R. et al. Diabetes mellitus and its vascular complications in Japanese migrants on the Island of Hawaii. **Diabetes Care**, v.2, n.2, p. 161-170, 1979.

KISSEBAH, A.H. et al. Relationship of body fat distribution to metabolic complications of obesity. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 54, n. 2, p. 254– 260, Feb, 1982.

KNOWLER, W.C. et al. Diabetes mellitus in Pima Indians: incidence, risk factors and pathogenesis. **Diabetes/Metabolism Reviews**, v. 6, n. 1, p. 1-27, Feb, 1990.

KOLTERMAN, O.G. et al. Receptor and post receptor defects contribute to the insulin resistance in noninsulin- dependent diabetes mellitus. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 68, n. 4, p. 957–969, Oct, 1981.

KURTUL, N. et al. Adenosine deaminase activity in the serum of type 2 diabetic patients. **Acta Medica (Hradec Kralove)**, v. 47, n. 1, p. 33–35, 2004.

KUUSISTO, J. et al. NIDDM and its metabolic control predict coronary heart disease in elderly subjects. **Diabetes**, v. 43, n. 8, p. 960–967, Aug, 1994.

LANDER, E.S. et al. Initial sequencing and analysis of the human genome. **Nature**, v. 409, n.6822, p. 860-921, Feb, 2001.

LIU, Y. et al. ADA polymorphisms and asthma: a study in the Chinese Han population. **The Journal of Asthma: official journal of the association for the Care of Asthma**, v. 43, n. 3, p. 203-206, Apr, 2006.

LUCARINI, N. et al. Erythrocyte acid phosphatase (ACP1) activity. In vitro modulation by adenosine and inosine and effects of adenosine deaminase (ADA) polymorphism. **Human Genetics**, v. 81, n. 2, p. 185-187, Jan, 1989.

MCLANE, M.P. et al. Adenosine reversal of in vivo hepatic responsiveness to insulin. **Diabetes**, v. 39, n. 1, p. 62–9, Jan, 1990.

MALLOW, H et al. Production of angiotensin II receptors type one (AT1) and type two (AT2) during the differentiation of 3T3-L1 preadipocytes. **Hormone and Metabolic Research**, v. 32, n. 11-12, p. 500-503, Nov-Dec, 2000.

MATSUSAKA, T.; ICHIKAWA, I. Biological functions of angiotensin and its receptors. **Annual Review of Physiology**, v. 59, p. 395-412, 1997.

MÉNARD, J. Anthology of the renin-angiotensin system: a one hundred reference approach to angiotensin II antagonists. **Journal Hypertension Suppl**, v. 11, n. 3, p. S3-S11, Apr, 1993.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Cadernos de atenção básica: diabetes mellitus. n.16. Brasília, DF, 2006. 56p.

MOHAMEDALI, K.A. et al. The highest levels of purine catabolic enzymes in mice are present in the proximal small intestine. **J Biol Chem**, v. 268, n. 31, p. 23728-23733, Nov, 1993.

MOKDAD, A. H. et al. Diabetes trends in the U.S.:1990-1998. **Diabetes Care**, v. 23, n. 9, p. 1278-1283, Sep, 2000.

MORIMOTO, S.; SIGMUND, C.D. Angiotensin mutant mice: a focus on the brain renin-angiotensin system. **Neuropeptides**, v. 36, n. 2-3, p. 194-200, Apr-Jun, 2002.

MORTIMORE, G.E. et al. Effects of insulin on net carbohydrate alterations in perfused rat liver. **American Journal of Physiology**, v. 212, n. 1, p. 179–83, Jan, 1967.

MOSS, S.E. et al. The association of glycemia and causespecific mortality in a diabetic population. **Archives of Internal Medicine**, v. 154, n. p. 2473–2479, 1984.

NAKAI, K. et al. Deletion polymorphism of the angiotensin I-converting enzyme gene is associated with serum ACE concentration and increased risk for CAD in the Japanese. **Circulation**, v. 90, n. 5, p. 2199-202, Nov, 1994.

NEWMAN, B. et al. Concordance for type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus in male twins. **Diabetologia**, v. 30, n. 10, p. 763–738, Oct, 1987.

NICOTRA, M. et al. Adenosine deaminase and human reproduction: a comparative study of fertile women and women with recurrent spontaneous abortion. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 39, n. 4, p. 266– 270, Apr, 1998.

NICOTRA, M. et al. repeated spontaneous abortion. Cooperative effects of ADA and ACP1 genetic polymorphisms. **American journal of reproductive immunology**, v. 58, n. 1, p. 1-10, Jul, 2007.

NIELSEN, A.H. et al. Current topic: the uteroplacental renin-angiotensin system. **Placenta**, v. 21, n. 5-6, p. 468-477, Jul-Aug, 2000.

OLEFSKY, J.M. et al. Insulin action and resistance in obesity and noninsulin-dependent type II diabetes mellitus. The **American Journal of Physiology**, v. 243, n. 1, p. E15–E30, Jul, 1982.

PENA, S. D. J. et al. DNA bioprints simple non – isotopic DNA fingerprints with biotinnylated probes. **Eletrophoresis**, v. 12, p. 14-52, 1991.

PENA, S. D. et al. Retrato molecular do Brasil. **Ciência Hoje**, v. 27, n. 159, p. 16-25, Abr, 2000.

PERSICO, A.M. et al. Adenosine deaminase alleles and autistic disorder: case-control and family-based association studies. **American Journal of Medical Genetics**, v. 96, n. 6, p. 784-790, Dec, 2000.

PILKIS, S.J. et al. The action of insulin on hepatic fructose-2,6-bisphosphate metabolism. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 258, n. 3, p. 1495–503, Feb, 1983.

PINCUS, G.; WHITE, P. On the inheritance of diabetes mellitus. II. Further analysis of family histories. **Proceedings of the National Academy Sciences of U S A**, v. 19, n. 6, p. 631-635, Jun, 1933.

PIRAS, M.A.; GAKIS, C. Cerebrospinal fluid adenosine deaminase activity in

tuberculosis meningitis. **Enzyme**, v. 14, p. 311-317, 1973.

POULSEN, P. et al. Heritability of type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus and abnormal glucose tolerance – a population-based twin study. **Diabetologia**, v. 42, n. 2, p. 125-127, Feb, 1999.

PRIEBE, T. S. and NELSON, J. A. **In Adenosine and Adenine Nucleotides as Regulators of Cellular Function**. Boca Raton: CRC Press, 1991. 141-167 p.

REAVEN, G.M. et al. Nonketotic diabetes mellitus: insulin deficiency or insulin resistance? **American Journal of Medicine**, v. 60, n. 1, p. 80–88, Jan, 1976.

REUDELHUBER, T.L. **Molecular Biology of Renin**. In Schlöndorff, D.; Bonventre, J.V. eds. **Molecular Nephrology**. 1^o ed. New York: Dekker, 1995. 71-89p.

RICH, S.S. Mapping genes in diabetes: genetic epidemiological perspective. **Diabetes**, v. 39, n. 11, p. 1315-1319, Nov, 1990.

RODBELL, M. The role of hormone receptors and GTP-regulatory proteins in membrane transduction. **Nature**, v. 284, n. 5751, p. 17–22, Mar, 1980.

RUTKIEWICZ, J.; GORSKI, J. On the role of insulin in regulation of adenosine deaminase activity in rat tissues. **FEBS Letters**, v. 271, n. 1-2, p. 79–80, Oct, 1990.

SAFRANOW, K. et al ADA*2 allele of the adenosine deaminase gene may protect against coronary artery disease. **Cardiology**, v. 108, n. 4, p. 275-281, Feb, 2007.

SAIKI, R. K. **The design and optimization of the PCR**. I: Erlich, H. A. (Ed.) PCR technology – Principles and applications for DNA amplification. New York: Oxford University Press. p. 7-16, 1992

SAKUMA, T. et al. Five polymorphisms in gene candidates for cardiovascular disease in Afro-Brazilian individuals. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, v. 18, n. 6, p. 309-316, 2004.

SAVAGE, PJ. Cardiovascular complications of diabetes mellitus: what we know and what we need to know about their prevention. **Annals of Internal Medicine**, v. 124, p. 123 – 126, Jan, 1996.

SCARLETT, J.A. et al. Insulin treatment reverses the insulin resistance of type II diabetes mellitus. **Diabetes Care**, v. 5, n. 4, p. 353– 363, Jul, 1982.

SECRETARIA DE ESTADO DE SAÚDE DE MINAS GERAIS. **Manual de Atenção à Saúde do Adulto - Hipertensão Arterial e Diabetes mellitus**. 1^a Edição. Belo Horizonte, MG, 2006. 198 p.

SERNIA, C. A critical appraisal of the intrinsic pancreatic angiotensin-generating system. **JOP: Journal of the pancreas**, v. 2, n. 1, p. 50-55, Jan, 2001.

SHARMA, R.C. et al. A quantitative analysis of binding affinities of ligands active at adenosine receptors. **Drug Design and Discovery**, v. 12, n. 2, p. 169-177, Nov, 1994.

SIMONSON, D.C. et al. Mechanism of improvement in glucose metabolism after chronic glyburide therapy. **Diabetes**, v. 33, n. 9, p. 838–845, Sep, 1984.

SINGH, L.S.; SHARMA, R. Developmental expression and corticosterone inhibition of adenosine deaminase activity in different tissues of mice. **Mechanisms of Ageing Development**, v.80, n. 2, p. 85-92, May, 1995.

SINGH, L. S.; SHARMA, R. Alloxan Diabetes Regulates Adenosine Deaminase Activity In Mice : Tissue- And Age- Specific Correlation. **Biochemistry and Molecular Biology International**, v. 46, n. 1, p. 55-61, Sep, 1998.

STEPHENS, J.W. et al. The D allele of the ACE/ID common gene variant is associated with type 2 diabetes mellitus in Caucasian subjects. **Molecular Genetics and Metabolism**, v. 84, n. 1, p. 83-89, Jan, 2005.

TANK, J.E. et al. Regulation of glomerular and proximal tubule renin mRNA by chronic changes in dietary NaCl. **The American Journal of Physiology**, v. 273, n. 6 pt2, p. F892-F898, Dec, 1997.

TAYLOR, W.M.; HALPERIN, M.L. Stimulation of glucose transport in rat adipocytes by insulin, adenosine, nicotinic acid and hydrogen peroxide: role of adenosine 3':5'-cyclic monophosphate. **The Biochemical Journal**, v. 178, n. 2, p. 381–389, Feb, 1979.

THOMAS, G.N. et al. Peripheral vascular disease in Type 2 diabetic Chinese patients: associations with metabolic indices, concomitant vascular disease and genetic factors. **Diabetic Medicine: a journal of the British diabetic association**, v. 20, n. 12, p. 988-995, Dec, 2003.

TIPNIS, SR et al. A human homolog of angiotensin-converting enzyme. Cloning and functional expression as a captopril-insensitive carboxypeptidase. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 43, p. 33238-33243, Oct, 2000.

TURNER, R.C. et al. Insulin deficiency and insulin resistance interaction in diabetes: estimation of their relative contribution by feedback analysis from basal plasma insulin and glucose concentrations. **Metabolism**, v. 28, n. 11, p.1086–1096, Nov, 1979.

UMPIERREZ, G.E. et al. Diabetic ketoacidosis in obese African- Americans. **Diabetes**, v. 44, n. 7, p. 79–85, Jul, 1995.

UUSITUPA, M.I.J. et al. Ten year cardiovascular mortality in relation to risk factors and abnormalities in lipoprotein composition in type 2 (noninsulin- dependent) diabetic and nondiabetic subjects. **Diabetologia**, v. 11, p.1175– 1184, Nov, 1993.

WANG, T.; GIEBISCH, G. Effects of angiotensin II on electrolyte transport in the early and late distal tubule in rat kidney. **The American Journal of Physiology**, v. 271, n. 1 Pt 2, p. F143-F149, Jul, 1996.

WEBER, J.L. Informativeness of human (dC-dA)_n-(dG-dT)_n polymorphisms. **Genomics**, v. 7, n. 4, p.524-30, Aug, 1990.

WHO STUDY GROUP. **Diabetes mellitus. Technical Report Series 727**. Geneva: World Health Organization, 1985.

WIGINTON, D.A. et al. Complete sequence and structure of the gene for human adenosine deaminase. **Biochemistry**, v. 25, n. 25, p. 8234-8244, Dec, 1986.

WILSON, D.K.; QUIOCHO, F.A. A pre-transition-state mimic of an enzyme: X-ray structure of adenosine deaminase with bound 1-dezaadenosine and zinc-activated water. **Biochemistry**, v. 32, n. 7, p. 1689-1694, Feb, 1993.

WING, R.R. et al. Caloric restriction per se is a significant factor in improvements in glycemic control and insulin sensitivity during weight loss in obese NIDDM patients. **Diabetes Care**, v. 17, n. 1, p. 30–36, Jan, 1994.

WOLF, G. **Angiotensin as a renal growth promoting factor**. In Mukhopadhyay, A.K.; Raizada, M.K. eds. **Tissue Renin-Angiotensin Systems**. 1^o ed. New York: Plenum Press, 1995. 225-236p.

WRIGHT, J.W. & HARDING, J.W. Brain angiotensin receptor subtypes in the control of physiological and behavioral responses. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 18, n.1, p. 21-53, Spring, 1994.

ZHOU, J.B. et al. Angiotensin-Converting Enzyme gene polymorphism is associated with Type 2 Diabetes: a meta-analysis. **Molecular Biology Reports**, v. 37, n. 1, p. 67-73, Jan, 2010.

ZIMMET, P.Z. Kelly West Lecture 1991: challenges in diabetes epidemiology: from west to the rest. **Diabetes Care**, v. 15, n. 2, p. 232–252, Feb, 1992.

ZINTZARAS, E. et al. Angiotensin-Converting Enzyme Insertion/Deletion Gene Polymorphic Variant as a Marker of coronary artery disease. *Archives of Internal Medicine*, v.168, n. 10, p. 1077-1089, May, 2008.

APÊNDICES

Continuação.

Cód	sexo	Idade	LDL				Media	Triglicerídeos				Média	Urinalise					ECA		ADA
															Glicose	Proteína	Hemácias	Leucócitos	Bacteriúria	
CB3	M	45	157	141	170	61	132,3	634	199	273	422	382	+	++	10.000		++	CB3	II	ADA1/1
CB13	M	68	40				40	193				193						CB13	DD	ADA1/1
CB17	M	56	211	117	50	162	135	275				275						CB17	ID	ADA 1/2
CB23	M	66						87	81	163	37	92			1.000	2.000	+	CB23	DD	ADA1/1
CB24	M	70	129	171	123	113	134	138	107	71	70	96,5						CB24	DD	ADA1/2
CB26	M	79						91	160	96	85	108			2.000	5.000	++	CB26	DD	ADA1/1
CB27	M	56						102	227	594	225	287						CB27	DD	ADA1/1
CB29	M	55						90	70	62	74	74	Traços		1.000	2.000	+	CB29	DD	ADA1/1
CB39	M	51						252	207	219	290	242		Traços	3.000	10.000	++	CB39	ID	ADA1/1
CB40	M	62	87	85	89	93	88,5	51	38	76	38	50,75			20.000	2.000	++	CB40	ID	ADA1/1
CB41	M	63	127	175			151	131	170			150,5			1.000	2.000	+	CB41	DD	ADA1/1
CB45	M	67	111	105	107	102	106,3	109	89	64	56	79,5	+		2.000	30.000	+	CB45	ID	ADA1/1
CB46	M	57	116	159	141	134	137,5	177	148	170	127	155,5	Traços		1.000	2.000	++	CB46	ID	ADA1/1
CB49	M	87	95	93	84	104	94	83	135	117	131	116,5			1.000	2.000	+	CB49	II	ADA1/1
CB50	M	78	104	98	96	120	104,5	193	160	173	180	176,5						CB50	ID	ADA1/1
CB52	M	73	141	75	118	117	112,8	265	142	144	114	166,3		+	1.000	3.000	++	CB52	II	ADA1/1
CB56	M	60	100	127			113,5	168	256	235		219,7			1.000	2.000	+	CB56	ID	ADA1/1
CB58	M	76																CB58	ID	ADA1/1
CB60	M	60	191	143	163		165,7	80	87	78		81,66			1.000	2.000	+	CB60	ID	ADA1/1
CB67	M	71	126	119	93	67	101,3	261	138	121	149	166,5			2.000	6.000	+	CB67	ID	ADA1/1
CB70	M	63						203	246	205	172	206,5		Traços	1.000	1.000	+	CB70	ID	ADA1/1
CB73	M	85						117	122	171	38	112		+	1.000	2.000	+	CB73	II	ADA1/1
CB78	M	80	151	115	96	79	110,3	63	84	85	62	73,5			5.000	8.000	+	CB78	ID	ADA1/1
CB81	M	59	103	92	112		102,3	135	99	100	238	143			3.000	2.000	+	CB81	II	ADA1/1
CB88	M	59	187	165	146	126	156	94	181	126	116	129,3	Traços		1.000	1.000	+	CB88	II	ADA1/1
CB89	M	76	131	112	126	92	115,3	139	214	150	112	153,8			1.000	1.000	+	CB89	ID	ADA1/1
CB90	M	56	92	71			84	55	62			58,5			1.000	2.000	++	CB90	DD	ADA1/1
CB96	M	72	86	75	125	84	92,5	134	92	147	149	130,5			1.000	2.000	+	CB96	ID	ADA1/2
CB99	M	45	75				75	308	244	171		241	+++		2.000	1.000	+	CB99	ID	ADA1/1
CB101	M	73	133	134			133,5	149	72	136	530	221,8	+++	++	5.000	2.000	++	CB101	DD	ADA1/1
CB102	M	75																CB102	ID	ADA1/1
CB103	M	65	137	127	134		132,7	194	228	270	158	212,5						CB103	ID	ADA1/1
CB108	M	49						50	71	49	50	55			1.000	2.000	+	CB108	ID	ADA1/1
CB109	M	68																CB109	ID	ADA1/1

Continuação

Cód	sexo	Idade	Glicose				MEDIA	Hb A1c	Creatinina				MEDIA	Uréia			MEDIA	Na+	K+	Colesterol				MEDIA	HDL				MEDIA	
CB110	M	73	151	150	180	122	150,8	7,5	1	0,8	1,1	1,1	1	29	34	18		27			215	230	195	196	209	45	44	39	47	43,75
CB117	M	76	104	123	122	100	112,3	7,7																						
CB118	M	64	200	256	234	257	236,8	7,1	1,1	1,1	1,1		1,1	39				39	144	5,2	165	143	144	136	147	45	45	51	52	48,25
CB121	M	56	327	185	123	196	207,8	7,1					1,2	35				35	144	4,5	122	154			138	28	29		28,5	
CB122	M	58	168	152	69	123	128	7,3																						
CB124	M	62	117	128	128		124,3	7	1	1,5	1,2		1,23	21	34			27,5	140	5,1	200	180	207		195,66	32			32	
CB125	M	79	179	191	205	111	171,5	7	1,3	1,3	1,4		1,33	45				45	145	4,8	213	215	194	184	201,5	44	45	54	48	47,75
CB127	M	65	219	108	145	93	141,3	7	0,9	1,3	1,2	1,2	1,15	27	36	27	30	30	144	5,2	188	170	156	154	167	45	49	50	45	47,25
CB129	M	53	330	195	165	103	198,3	7	1,1	0,9	0,9	1	0,975	25	38	32	39	33,5	147	4,4	223	230	196	188	209,25	40	34	47	58	44,75
CB130	M	63	211	180	115		168,7	7,4																	158	39			39	
CB131	M	77	150	183	126	118	144,3	6,8	0,8	1,1	0,9	1	0,95	39	22	30		30,3	146	4,9	196	203	165	191	188,75	48	51	50	42	47,75
CB133	M	52	116	208	130		151,3	7,4	1,1	1,1			1,1								211	222	184		205,66	32			32	
CB134	M	60	140	95	85	124	111	6,9	1,2	1	1,1	1,2	1,125								179	151	120	138	147	53	43	37	35	42
CB138	M	64	136	150	152	93	132,8	7	1	1,2	1	1,1	1,075	26	85	27	30	42	141	4,5	230	243	193	229	223,75					
CB140	M	62	45	100	134	88	91,75	6,9	0,8	1	0,9	1	0,925	26	28	21	17	23			140	158	148	133	144,75					
CB141	M	78	140	128	128	110	126,5	6,8																						
CB142	M	72	138	96	155	121	127,5	7,8	1,3	1,3	1,2	1,3	1,275	40	33			36,5	143	4,2	297	244	253	211	251,25					
CB144	M	55	88	114	151	102	113,8	6,8	0,6	0,9	1		0,833	30				30	144	4,7	286	275	198	192	237,75					
CB145	M	70	104	152			128	6,3	0,9	1			0,95	39	31			35	146	4,6	244	157			200,5					
CB146	M	81	104	89	94	85	93	7,7													154	176	180	146	164					
CB147	M	63	224	212	134	171	185,3	6,5	1	0,9	0,9	1	0,95	30	52	43	40	41,3	136	4,7	187	159	145	141	158	38	42	35	37	38
CB148	M	51	165	97	218	84	141	7,6	1,2	0,9	1,3	1,1	1,125								262	161	153	153	182,25					
CB151	M	79	117	137	131	114	124,8	7,3																						
ECA2	M	64	285	69	42		132	7,4																						
ECA 5	M	65	124	132	115	117	122	7,2																						
ECA 9	M	65	281	148	189	155	193,3	6,3																						
ECA 10	M	81	123	177	140	65	126,3	6,1																						
ECA 23	M	47	146	249	203		199,3	7,3																						
ECA 30	M	60	174	209	274	114	192,8	6,9	1	0,9	1,1	0,9	0,975	25	23			24	142	4,3	144	204	187	195	182,5	41	39	37	34	37,75
ECA 40	M	63	115	81	97	101	98,5	7																						
ECA 59	M	70	105	118	125	105	113,3	7,2																						
ECA 68	M	48	104	99	112	92	101,8	7,3	1,4	1,1	0,9	1,3	1,175	24	40	33	36	33,3	141	4,7	185	146	142	135	152	45	54	42	34	43,75

Continuação

Cód	sexo	Idade	LDL				MEDIA	Triglicerídeos				MEDIA	Urinalise					ECA		ADA
															Glicose	Proteína	Hemácias	Leucócitos	Bacteriúria	
CB110	M	73	142	171	139	130	145,5	138	78	82	93	97,75			1.000	2.000	+++	CB110	DD	ADA1/1
CB117	M	76																CB117	DD	ADA1/1
CB118	M	64	82	72	57	54	66,25	188	128	179	148	160,8	+	+	1.000	2.000		CB118	II	ADA1/1
CB121	M	56	73	110			91,5	104	78			91	+		1.000	2.000	+	CB121	ID	ADA1/1
CB122	M	58																CB122	DD	ADA1/2
CB124	M	62	124				124	315	400	257		324			1.000	2.000		CB124	ID	ADA1/1
CB125	M	79	130	134	110	89	115,8	196	180	153	234	190,8		+	1.000	2.000	+	CB125	DD	ADA1/1
CB127	M	65	99	93	94	96	95,5	97	98	60	65	80			1.000	32.000	++++	CB127	DD	ADA1/1
CB129	M	53	143	163	129	112	136,8	138	165	97	91	122,8			2.000	8.000	+	CB129	ID	ADA1/2
CB130	M	63	94				94	127				127						CB130	ID	ADA1/1
CB131	M	77	126	124	97	127	118,5	110	139	92	111	113		+	1.000	2.000		CB131	ID	ADA1/2
CB133	M	52	91				91	272	654	304		410		+	4.000	3.000	+	CB133	DD	ADA1/1
CB134	M	60	83	74	63	53	68,25	216	170	98	249	183,3			1.000	2.000		CB134	II	ADA1/1
CB138	M	64						146	322	174	272	228,5		Traços	2.000	17.000	+	CB138	II	ADA1/1
CB140	M	62						33	84	51	57	56,25			1.000	2.000		CB140	DD	ADA1/1
CB141	M	78																CB141	II	ADA1/2
CB142	M	72						149	142	139	173	150,8		Traços	2.000	10.000		CB142	II	ADA1/1
CB144	M	55						92	244	217	246	199,8			4.000	5.000	+	CB144	ID	ADA1/1
CB145	M	70						465	224			344,5			1.000	3.000	+	CB145	ID	ADA1/1
CB146	M	81						114	67	67	79	81,75						CB146	II	ADA1/1
CB147	M	63	131	126	99	90	111,5	97	54	56	71	69,5	Traços		1.000	2.000		CB147	DD	ADA1/1
CB148	M	51						129	197	389	176	222,8			1.000	2.000		CB148	ID	ADA1/1
CB151	M	79																CB151	DD	ADA1/1
ECA2	M	64																ECA 2	DI	ADA1/1
ECA 5	M	65																ECA 5	II	ADA1/1
ECA 9	M	65																ECA 9	ID	ADA1/1
ECA 10	M	81																ECA 10	ID	ADA1/1
ECA 23	M	47																ECA 23	II	ADA1/1
ECA 30	M	60	82	141	134	117	118,5	105	121	78	219	130,8	Traços		1.000	2.000		ECA 30	DD	
ECA 40	M	63																ECA 40	DD	ADA1/1
ECA 59	M	70																ECA 59	ID	ADA1/1
ECA 68	M	48	97	110	84	91	95,5	107	102	80	48	84,25			1.000	2.000		ECA 68	ID	ADA1/1

Continuação

Cód	sexo	Idade	LDL			MEDIA	Triglicérides			MEDIA	Urinalise					ECA	ADA			
CB4	F	57															CB4	II	ADA1/1	
CB5	F	66																CB5	II	ADA1/1
CB6	F	54																CB6	ID	ADA1/1
CB7	F	50	122	131	168	145	92	81	100	73	86,5							CB7	ID	ADA1/1
CB8	F	63																CB8	DD	ADA1/1
CB9	F	81																CB9	DD	ADA1/1
CB10	F	62																CB10	II	ADA1/2
CB11	F	64																CB11	ID	ADA1/1
CB12	F	78																CB12	ID	ADA1/2
CB14	F	37	101			101	102				102							CB14	ID	ADA1/1
CB15	F	63																CB15	ID	ADA1/1
CB16	F	78																CB16	ID	ADA2/2
CB18	F	60	109	163	101	96	117,3	139	150	222	105	154						CB18	ID	ADA1/1
CB19	F	78	152	196	183	95	156,5	249	238	278	210	234,8						CB19	ID	ADA1/1
CB20	F	78																CB20	DD	ADA1/1
CB22	F	74	146	121	121	144	133	119	91	86	71	91,75						CB22	ID	ADA1/1
CB25	F	81						211	140	104	141	149						CB25	ID	ADA1/1
CB28	F	59																CB28	ID	ADA1/1
CB30	F	53						237	232	261	328	264,5						CB30	ID	ADA1/1
CB31	F	57						85	87	86	82	85						CB31	ID	ADA1/2
CB35	F	66						132	126	95	164	129,3						CB35	II	ADA1/1
CB36	F	56						139	132	81		118,3						CB36	II	ADA1/1
CB37	F	74						139	138	179		152						CB37	ID	ADA1/1
CB38	F	74						159	156	98	134	136,8						CB38	ID	ADA1/1
CB42	F	71						99				99						CB42	II	ADA1/1
CB44	F	73																CB44	DD	ADA1/1
CB47	F	43	112	105	85	101	100,8	65	100	119	83	91,75						CB47	ID	ADA1/1
CB48	F	50	112	138			125	229	200	199		209,3						CB48	ID	ADA1/1
CB51	F	83	172	199	121	141	158,3	127	156	112	136	132,8						CB51	ID	ADA1/1
CB54	F	54	171	159	117	137	146	347	232	250	205	258,5						CB54	ID	ADA1/1
CB55	F	70																CB55	ID	ADA1/1
CB57	F	48	125	95	105	122	111,8	141	61	130	61	98,25						CB57	ID	ADA1/1
CB59	F	56	156	146	111	118	132,8	178	210	192	157	184,3						CB59	DD	ADA1/1
CB61	F	80	114	129	140	140	130,8	121	71	134	99	106,3						CB61	DD	ADA1/1
CB62	F	69	182	178	191	185	184	219	213	228	202	215,5						CB62	ID	ADA1/1

Continuação

Cód	sexo	Idade	Glicose			Hb A1c	Creatinina			MÉDIA	Uréia			K+	Colesterol			MÉDIA	HDL			MÉDIA							
CB63	F	68	115	83	116	102	104	7	1,1	1	0,8	1,1	1	27	23	43	24	239	181	290	155	216,25	42	38	46	37	40,75		
CB64	F	65	197	134	137	206	168,5	6,5	0,6	0,7	0,7	1	0,75	31	26	36		232	205	210	194	210,25	64	60	57	56	59,25		
CB65	F	89	142	116	81		84,75	6,8	1	1,3		1,15						183	205	211		199,66	48	41			44,5		
CB66	F	74	138	131	134		134,3	6,4	0,9	1	1,2	1,03	70					229	223	209		220,33	42	45	55		47,33		
CB68	F	63	171	203	202	165	185,3	7	0,7	0,8	0,9	0,8	0,8	22	23			245	199	205	235	221							
CB69	F	72	246	193	133	120	173	7,3										230	219	186	194	207,25							
CB71	F	68	232	129	93	92	136,5	7,3	0,6	0,7	0,8	0,7	0,7				185	217	171	193	191,5	35	41	69	64	52,25			
CB72	F	85	137	174	123	54	122	7,4																					
CB74	F	66	260	237	209	247	238,3	7,1										297	187	198	175	214,25	30	40	48	37	38,75		
CB75	F	60	168	189	129	137	155,8	7,5										241	344	249	239	268,25	62	47	42		50,33		
CB76	F	73	107	123	106	98	108,5	7,5	0,8	0,8	0,9		0,833	36	29			182	146			164							
CB77	F	59	137	123	129	151	135	7										187	233	190	190	200	54	57	52	48	52,75		
CB80	F	65	120	103	141	116	120	6,9																					
CB82	F	60	114	138	121	112	121,25	7,1	0,7	0,9	0,9	0,9	0,85																
CB83	F	64	137	180	101	118	134	7	0,7	1,1	1	1	0,95	12	30	39	28												
CB84	F	53	198	85	127	338	187	7,3	0,6	0,8	1	0,8						185	170	166		173,66	58	57	59		58		
CB85	F	65	144	280	267	109	200	7,7	0,9	1,2	1,3	1,1	1,125					237	217	180	181	230,75	45	45	46	52	47		
CB86	F	47	270	106	126	210	178	6,9	0,9	1	0,9	0,93						209	213	208	184	203,5	38	54	34		42		
CB87	F	54	184	194	274	230	220,5	7,2	0,8	0,8	0,8	0,9	0,825	26	19	30	27												
CB91	F	56	158	213	138	275	196	7	1,1	1	0,8	0,9	0,95	35	32	47	31												
CB92	F	70	125	160	125	116	131,5	6,9										247	212	190	199	212	47	46	42		45		
CB93	F	69	112	120	109	103	111	7,2	0,7	0,8	1	1	0,875	50				200	208	219	210	209,25	43	64	45	48	50		
CB95	F	58	159	203	238	124	181	7,5	0,7	1,1	0,9	1,3	1					185	186	166	165	175,5	29	26	35	36	31,5		
CB100	F	65	130	120	146	124	130	7	1,2	1,5	1,2		1,3	50				178	274	196		216	41	51	43		45		
CB104	F	82	125	87			106	6,9	1,5	1,3			1,4	49				134	111			122,5	31	34			32,5		
CB105	F	74	164				164	7,2					4,3	##				158				158							
CB106	F	77	88	149	163	119	129,8	7	0,9	1,5	1,3	1,3	1,25	55	66	45	38					257							
CB107	F	59	139	134	212	80	141,3	7,2	0,7	0,8		0,7	11					330	169	284	215	249,5							
CB111	F	58	115	138	104	104	115,3	7	0,7	0,7	1	0,8	0,8	17	29	21													
CB112	F	73	95	152	148	91	121,5	6,9																					
CB114	F	72	98	94	114	77	95,75	7,1	0,7	1,4	1,1	1,4	1,15	51	54	45	49					222,25							
CB116	F	60	98	117	82	70	92,75	7,3	0,7	1,3	1,1	1,2	1,075	39	37	25	53					213,5	37	40	44	50	42,75		
CB119	F	72	170	155	313	185	205,8	6,7																					
CB120	F	73	95	99	136	115	111,3	7,4	1,2	0,9	1	1	1,025					263	225	283	248	254,75	56	67	45	51	54,75		

Continuação

Cód	sexo	Idade	LDL			MEDIA	Triglicérides			MEDIA	Urinalíse				ECA		ADA		
CB63	F	68	191	160	205	96	207	145	196	108	164	Glicose	Proteína traços	Hemácias 2.000	Leucócitos 10.000	Bacteriúria +	CB63	ID	ADA1/1
CB64	F	65	147	125	132	120	105	101	107	89	100,5	+		1.000	2.000	+++	CB64	ID	ADA1/1
CB65	F	89	132	145			96	123	125		114,7		+	1.000	2.000	++++	CB65	ID	ADA1/1
CB66	F	74	157	153	137		151	124	87		120,7		Traços	3.000	75.000	++	CB66	ID	ADA1/1
CB68	F	63					249	172	207	209	209,3			1.000	1.000	+	CB68	ID	ADA1/1
CB69	F	72					147	121	147	122	134,3			2.000	1.000	++	CB69	DD	ADA1/1
CB71	F	68	121	153	89	113	145	119	60	79	100,8			1.000	3.000	+	CB71	ID	ADA1/1
CB72	F	85															CB72	ID	ADA1/1
CB74	F	66	207	101	105	83	300	229	229	277	258,8						CB74	ID	
CB75	F	60	206	146	140		164	241	376	286	296,3						CB75	DD	ADA1/1
CB76	F	73					63	70			66,5			1.000	5.000	+	CB76	DD	ADA1/1
CB77	F	59	116	141	127	126	83	169	56	79	96,75						CB77	DD	ADA1/1
CB80	F	65															CB80	ID	ADA1/1
CB82	F	60	119	179	84		127,3	513	224	199	281			1.000	3.000	+	CB82	ID	ADA1/1
CB83	F	64	120	144	124	115	125,8	170	108	134	140			1.000	1.000	+	CB83	II	ADA1/1
CB84	F	53	98	96	69		87,67	143	85	189	139			1.000	1.000	+++	CB84	II	ADA1/1
CB85	F	65	141	119	104	106	117,5	316	233	150	203			5.000	80.000	+	CB85	DD	ADA1/1
CB86	F	47	104	106	75		95	599	356	238	391,5			5.000	8.000	++	CB86	ID	ADA1/1
CB87	F	54	92	94	79	72	84,25	385	256	338	342,3			1.000	2.000	+	CB87	DD	ADA1/1
CB91	F	56	247	208	200	190	211,3	248	208	240	248,5			1.000	2.000	+	CB91	II	ADA1/1
CB92	F	70	146	110	130		128,7	351	95	172	188						CB92	ID	ADA1/2
CB93	F	69	140	114	129	116	124,8	86	150	225	172,8			2.000	1.000	+	CB93	ID	ADA1/1
CB95	F	58	142	135	103	97	119,3	122	145	140	142			2.000	15.000	+	CB95	ID	ADA1/1
CB100	F	65	123	188	127		146	68	173	128	123			2.000	5.000	+	CB100	ID	ADA1/1
CB104	F	82	59	39			49	219	188		203,5			2.000	10.000	++++	CB104	II	ADA1/1
CB105	F	74					251				251			1.000	2.000		CB105	DD	ADA1/1
CB106	F	77					73	77	74	89	78,25			6.000	3.000		CB106	II	ADA1/2
CB107	F	59					528	102	150	68	212			3.000	25.000	++++	CB107	ID	ADA1/1
CB111	F	58	79	151	98	46	93,5	90	139	104	101,5			2.000	4.000	+	CB111	DD	ADA1/1
CB112	F	73															CB112	DD	ADA1/1
CB114	F	72					118	131	150	135	133,5			2.000	3.000	++	CB114	ID	ADA1/2
CB116	F	60	163	108	127	108	125,8	182	290	252	241,8			6.000	110.000	++++	CB116	ID	ADA1/2
CB119	F	72															CB119	DD	ADA1/1
CB120	F	73	179	173	161	168	170,3	172	115	97	132			2.000	4.000		CB120	ID	ADA1/2

Continuação

Cód	sexo	Idade	LDL			MEDIA	Triglicérides			MEDIA	Urinalíse					ECA	ADA							
CB123	F	56	130	131	181	89	132,8	282	336	291	210	279,8	+++					DD	ADA1/1					
CB126	F	53	109	108			108,5	132	203	257	174	191,5						2.000	6.000	Leucócitos	Bacteriúria	CB123	DD	ADA1/1
CB128	F	59	164	107	89	114	117	83	95	150	75	100,75,						2.000	11.000			CB126	DD	ADA1/1
CB132	F	67	145	101	127	127	125	176	170	143	219	177	+					4.000	12.000			CB128	ID	ADA1/1
CB135	F	66	177	173	123	127	150	144	143	87	137	127,8						5.000	260.000		++++	CB132	ID	ADA1/1
CB136	F	63																				CB135	DD	ADA1/1
CB137	F	37						229	118	107	201	163,8										CB136	ID	ADA1/2
CB139	F	60						142	121	84	140	121,8						2.000	14.000		++	CB137	ID	ADA1/1
CB143	F	61																				CB139	DD	ADA1/1
CB153	F	84	170	166	134	150	155	149	152	90	116	126,8						3.000	11.000		+++	CB143	ID	ADA1/1
CB154	F	75	188	156	89		108,3	370	309	232	81	207,5						1.000	2.000			CB153	DD	ADA1/1
CB156	F	44	87				87	313	339	336	215	300,8	++					2.000	Incontáveis		+++	CB154	DD	ADA1/1
CB157	F	68	136	37			86,5	125	202			163,5	+					1.000	3.000		+	CB156	ID	ADA1/1
CB158	F	71	114	132	113	112	117,8	113	78	94	98	95,75						1.000	3.000			CB157	DD	ADA1/1
ECA 3	F	72	261	108	190	121	170	131	160	103	92	121,5										CB158	DD	ADA1/1
ECA 4	F	54	88				88	238				238						1.000	2.000			ECA 3	II	ADA1/1
ECA 6	F	51																				ECA 4	ID	ADA1/1
ECA 8	F	59	186	163	170		173	135	113	127		93,75						1.000	2.000			ECA 6	ID	ADA1/1
ECA 17	F	63	148	174	171	130	155,8	125	226	197	293	210,3										ECA 8	II	ADA1/1
ECA 18	F	47	128	103	94		108,3	400	142	332	370	311						1.000	2.000		+	ECA 17	ID	ADA1/1
ECA 25	F	65																				ECA 18	II	ADA1/1
ECA 26	F	40	138	164	153		151,7	222	224	329	425	300										ECA 25	ID	ADA1/1
ECA 33	F	53	94				94	59	97			78	+					1.000	2.000			ECA 26	II	ADA1/1
ECA 39	F	44						188	155	172		171,7										ECA 33	II	ADA1/1
ECA 42	F	64																				ECA 39	DD	
ECA 50	F	61																				ECA 42	DD	ADA1/1
ECA 53	F	57																3.000	47.000		++	ECA 50	ID	ADA1/1
																		2.000	5.000		++	ECA 53	II	ADA1/1

APÊNDICE 2 - Planilha com dados demográficos e de testes laboratoriais de diagnósticos em diabéticos com elevado risco de doença cardiovascular.

Cód	sexo	Idade	Glicose (mg/%)		Hb A1c	Colesterol total		HDLc		Media	LDLc			Media	Triglicerídeos			Media	ECA	ADA										
CB3	M	45	372	358	277	255	316,8	8,5	254	257	261	202	244	28	34	36	57	33,8	157	141	170	61	132,3	199	273	422	382	II	ADA1	
CB17	M	56	107	107	174	108	124	7,1	241	256	166	258	230	85	65	64	67	70,3	211	117	50	162	135	275		275	ID	ADA1/2		
CB24	M	70	115	152	141	125	133,3	7,7	221	244	182	176	206	62	52	45	49	52	129	171	123	113	134	138	107	71	70	96,5	DD	ADA1/2
CB41	M	63	258	125	151	121	163,8	7,6	201	211			206	48	32			40	127	175			151	131	170		150,5	DD	ADA1	
CB45	M	67	130	249	150	197	181,5	7,4	172	163	156	146	159	39	40	36	33	37	111	105	107	102	106,3	109	89	64	56	79,5	ID	ADA1
CB46	M	57	239	197	130	164	182,5	7,3	196	238	206	208	212	45	49	31	49	43,5	116	159	141	134	137,5	177	148	170	127	155,5	ID	ADA1
CB50	M	78	113	138	107	103	115,3	7	177	165	164	186	173	34	35	33	30	33	104	98	96	120	104,5	193	160	173	180	176,5	ID	ADA1
CB52	M	73	280	121	81	88	142,5	7,8	241	157	203	178	195	47	54	56	38	48,8	141	75	118	117	112,8	265	142	144	114	166,3	II	ADA1
CB56	M	60	112	290	134		178,7	7,1	171	213	217		150	37	43			40	100	127			113,5	168	256	235		219,7	ID	ADA1
CB60	M	60	150	135	143		142,7	7,2	260	222	230		237	53	62	51		55,3	191	143	163		165,7	80	87	78		81,66	ID	ADA1
CB67	M	71	140	90	148	113	122,8	7,1	212	162	173	131	170	39	41	38	34	38	126	119	93	67	101,3	261	138	121	149	166,5	ID	ADA1
CB70	M	63	139	88	162	155	136	7,1	279	260	200	220	240											203	246	205	172	206,5	ID	ADA1
CB78	M	80	120	121	119	112	118	7,1	164	195	160	140	165	38	63	47	49	49,3	151	115	96	79	110,3	63	84	85	62	73,5	ID	ADA1
CB88	M	59	242	139	162	170	178,3	7,3	249	247	217	189	226	43	46	46	40	43,8	187	165	146	126	156	94	181	126	116	129,3	II	ADA1
CB89	M	76	83	206	150	94	133,3	7,2	169	202	196	154	180	62	47	40	40	47,3	131	112	126	92	115,3	139	214	150	112	153,8	ID	ADA1
CB99	M	45	599	715	438	320	518	7,3	286	296	154		245	45				45	75				75	308	244	171		241	ID	ADA1
CB101	M	73	163	104	106	293	166,5	6,9	202	259	185	279	231	39	57			48	133	134			133,5	149	72	136	530	221,8	DD	ADA1
CB110	M	73	151	150	180	122	150,8	7,5	215	230	195	196	209	45	44	39	47	43,8	142	171	139	130	145,5	138	78	82	93	97,75	DD	ADA1
CB118	M	64	200	256	234	257	236,8	7,1	165	143	144	136	147	45	45	51	52	48,3	82	72	57	54	66,25	188	128	179	148	160,8	II	ADA1
CB121	M	56	327	185	123	196	207,8	7,1	122	154			138	28	29			28,5	73	110			91,5	104	78		91	ID	ADA1	
CB124	M	62	117	128	128		124,3	7	200	180	207		196	32				32	124				124	315	400	257		324	ID	ADA1
CB125	M	79	179	191	205	111	171,5	7	213	215	194	184	202	44	45	54	48	47,8	130	134	110	89	115,8	196	180	153	234	190,8	DD	ADA1
CB129	M	53	330	195	165	103	198,3	7	223	230	196	188	209	40	34	47	58	44,8	143	163	129	112	136,8	138	165	97	91	122,8	ID	ADA1/2
CB131	M	77	150	183	126	118	144,3	6,8	196	203	165	191	189	48	51	50	42	47,8	126	124	97	127	118,5	110	139	92	111	113	ID	ADA1/2
CB133	M	52	116	208	130		151,3	7,4	211	222	184		206	32				32	91				91	272	654	304		410	DD	ADA1
CB134	M	60	140	95	85	124	111	6,9	179	151	120	138	147	53	43	37	35	42	83	74	63	53	68,25	216	170	98	249	183,3	II	ADA1
CB138	M	64	136	150	152	93	132,8	7	230	243	193	229	224											146	322	174	272	228,5	II	ADA1
CB144	M	55	88	114	151	102	113,8	6,8	286	275	198	192	238											92	244	217	246	199,8	ID	ADA1
CB145	M	70	104	152			128	6,3	244	157			201											465	224			344,5	ID	ADA1
CB147	M	63	224	212	134	171	185,3	6,5	187	159	145	141	158	38	42	35	37	38	131	126	99	90	111,5	97	54	56	71	69,5	DD	ADA1

Continuação

Cód	sexo	Idade	Glicose (mg/%)		Hb A1c	Colesterol total		Media	HDLc		Media	LDLc		Media	Triglicérides		Media	ECA	ADA											
CB148	M	51	165	97	218	84	141	7,6	262	161	153	153	182			129	197	389	176	222,8	ID	ADA1								
ECA30	M	60	174	209	274	114	192,8	6,9	144	204	187	195	183	41	39	37	34	37,8	82	141	134	117	118,5	105	121	78	219	130,8	DD	
CB7	F	50	118	130	104	109	115,3	6,3	193	178	229	204	201	53	31	41	44	42,3	122	131	168	145	141,5	92	81	100	73	86,5	ID	ADA1
CB18	F	60	88	106	80	66	85	6,9	196	230	200	165	198	59	37	54	48	49,5	109	163	101	96	117,3	139	150	222	105	154	ID	ADA1
CB19	F	78	83	130	125	96	108,5	7,3	259	305	285	187	259	57	61	46	50	53,5	152	196	183	95	156,5	249	238	278	210	234,8	ID	ADA1
CB22	F	74	156	198	120	163	159,3	7,7	242	214	225	242	231	72	75	87	84	79,5	146	121	121	144	133	119	91	86	71	91,75	ID	ADA1
CB30	F	53	148	129	119	139	133,8	7,2	252	242	247	232	243											237	232	261	328	264,5	ID	ADA1
CB38	F	74	154	114	107	112	121,8	7,5	289	235	192	206	231											159	156	98	134	136,8	ID	ADA1
CB48	F	50	94	270	223	137	181	7	178	204	217		200	52	39			45,5	112	138				125	229	200	199	209,3	ID	ADA1
CB51	F	83	111	103	93	97	101	6,9	265	217	191	208	220	40	41	47	40	42	172	199	121	141	158,3	127	156	112	136	132,8	ID	ADA1
CB54	F	54	132	115	106	101	113,5	7,2	262	174	209	212	214	29	34	42	34	34,8	171	159	117	137	146	347	232	250	205	258,5	ID	ADA1
CB57	F	48	177	168	185	146	169	7	217	159	184	194	189	64	52	53	60	57,3	125	95	105	122	111,8	141	61	130	61	98,25	ID	ADA1
CB59	F	56	182	76	106	142	126,5	6,6	253	239	204	205	225	61	51	55	56	55,8	156	146	111	118	132,8	178	210	192	157	184,3	DD	ADA1
CB61	F	80	195	187	115	220	179,3	6,9	204	214	183	207	202	51	60	60	47	54,5	114	129	140	140	130,8	121	71	134	99	106,3	DD	ADA1
CB62	F	69	214	200	250	241	226,3	6,9	289	268	277	266	275	41	47	40	41	42,3	182	178	191	185	184	219	213	228	202	215,5	ID	ADA1
CB63	F	68	115	83	116	102	104	7	239	181	290	155	216	42	38	46	37	40,8	191	160	205	96	163	207	145	196	108	164	ID	ADA1
CB64	F	65	197	134	137	206	168,5	6,5	232	205	210	194	210	64	60	57	56	59,3	147	125	132	120	131	105	101	107	89	100,5	ID	ADA1
CB65	F	89	142	116	81		84,75	6,8	183	205	211		200	48	41			44,5	132	145			138,5	96	123	125		114,7	ID	ADA1
CB66	F	74	138	131	134		134,3	6,4	229	223	209		220	42	45	55		47,3	157	153	137		149	151	124	87		120,7	ID	ADA1
CB68	F	63	171	203	202	165	185,3	7	245	199	205	235	221											249	172	207	209	209,3	ID	ADA1
CB74	F	66	260	237	209	247	238,3	7,1	297	187	198	175	214	30	40	48	37	38,8	207	101	105	83	124	300	229	229	277	258,8	ID	
CB75	F	60	168	189	129	137	155,8	7,5	241	344	249	239	268	62	47	42		50,3	206	146	140		164	241	376	282	286	296,3	DD	ADA1
CB82	F	60	114	138	121	112	121,25	7,1	283	205	259	161	227	41	41	39		40,3	119	179	84		127,3	513	224	199	188	281	ID	ADA1
CB83	F	64	137	180	101	118	134	7	184	202	185	179	188	58	37	34	34	40,8	120	144	124	115	125,8	170	108	134	148	140	II	ADA1
CB85	F	65	144	280	267	109	200	7,7	237	217	180	181	231	45	45	46	52	47	141	119	104	106	117,5	316	233	150	113	203	DD	ADA1
CB86	F	47	270	106	126	210	178	6,9	209	213	208	184	204	38	54	34		42	104	106	75		95	599	356	238	373	391,5	ID	ADA1
CB87	F	54	184	194	274	230	220,5	7,2	231	189	182	192	199	36	61	35	42	43,5	92	94	79	72	84,25	385	256	338	390	342,3	DD	ADA1
CB91	F	56	158	213	138	275	196	7	280	277	295	283	284	40	53	47	41	45,3	247	208	200	190	211,3	248	208	240	298	248,5	II	ADA1
CB92	F	70	125	160	125	116	131,5	6,9	247	212	190	199	212	47	46	42		45	146	110	130		128,7	351	95	172	134	188	ID	ADA1/2
CB93	F	69	112	120	109	103	111	7,2	200	208	219	210	209	43	64	45	48	50	140	114	129	116	124,8	86	150	225	230	172,8	ID	ADA1
CB95	F	58	159	203	238	124	181	7,5	185	186	166	165	176	29	26	35	36	31,5	142	135	103	97	119,3	122	145	140	161	142	ID	ADA1
CB100	F	65	130	120	146	124	130	7	178	274	196		216	41	51	43		45	123	188	127		146	68	173	128		123	ID	ADA1
CB104	F	82	125	87			106	6,9	134	111			123	31	34			32,5	59	39			49	219	188			203,5	II	ADA1
CB116	F	60	98	117	82	70	92,75	7,3	220	206	221	207	214	37	40	44	50	42,8	163	108	127	108	125,8	182	290	252	243	241,8	ID	ADA1/2
CB120	F	73	95	99	136	115	111,3	7,4	263	225	283	248	255	56	67	45	51	54,8	179	173	161	168	170,3	172	115	97	144	132	ID	ADA1/2
CB123	F	56	212	354	343	337	311,5	6,8	277	295	283	184	260	44	44	44	53	46,3	130	131	181	89	132,8	282	336	291	210	279,8	DD	ADA1

Continuação

Cód	sexo	Idade	Glicose (mg/%)		Hb A1c	Colesterol total		Media	HDLc		Media	LDLc		Media	Triglicerídeos		Media	ECA	ADA											
CB126	F	53	109	146	137	141	133,3	7,6	199	247	199	201	212	39	58			108,5	132	203	257	174	191,5	DD	ADA1					
CB128	F	59	178	133	155	100	141,5	7,3	226	190	178	182	194	45	64	65	53	56,8	164	107	89	114	117	83	95	150	75	100,75	ID	ADA1
CB132	F	67	219	146	166	248	194,8	7,3	245	192	200	223	215	64	57	45	52	54,5	145	101	127	127	125	176	170	143	219	177	ID	ADA1
CB135	F	66	149	78	117	95	109,8	7,2	260	179	195	193	207	47	58	54	39	49,5	177	173	123	127	150	144	143	87	137	127,8	DD	ADA1
CB153	F	84	99	122	68	82	92,75	6,4	260	240	175	223	225	60	44	43	50	49,3	170	166	134	150	155	149	152	90	116	126,8	DD	ADA1
CB154	F	75	180	157	107	69	128,3	6,2	330	314	253	147	261	64	51	42		52,3	188	156	89		108,3	370	309	232	81	207,5	DD	ADA1
CB156	F	44	219	276	347	272	278,5	7,3	198	193	245	168	201	38				38	87				87	313	339	336	215	300,8	ID	ADA1
CB158	F	71	176	142	106	104	132	7	188	194	181	180	186	51	45	49	48	48,3	114	132	113	112	117,8	113	78	94	98	95,75	DD	ADA1
ECA 3	F	72	121	125	92	85	105,8	7,3	339	193	260	188	245	52	53	49	49	50,8	261	108	190	121	170	131	160	103	92	121,5	II	ADA1
ECA4	F	54	259	164			211,5	6,9	167				167	31				31	88				88	238				238	ID	ADA1
ECA 8	F	59	86	147	111	100	111	7,5	255	226	238		240	42	40	43		41,7	186	163	170		173	135	113	127		93,75	II	ADA1
ECA 17	F	63	357	254	67	129	201,8	6,4	233	304	269	246	263	66	65	59	57	61,8	148	174	171	130	155,8	125	226	197	293	210,3	ID	ADA1
ECA 18	F	47	273	208	220	99	200	6,1	223	213	211	203	213	57	42	35		44,7	128	103	94		108,3	400	142	332	370	311	II	ADA1
ECA 26	F	40	147	131	135	329	185,5	7	247	209	253	215	231	30	39	34		34,3	138	164	153		151,7	222	224	329	425	300	II	ADA1
ECA 39	F	44	100	134	109	164	126,8	7,1	157	137	154	149	149											188	155	172		171,7	DD	DD

APÊNDICE 3 – Protocolos de Extração do DNA (PENA et al. 1991)

Princípio:

Técnica utilizada para extrair DNA genômico a partir de sangue total. Os tampões de lise rompem os eritrócito e glóbulos brancos. O fenol é utilizado para a remoção de proteínas e enzimas contaminantes. O DNA é precipitado com etanol.

Reagentes:

1. Solução de lise 1 para extração de sangue (tampão utilizado na lise de células vermelhas)

- Sacarose 0,32M	10,95 g
- Tris HCl 10mM	1 mL
- MgCl ₂ 5mM	0,5 mL
- Triton 1% 100x	1 mL
- Água mili-Q autoclavada q.s.p.	100 mL

2. Solução de lise 2 para extração de sangue (tampão utilizado na lise de células brancas)

- 0,075 M de NaCl	2,19 g
- 0,02 M de EDTA	20 mL
- Água mili-Q q. s. p.	500 mL

3. Proteinase K (20 mg/mL)

- Proteinase K	20 mg
- Água mili-Q q.s.p.	1 mL

Conservar em freezer.

4. Fenol

5. Clorofórmio: álcool isoamílico (24:1)

6. Etanol 70%

7. KCl 2M

Procedimentos:

Colocar 300ul a 1mL de sangue periférico, colhido com EDTA, em um tubo tipo eppendorf e completar o volume para 1,5 mL com solução de lise 1 e homogeneizar;

Centrifugar por 5 minutos a 6500 rpm;

Descarta o sobrenadante deixando aproximadamente 300 uL de pellet;

Completar para 1mL com solução de lise 1, homogeneizar até desfazer o pellet e deixar descansar por 10-15 minutos;

Centrifugar por 5 minutos a 6500 rpm;

Descartar o sobrenadante;

Repetir as etapas 4, 5 e 6;

Acrescentar ao pellet 450 uL de solução de lise 2, ressuspender e adicionar 25 uL de SDS a 10% e 5 uL de Proteinase K (20mg/mL) e homogeneizar;

Incubar em banho-maria a 37°C overnight ou 42°C por 3 horas;

Adicionar 500uL de fenol e homogeneizar;

Centrifugar por 5 minutos a 7000 rpm;

Transferir a fase superior para outro tubo e adicionar 500uL de clorofórmio-álcool isoamílico 24:1;

Homogeneizar e centrifugar por 5 minutos a 7000 rpm;

Repetir as etapas 12 e 13;

Colocar eppendorfs limpos em gelo, adicionar 50uL de KCl;

Transferir o sobrenadante para este tubo e adicionar 500uL de etanol 100% (bem gelado). Inverter o tubo vagarosamente várias vezes para precipitar o DNA.

Centrifugar aproximadamente 30 segundos a 13000 – 15000 rpm;

Desprezar o sobrenadante e lavar o DNA que ficou aderido à parede do tubo com 200uL de etanol 70% (gelado) e centrifugar aproximadamente 30 segundos a 13000-15000 rpm;

Desprezar delicadamente o sobrenadante e deixar secar por 15 minutos;

re-hidratar o DNA com 20-100 uL de TE (tris-EDTA) ou água miliQ, deixando overnight à temperatura ambiente (no escuro) ou em banho-maria a 37°C, para total solubilização da amostra; Estocar a -20°C.

APÊNDICE 4 - Análise do Polimorfismo I/D do gene da ECA.*Primers:*

Senso: ECA1: 5' CTGGAGACCACTCCCATCCTTTCT 3'

Anti-senso: ECA 2: 5' GATGTGGCCATCACATTCGTCAGAT 3'

*Primeira PCR***Mix 1X**

H₂O.....14,7uL

Tampão(10X)..... 2,5uL

MgCl₂ (50mM).....1,5uL

DNTP (1,25mM)..... 2,5uL

ECA1 (10uM).....0,5uL

ECA 2 (10uM).....0,5uL

Taq (1U).....0,8uL

DNA genômico.....2,0uL

Ciclo:

95°C	5 min	1x
95°C	30 seg	} 35x
58°C	30 seg	
72°C	60 seg	
72°C	5 min	1x
4°C	∞	

- ✓ Após a amplificação, correr as amostras em gel de agarose a 1,5%, 90volts por 25 minutos.
- ✓ Nessa eletroforese pode-se verificar três genótipos: II, ID e DD, conforme ilustrado abaixo. O fragmento I apresenta 490pb e o fragmento D 190pb.

Produtos de PCR: Genótipos possíveis



Existe uma preferência pela amplificação do alelo I na primeira PCR, portanto, para confirmar o genótipo DD, as amostras que apresentaram essa característica deverão ser amplificadas novamente de acordo com o protocolo abaixo.

*Segunda PCR***Primers:**

Senso: ECA3: 5' TGG GAC CAC AGC GCC CGC CAC TAC 3'

Anti-senso: ECA4: 5' TCG CCA GCC CTC CCA TGC CCA TAA 3'

Mix 1X

H₂O.....15,34uL

Tampão(10X).....2,5uL

MgCl₂ (50mM).....1,5uL

DNTP (1,25mM).....2,5uL

ECA3 (10uM).....0,5uL

ECA 4(10uM).....0,5uL

Taq (1U).....0,8uL


DNA genômico (100ng/μL)..2,0uL

Ciclo:

95°C	5 min	1x
95°C	30 seg	} 35x
66°C	30 seg	
72°C	60 seg	
72°C	5 min	1x
4°C	∞	

- ✓ Após a amplificação, correr as amostras em gel de agarose a 1,5%, 90volts por 25 minutos.
- ✓ O fragmento I apresenta 335pb e o fragmento D não é amplificado.

Produtos de PCR: Genótipos possíveis

II	ID	DD
		 335pb
		

APÊNDICE 5 - Análise do polimorfismo *TaqI* do gene da *ADA*.

Devido ao elevado número de GC no fragmento a ser amplificado, deve-se realizar PCR HotStart para a obtenção de um resultado adequado. Pode-se utilizar também uma DNA polimerase específica para HotStart evitando assim, a abertura no termociclador após os 15 minutos iniciais da desnaturação. No caso das DNA polimerases comuns, após o período inicial de desnaturação (15 minutos a 94°C), deve-se abrir o termociclador para colocar a enzima e após esse procedimento, prosseguir com a reação normalmente.

Primers:

Senso: ADA 1: 5' GCCCGGCCCGTTAAGAAGAGC 3'

Anti-senso: ADA 2: 5' GGTCAAGTCAGGGGCAGAAGCAGA 3'

Mix 1X

H ₂ O	9,65uL
Tampão(10X)	2,5uL
MgCl ₂ (50mM)	0,75uL
DMSO puro	2,10uL
β-mercaptoetanol(200mM)	1,00uL
DNTP (1,25mM)	4,0uL
ADA1 (5uM)	1,0uL
ADA 2 (5uM)	1,0uL
Taq (1U)	1,0uL
DNA genômico	2,0uL

Fazer o Mix para o determinado número de amostras sem adicionar a DNA polimerase. Adicionar o DNA ao mix e levar para o termociclador. Após o primeiro ciclo de 94°C por 15 minutos, abrir o termociclador e em cada amostra adicionar 1uL da enzima. Homogeneizar bem as amostras, fechar o termociclador e continuar o restante do ciclo.

Importante: para que a reação ocorra com sucesso o DNA genômico deverá estar em concentração maior ou igual a 100 ng/ul e com pureza de 1,8 a 1,9.

Ciclo:

94°C	15 min	1x
94°C	40 seg	} 36x
68°C	80 seg	
72°C	80 seg	
72°C	8 min	1x
4°C	∞	

- ✓ Após a amplificação, correr as amostras em gel de agarose a 1,5%, 90volts por 25 minutos.
- ✓ O fragmento amplificado deverá ter 397pb.

Digestão:

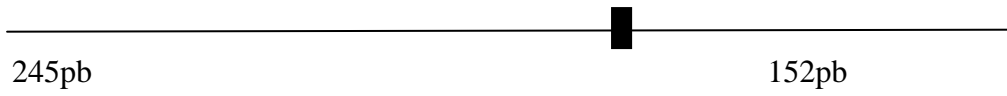
H ₂ O	9,25uL
Tampão	2,00uL
Taq I	0,25 uL
Produto de PCR	8,5uL

- ✓ Levar ao banho-maria a 65°C por 3 horas.
- ✓ Correr o produto da Digestão em gel de agarose de 1,5%, por 25 minutos a 90 volts.

Esquema de digestão do produto de PCR e análises dos fragmentos no gel.

A mutação ocorre pela substituição de uma guanina por uma adenina no nucleotídeo (G22A) elimina um sítio de restrição da Enzima *Taq I* (TCGA), assim, após a digestão, o alelo normal (ADA1) gera 2 fragmentos de 245pb e 152 pb e o alelo mutante (ADA2) gera apenas um fragmento de 397pb.

Esquema do produto de PCR (397pb) com sítios de restrição indicados pelas barras:



Produtos de PCR: Genótipos possíveis

ADA1/1	ADA 1/2	ADA2/2	
	■	■	397pb
■	■		245pb
■	■		152pb

RESUMO e ABSTRACT

RESUMO

O diabetes melito (DM) é um grupo heterogêneo de alterações metabólicas, caracterizado por hiperglicemia crônica, com alterações do metabolismo de carboidratos, ácidos graxos e proteínas. O diabetes melito tipo 2 (DMT2) é a forma mais comum dessa doença, acometendo aproximadamente 90% dos indivíduos que apresentam DM. Caracteriza-se principalmente por modificações da ação e secreção de insulina, embora sua etiologia, genética e fisiopatologia específicas ainda não estejam completamente determinadas. Os pacientes com DMT2 apresentam maior risco de desenvolvimento de complicações macro e microvasculares. Estudos revelaram que a enzima conversora de angiotensina (ECA) e a adenosina deaminase (ADA) podem estar relacionadas ao desenvolvimento de DMT2 ou de suas complicações. Com base nesses dados, foram estudados os polimorfismos *I/D* do gene *ECA* e *TaqI* do gene *ADA* em 162 indivíduos com DMT2, e 160 indivíduos saudáveis. Segundo a Associação Americana de Diabetes, os indivíduos diabéticos que apresentam HDLc abaixo de 40mg/dl ou LDLc acima de 100 mg/dl ou triglicerídeos acima de 150 mg/dl apresentam maior risco de desenvolvimento de doenças cardiovasculares. Por isso, foram selecionados 81 indivíduos com essas características para compor o grupo de estudo de pacientes diabéticos com “risco de doença cardiovascular”. Os polimorfismos foram avaliados por PCR e PCR-RFLP para os genes da ECA e ADA respectivamente. As frequências obtidas para o polimorfismo do gene *ECA* foram: pacientes diabéticos: *I/I* (19,1%); *I/D* (52,5%); *D/D* (28,4%); grupo controle *I/I* (12,5%); *I/D* (55,6%); *D/D* (31,9%) e grupo de diabéticos com riscos de doença cardiovascular *I/I* (16%); *I/D* (59,3%); *D/D* (24,7%). E para o gene *ADA*: em pacientes diabéticos *ADA*1/*1* (89,31%); *ADA*1/*2* (10,06%); *ADA*2/*2* (0,63%); grupo controle *ADA*1/*1* (91,25%); *ADA*1/*2* (7,50%); *ADA*2/*2* (1,25%); pacientes com risco cardiovascular *ADA*1/*1* (91,20%); *ADA*1/*2* (7,50%); *ADA*2/*2* (0,0%). Não foram verificadas diferenças estatisticamente significantes em nenhum dos grupos e genes analisados, embora as frequências genotípicas e alélicas estejam semelhantes à outros estudos realizados em diferentes populações, principalmente aquelas que participaram da formação da população brasileira. Nossos resultados corroboram autores que não encontraram, em populações miscigenadas, correlação entre o polimorfismo *I/D* do gene *ECA* e o DMT2, e doenças cardiovasculares. Em relação ao polimorfismo *TaqI* do gene *ADA*, existem

relatos de que a atividade dessa enzima apresenta-se elevada em pacientes com DM, mas não se sabe ao certo quais os mecanismos envolvidos nesse processo. Mesmo não sendo encontrada uma relação entre tais polimorfismos e o DM2, acreditamos serem necessários maiores estudos sobre os mesmos na população brasileira, assim como o estudo dos haplótipos do gene *ECA* e correlações entre as atividades dessas enzimas e seus polimorfismos genéticos em pacientes doentes e indivíduos saudáveis da população brasileira.

Palavras-chave: diabetes melito tipo 2, enzima conversora de angiotensina, adenosina deaminase, risco cardiovascular, polimorfismos genéticos.

ABSTRACT

Diabetes mellitus (DM) is a heterogeneous group of metabolic disorders characterized by chronic hyperglycemia, with changes in the carbohydrates, fatty acids and proteins metabolism. Diabetes mellitus type 2 (DMT2) is the most common form of this disease, that affect approximately 90% of people who have DM. It is characterized mainly by changes in the action and insulin secretion, although the etiology, genetics and specific pathophysiology of the disease is not yet completely determined. DMT2 patients have a higher risk of developing macro and microvascular complications. Studies have shown that angiotensin-converting enzyme (ACE) and adenosine deaminase (ADA) may be related to the development of DMT2 or its complications. Based on these data, we studied the polymorphisms I / D of the *ACE* gene and the polymorphism *TaqI* in the *ADA* gene, in 162 patients with DMT2, and 160 blood donors. According to the American Diabetes Association, people with diabetes who have HDL-C below 40 mg / dL or LDL-C above 100 mg / dl or triglycerides above 150 mg / dl are at increased risk of developing cardiovascular disease. Therefore, we selected 81 individuals with these characteristics to compose the study group of diabetic patients named "risk of cardiovascular disease ". The polymorphisms are evaluated by PCR for *ACE* gene and PCR-RFLP for the *ADA* Gene. The frequencies obtained for the *ACE* gene polymorphism were: diabetic patients: I / I (19.1%), I / D (52.5%) and D / D (28.4%), control group: I / I (12.5%) I / D (55.6%) and D / D (31.9%) and group of patients with cardiovascular disease risk: I / I (16%) I / D (59.3%), D / D (24.7%). And for the *ADA* gene polymorphism: in diabetic patients: ADA * 1 / * 1 (89.31%); ADA * 1 / * 2 (10.06%), ADA * 2 / * 2 (0.63%); control group: ADA * 1 / * 1 (91.25%); ADA * 1 / * 2 (7.50%); ADA * 2 / * 2 (1.25%), and patients with cardiovascular risk: ADA * 1 / * 1 (91.20%); ADA * 1 / * 2 (7.50%); ADA * 2 / * 2 (0.0%). There were no significant differences in any of the groups and genes analyzed, although the genotypic and allelic frequencies are similar to other studies in different populations, especially those one who participated in the Brazilian population formation. Our results support other authors results that found, in admixed populations, are no correlation between I / D polymorphism of *ACE* gene and DMT2, and cardiovascular diseases. For the *TaqI* polymorphism of the *ADA* gene, there are reports that the enzyme activity was elevated in patients with DM, but the authors are not sure about what are the real mechanisms involved in this process. Although not found a relationship between these polymorphisms and DMT2, we believe that further studies are needed in the Brazilian

population, as well as the study of haplotypes of the *ACE* gene and correlations between activities of these enzymes and their genetic polymorphisms in DMT2 patients and healthy subjects of the Brazilian population.

Keywords: diabetes mellitus type 2, angiotensin-converting enzyme, adenosine deaminase, cardiovascular risk, genetic polymorphisms.

Autorizo a reprodução xerográfica para fins de pesquisa.

São José do Rio Preto, 18 de Fevereiro de 2010.

Ana Carolina Bonini Domingos