



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

LUCIANE CELESTE LAZARI BERBEL

**INFLUÊNCIA DA VARIAÇÃO GENOTÍPICA GLU354GLN DO
RECEPTOR PARA O GIP SOBRE A HOMEOSTASE
GLICÊMICA E A SENSIBILIDADE INSULÍNICA EM
INDIVÍDUOS SADIOS**

Londrina
2014

LUCIANE CELESTE LAZARI BERBEL

**INFLUÊNCIA DA VARIAÇÃO GENOTÍPICA GLU354GLN DO
RECEPTOR PARA O GIP SOBRE A HOMEOSTASE
GLICÊMICA E A SENSIBILIDADE INSULÍNICA EM
INDIVÍDUOS SADIOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciências da Saúde do Centro de Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Londrina, como requisito para obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Tânia Longo Mazzuco.
Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Marla K. Amarante.

Londrina
2014

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da
Universidade Estadual de Londrina**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

484i Berbel, Luciane Celeste Lazari.

Influência da variação genotípica Glu354Gln do receptor para o GIP sobre a homeostase glicêmica e a sensibilidade insulínica em indivíduos saudáveis / Luciane Celeste Lazari Berbel. – Londrina, 2014.

63 f. il.

Orientador: Tânia Longo Mazzuco.

Coorientador: Marla Karine Amarante.

Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, 2014.

Inclui bibliografia.

1. Glicose – Metabolismo – Teses. 2. Homeostase – Teses. 3. Insulina – Receptores – Teses. 4. Polimorfismo (Genética) – Teses. I. Mazzuco, Tânia Longo. II. Amarante, Marla Karine. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. IV. Título.

CDU 612.349.8

LUCIANE CELESTE LAZARI BERBEL

**INFLUÊNCIA DA VARIAÇÃO GENOTÍPICA GLU354GLN DO
RECEPTOR PARA O GIP SOBRE A HOMEOSTASE GLICÊMICA E A
SENSIBILIDADE INSULÍNICA EM INDIVÍDUOS SADIOS**

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Tânia Longo Mazzuco
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dr. Alexandre José Faria Carrilho
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dr. Guilherme Figueiredo Marquzine
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 13 de fevereiro de 2014

AGRADECIMENTOS

Escrever uma dissertação de mestrado foi uma experiência de plena superação. Nesse tempo mudei de cidade, engravidei e tive minha linda filha, Isabela. Essa tarefa que parecia interminável, só foi realizada graças à ajuda de todos que comigo compartilharam esses momentos, e a essas pessoas gostaria de oferecer meus sinceros agradecimentos:

A Deus, por me conceder sabedoria na escolha dos melhores caminhos, coragem para acreditar, força para não desistir e proteção para me amparar.

Aos meus pais José e Geni, que sempre primaram pela minha educação e me ensinaram com muito amor a construir meus valores de vida. Exemplos de honestidade, humildade, dedicação, perseverança e bom coração.

Ao meu marido Rodrigo, por me incentivar todos os dias e não me deixar desistir, parceiro nas horas boas e nas difíceis, companheiro nos estudos e nas trocas de fraldas. Obrigada por ser integralmente presente em minha vida, amo você.

À minha filha Isabela, que me impulsiona a buscar ser sempre uma pessoa melhor, amor incondicional da minha vida, que veio encher de graça meus dias.

Aos meus irmãos Beto, Marcelo e Alexandre, minha tia Olímpia e toda minha família, pelo carinho, suporte, apoio, confiança e motivação que me nortearam em direção às vitórias dos meus desafios.

À querida prof^a. Dr^a. Tânia pelos ensinamentos, incentivo, amizade, dedicação e primorosa orientação. Por ser um exemplo de pesquisadora, médica e mãe que sempre fará parte da minha vida.

Ao longo dos anos tive outros professores que marcaram essa caminhada, aqui gostaria, em especial, de prestar minha homenagem aos professores Pedro Alejandro Gordan, Maria Leocádia de Oliveira e Waldir Eduardo Garcia (*in memoriam*), saibam que levo em mim um pedacinho de vocês.

A todos os professores, colegas de mestrado e amigos do grupo de pesquisa, especialmente prof^a. Dr^a. Marla, Jefferson, Natasha, Daniela, Camila e Alexandre, pela ajuda essencial, sem vocês não teria conseguido terminar este trabalho.

Aos participantes da banca, Dr. Guilherme Marquezine e Dr. Alexandre Carrilho, saibam que vocês participaram ativamente da minha formação como endocrinologista, são meus exemplos de bom médico.

Aos suplentes da banca pela disponibilidade.

A todos os voluntários indispensáveis para a realização desse projeto.

Agradecer a todos que ajudaram a construir esta dissertação não é tarefa fácil. Então, a todos, que de uma forma ou de outra, contribuíram para a realização deste trabalho, gostaria de expressar minha profunda gratidão.

“A educação é a arma mais poderosa que você pode usar para mudar o mundo.”

Nelson mandela

LAZARI-BERBEL, Luciane Celeste. **Influência da variação genotípica Glu354Gln do receptor para o GIP sobre a homeostase glicêmica e a sensibilidade insulínica em indivíduos saudáveis.** 2014. 63 f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR, 2014.

RESUMO

A possível variabilidade na resposta fisiológica hormonal após a alimentação, relacionada à elevação do GIP pós-prandial entre indivíduos, despertou o interesse para avaliar a influência do polimorfismo no gene para o receptor do polipeptídeo insulínico dependente de glicose (GIPR) na homeostase glicêmica e na função da célula beta pancreática. Foram estudados 25 adultos (12 mulheres, 13 homens) com IMC<30 e sem doenças relacionadas à síndrome metabólica. Foram coletadas amostras de sangue nos tempos basal (T0) e após refeição contendo 58g de carboidratos e 28g de lipídeos a cada 30 minutos até o T150, para dosagem de insulinemia e glicemia. Foi realizada pesquisa da variante Glu354Gln para o GIPR (SNP-*GIPR*, rs1800437) em amostra de sangue periférico pela técnica de PCR-RFLP. Foi avaliada a homeostase glicêmica de jejum e pós-prandial através dos cálculos de HOMA-IR, HOMA-B, área sob a curva (AUC) de insulina e glicemia e sua razão (AUCi/AUCg), índice insulínico (IGI) em cada tempo relativo ao basal e razão IGI/HOMA-IR. Na curva pós-prandial, 72% dos indivíduos apresentaram picos de glicose e 64% de insulina até o T60, com média de 107 mg/dl e 42,1 UI/mL, respectivamente. A pesquisa do SNP-*GIPR* revelou alelo C presente (C+, polimórfico) em 7 indivíduos, com 72% dos genótipos GG, 24% GC e 4% CC. Houve diferença significativa entre C+ e o grupo com alelo C ausente (C-) em relação ao HOMA-B (100+/-26 vs 160+/-189%, respectivamente; p=0,04). Não houve diferença estatisticamente significativa quanto aos seguintes parâmetros: AUCg, AUCi, HOMA-IR, IGI e razões AUCi/AUCg e IGI/HOMA-IR. Porém, em todos os tempos, o IGI foi superior no grupo C+ (T30, 189%; T60, 147%; T90, 1066%; T120, 29% e T150, 93%), enquanto que uma tendência semelhante ocorreu para a razão IGI/HOMA-IR exceto no T150. O indivíduo portador do SNP-*GIPR* em homozigose (CC) apresentou resposta precoce de insulina. Além disso, 42,9% dos indivíduos C+ apresentaram história familiar de diabetes em comparação com 22,2% do grupo C- (p=0,29). Em conclusão, estudamos o perfil de glicemia e insulina de jejum e na curva pós-prandial incluindo 1ª e 2ª fases de secreção insulínica de uma amostra de indivíduos saudáveis com distribuição genotípica do SNP-*GIPR* semelhante à população reportada na literatura. Indivíduos euglicêmicos C+ e C- apresentaram semelhanças em diversos dos parâmetros utilizados para avaliar a função da célula beta pancreática e resistência insulínica. Por outro lado, foi encontrada variação no HOMA-B entre os genótipos estudados, sugerindo redução na função da célula beta relacionada ao polimorfismo do *GIPR*, sem alteração na sensibilidade à insulina. A redução do HOMA-B em indivíduos saudáveis, independente do histórico familiar de diabetes, sugere aprofundar o estudo deste SNP-*GIPR* como possível marcador precoce para o risco de falência pancreática associada ao diabetes tipo 2.

Palavras-chave: homeostase glicêmica. sensibilidade insulínica. receptor do polipeptídeo insulínico dependente de glicose. polimorfismo.

Apoio financeiro: *Fundação Araucária-PR/SESA-PR/MS-Decit/CNPq (Edital PPSUS).*

LAZARI-BERBEL, Luciane Celeste. **Influence of the genotypic variant Glu354Gln of GIP receptor on glucose homeostasis and insulin sensitivity in healthy individuals.** 2014. 63 p. Dissertation (Master's Degree Dissertation) – State University of Londrina, PR, 2014.

ABSTRACT

The potential variability in hormonal physiological response after feeding, related to the elevation of postprandial GIP between individuals, arouse interest to evaluate the influence of polymorphisms in the gene for glucose-dependent insulinotropic polypeptide receptor (GIPR) in glucose homeostasis and in pancreatic beta cell function. Altogether 25 adults (12 women, 13 men) with BMI <30 and without metabolic syndrome related diseases were studied. After diet containing 58g of carbohydrates and 28g of lipids, blood samples at baseline (T0) and every 30 minutes until the T150 were collected for measurement of insulin and glucose. The polymorphic GIPR variant Glu354Gln, rs1800437 (SNP-*GIPR*) was studied in peripheral blood sample through PCR-RFLP. Glucose homeostasis in fasting and postprandial was assessed by calculating HOMA-IR, HOMA-B, area under the curve (AUC) of insulin and glucose, AUC_i/AUC_g ratio, insulinogenic index (IGI) at each time relative to baseline and IGI/HOMA-IR ratio. In the postprandial curve, 72% of subjects showed glucose peaks and 64% insulin until the T60, with mean of 107 mg/dl and 42.1 IU/mL, respectively. The SNP-*GIPR* study revealed presence of C allele (C+) in 7 individuals, with 72% of the genotypes GG, 24% GC and 4%CC. There was a significant difference between C + or the group without C allele (C-) in HOMA-B (100 +/- 26 vs. 160 +/- 89 % respectively; p = 0.04). There was no significant difference in the following parameters: AUC_g, AUC_i, HOMA-IR, IGI, AUC_i/AUC_g and IGI/HOMA-IR. However, the IGI was higher in the C+ allele group at all time-points (T30, 189%; T60, 147%; T90, 1066%; T120, 29% and T150, 93%), while a similar trend occurred for the IGI/HOMA-R ratio, except in T150. Furthermore, family history of diabetes was positive in 42.9% of C+ subjects, compared with 22.2% from C- group (p = 0.29). In conclusion, we have studied the fasting and postprandial variation of glucose and insulin, including insulin secretion's 1st and 2nd phases of healthy subjects; our sample presented genotype distribution similar to the reported population in the literature. C+ and C- euglycemic subjects had similar parameters of beta cell function and insulin sensitivity. In other way, we found variation in HOMA-B according to the genotype, suggesting a reduction in beta cell function related to *GIPR* polymorphism, without change in insulin sensitivity. The reduction in HOMA-B in healthy individuals, regardless of family history of diabetes, suggests further study of this SNP-*GIPR* as a possible early marker for the risk of pancreatic failure associated with type 2 diabetes.

Keywords: glucose homeostasis. insulin sensitivity. glucose-dependent insulinotropic polypeptide receptor. polymorphism.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	O efeito incretina: Comparação do aumento de insulina após infusão endovenosa de glicose e após carga oral de glicose	12
Figura 2 -	Ligação do GIP ao seu receptor nas células beta pancreáticas e mecanismo de liberação da insulina	15
Figura 3 -	Ação do GIP nos tecidos periféricos	17
Figura 4 -	Estrutura esquemática da proteína do GIPR com a troca dos aminoácidos na variante rs1800437 circulada em vermelho	19
Figura 5 -	Liberação bifásica da insulina após estímulo com dieta oral	21
Figura 6 -	Etapas do planejamento do estudo molecular do polimorfismo do <i>GIPR</i>	31
Figura 7 -	Gel de acrilamida com o resultado da digestão enzimática do fragmento do <i>GIPR</i>	32
Figura suplementar -	Distribuição dos polimorfismos com verificação do equilíbrio de Hardy-Weinberg	36
 ARTIGO		
Tabela 1 -	Características basais dos participantes	52
Figura 1 -	Análise da pesquisa para o polimorfismo rs1800437 do <i>GIPR</i>	53
Painel 1 -	Avaliação da história familiar de diabetes de acordo com a presença do polimorfismo	54
Tabela 2 -	Associações entre os genótipos do <i>GIPR</i> e os parâmetros da homeostase glicêmica e da função da célula beta	55
Figura 2 -	Curva de glicemia e insulinemia dos 25 indivíduos saudáveis participantes do estudo	56
Figura 3 -	Avaliação da glicemia e insulina pós-prandial conforme a presença do polimorfismo	57
Figura 4 -	Associação entre os genótipos do receptor para o GIP e os índices de função da célula beta IGI e IGI/HOMA-IR	58
Figura suplementar -	Avaliação da curva de glicemia e insulina demonstrando separadamente os 3 genótipos para o polimorfismo do <i>GIPR</i>	59

LISTA DE ABREVIATURAS

ADP	adenosina difosfato
Alelo C	citosina
Alelo G	guanina
AMPc	adenosina monofosfato cíclico
ATP	adenosina trifosfato
AUC	área sob a curva
BRAMS	estudo brasileiro de síndrome metabólica
DM-2	diabetes mellitus tipo 2
DNA	ácido desoxirribonucleico
DPP-IV	dipeptidilpeptidase 4
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético
GIP	polipeptídeo insulínico dependente de glicose
GIPR	receptor para o GIP
GLP-1	peptídeo semelhante ao glucagon 1
Gln	glutamina
Glu	glutamato
GLUT	transportador de glicose
GPCR	família de receptores acoplados à proteína G
G-6-P	glicose-6-fosfato
HDL	lipoproteína de alta densidade
HOMA	modelo de avaliação da homeostase
HOMA-B	modelo de avaliação da homeostase para função das células beta
HOMA-IR	modelo de avaliação da homeostase para resistência à insulina
H-W	Hardy-Weinberg
IGI	índice insulínico
IRS	substrato do receptor de insulina
IMC	índice de massa corpórea
MAPK	proteína-quinases ativadas por mitógenos
NAD	nicotinamida adenina dinucleotídeo
NADH	nicotinamida adenina dinucleotídeo hidreto
pb	pares de base
PCR	reação em cadeia de polimerase

PCR-RFLP	polimorfismo de fragmentos de DNA obtidos por enzima de restrição
PI3K	fosfatidilinositol 3-quinase
PKA	proteína quinase A
RI	resistencia à insulina
RNA _m	ácido ribonucleico mensageiro
SI	sensibilidade tecidual à ação da insulina
SNP	polimorfismo de nucleotídeo único
TGI	trato gastrintestinal
TTOG	teste de tolerância oral à glicose

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
1.1	As incretinas	11
1.2	Receptor para o GIP	14
1.3	Efeitos do GIP	14
1.4	Polimorfismos do GIPR	17
1.5	Fisiologia da Insulina	20
1.6	Disfunção das células beta pancreáticas	22
1.7	Resistência à insulina	22
2	JUSTIFICATIVA	24
3	OBJETIVOS	25
3.1	Objetivo geral	25
3.2	Objetivos específicos	25
4	MATERIAL E MÉTODOS	26
4.1	Indivíduos	26
4.2	Protocolo do experimento	26
4.3	Procedimentos técnicos	27
4.4	Pesquisa de variante do gene <i>GIPR</i>	28
4.5	Avaliação da homeostase glicêmica	33
4.6	Análise estatística	35
5	RESULTADOS	37
6	CONCLUSÕES	60
7	REFERÊNCIAS	61

1. INTRODUÇÃO

1.1. As incretinas

O conceito de que a mucosa do trato gastrintestinal (TGI) contém uma grande quantidade de peptídeos regulatórios da alimentação é conhecido desde o início do século XX. No entanto, foi com o desenvolvimento da dosagem de insulina por radioimunoensaio após 1960, que essa comunicação entre o intestino e o pâncreas foi confirmada e que o efeito incretina foi descrito.

Foi demonstrado que após administração oral de glicose há um aumento na concentração plasmática da insulina maior que quando comparado com a mesma quantidade de glicose realizada via endovenosa. Essa diferença na secreção de insulina de acordo com a via da alimentação, determinada por substâncias produzidas pelo TGI com capacidade de estimular a secreção endócrina do pâncreas, foi descrita como efeito incretina (GREMLICH et al, 1995) (Figura1).

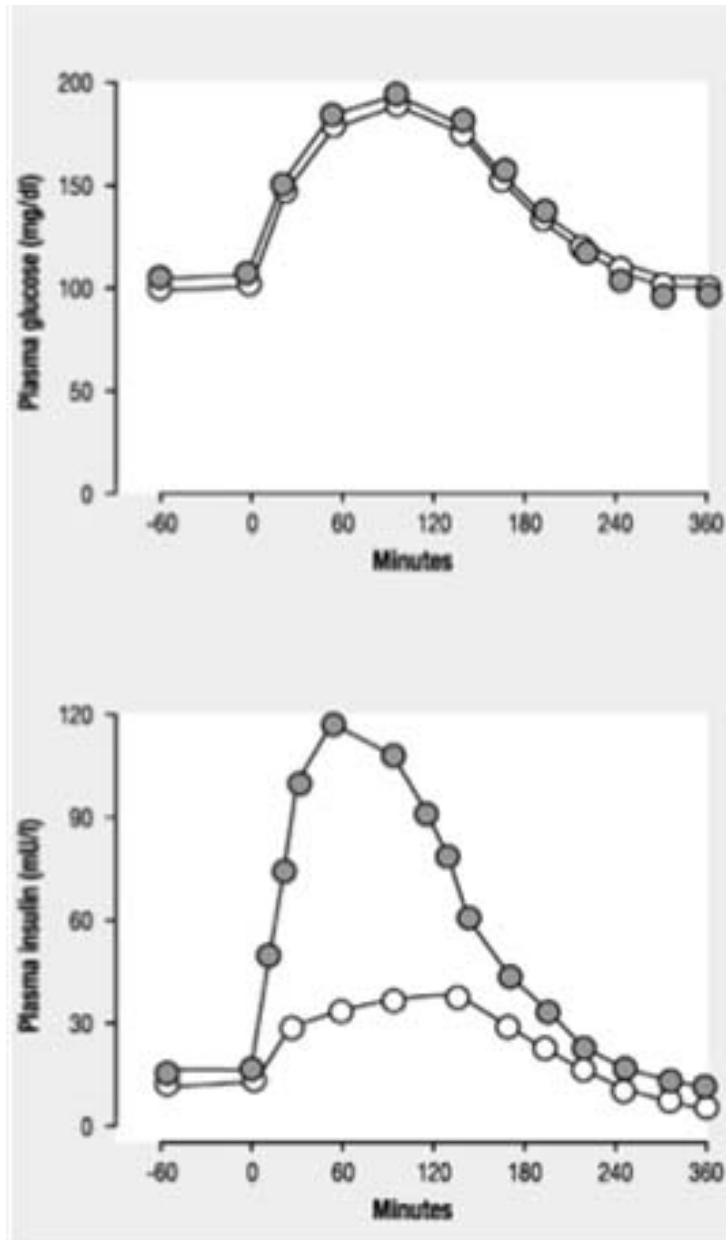


Figura 1 - O efeito incretina: Comparação do aumento de insulina após infusão endovenosa de glicose (círculos branco) e após carga oral de glicose (círculos cinza) Adaptado: J. Girard, *Diabetes e Metabolism*, 34 (2008) 550-559.

As incretinas são hormônios secretados pelo TGI em resposta a ingestão de nutrientes, que levam ao aumento da secreção de insulina estimulada por glicose. Isso significa que elas atuam como amplificadores dos sinais da glicose, e são responsáveis pela secreção de 50 a 70% da insulinemia pós-prandial no eixo êntero-insular (HANSOTIA e DRUCKER, 2005).

A primeira incretina descrita foi o GIP, inicialmente denominada *Gastric Inhibitory Polypeptide* (polipetídeo inibitório gástrico), pela sua habilidade em

concentrações supra-fisiológicas em inibir a secreção gástrica, depois renomeada *glucose-dependent insulinotropic polypeptide* (polipeptídeo insulínico dependente de glicose), para refletir seu efeito fisiológico como hormônio incretínico. Após o sequenciamento do gene do pró-glucagon, uma segunda incretina foi descrita, denominada GLP-1, *glucagon-like peptide-1* (peptídeo semelhante ao glucagon 1) (GIRARD, 2008).

O GIP humano é um peptídeo de 42 aminoácidos, derivado do processamento do pró-GIP, um precursor de 153 aminoácidos, que além do GIP bioativo, inclui um peptídeo N-terminal de 51 aminoácidos e um peptídeo C-terminal de 60 aminoácidos, e cujo gene está localizado no cromossomo 17. O *GIP* é composto de seis exons e a maioria das sequências de codificação estão no exon 3 (KIM e EGAN, 2008).

Os hormônios incretínicos são produzidos pelas células neuroendócrinas intestinais em resposta à absorção de alimentos. O GIP é liberado pelas células K do duodeno e do jejuno proximal após a absorção de glicose e gordura. O GLP-1 é sintetizado pelas células L do íleo distal e do cólon após a absorção de glicose, gorduras e também de proteínas. Na atualidade, somente o GIP e o GLP-1 são considerados hormônios com efeito incretínico em humanos e eles contribuem de forma igualitária para esse efeito. A concentração do GIP é baixa nos períodos de jejum (5-10 pmol/l) e aumenta após 5-15 min da alimentação (15-50 pmol/L) (GIRARD, 2008; BAGGIO e DRUCKER, 2007).

A meia vida na circulação do GIP é curta, cerca de 5-7 minutos, pois ele é rapidamente inativado por uma enzima, a DPP-IV (dipeptidilpeptidase 4) através da clivagem dos dois primeiros aminoácidos (alanina e tirosina) do peptídeo N-terminal do GIP completo (1-42) e convertido para o fragmento GIP (3-42), que não tem atividade insulínica significativa. Depois é excretado pelo clearance renal (KIM e EGAN, 2008).

Tanto alimentos contendo glicose, quanto gordura, estimulam a liberação do GIP, mas apenas quando a liberação é ativada pela glicose, há o estímulo para a biossíntese e secreção de insulina, devido a presença de um sensor parecido com o da célula beta pancreática (glicoquinase) nas células K intestinais. A liberação do GIP, causada após absorção de lipídeos, reflete sua ação insulino-dependente no metabolismo da gordura (GIRARD, 2008). Como a taxa de absorção do alimento é

mais importante que a própria presença dele no intestino, pacientes com doenças disabsortivas ou em uso de medicações que interferem no trânsito intestinal têm menor liberação de GIP (BAGGIO e DRUCKER, 2007).

1.2. Receptor para o GIP

Após sua liberação, o GIP alcança a circulação para se ligar ao seu receptor nas células alvo (GIPR). O GIPR está presente nas células alfa e beta das ilhotas pancreáticas, além disso, o RNAm (ácido ribonucleico mensageiro) transcrito do gene *GIPR* humano também foi descrito em outros tecidos, incluindo traquéia, sistema nervoso central, coração, trato gastrointestinal, baço, timo, células sanguíneas, pulmão, rim e osso (FIGUEIREDO et al, 2010) e mais recentemente no córtex adrenal (LAMPRON et al, 2009).

O gene *GIPR* humano está localizado no braço longo do cromossomo 19, é formado por 14 exons e contém uma sequência de 1398 pb que codifica uma proteína de 466 aminoácidos (FIGUEIREDO et al, 2010). O GIPR é membro da família de receptores acoplados à proteína G (GPCR) com sete domínios transmembrana, possuindo homologia de mais de 40% com os receptores para o glucagon e para o GLP-1, todos pertencentes à classe B (*secretin-like*) da família GPCR (GREMLICH et al, 1995).

O GIPR é formado por um domínio extracelular N-terminal: essencial para a ligação de alta afinidade com o GIP e ativação do receptor, um domínio transmembrana: importante para a ativação do receptor e acoplamento ao AMPc (adenosina monofosfato cíclico), e um domínio C-terminal citoplasmático que dispara a sinalização intracelular (KIM e EGAN, 2008).

1.3. Efeitos do GIP

A ligação do GIP ao seu receptor na célula beta pancreática, leva a um rápido aumento do AMPc. A glicose atravessa a membrana da célula beta, via GLUT-2 (transportador de glicose), é metabolizada, o que leva a um aumento na relação ATP/ADP (adenosina trifosfato/ adenosina difosfato), levando a despolarização da

célula beta e secreção de insulina dependente de glicose (LYNN et al, 2003). Além disso, o GIP também estimula a biossíntese de insulina (GIRARD, 2008).

O estímulo para a liberação de insulina ocorre por 3 etapas: 1) inibição da atividade dos canais de ATP dependente de potássio; 2) aumento do influxo intracelular de cálcio através dos canais de cálcio dependentes de voltagem; 3) aumento da exocitose da insulina previamente armazenada através dos canais dependentes de cálcio, levando ao primeiro pool de secreção de insulina (MEIER et al, 2004). O GIP age sinergicamente com a glicose para estimular a proliferação das células beta pancreáticas e inibir sua apoptose, através das vias da PKA (proteína quinase A), PI3K (fosfatidilinositol 3-quinase) e MAPK (proteína-quinase ativada por mitógenos) (HANSOTIA e DRUCKER, 2005) (Figura 2).

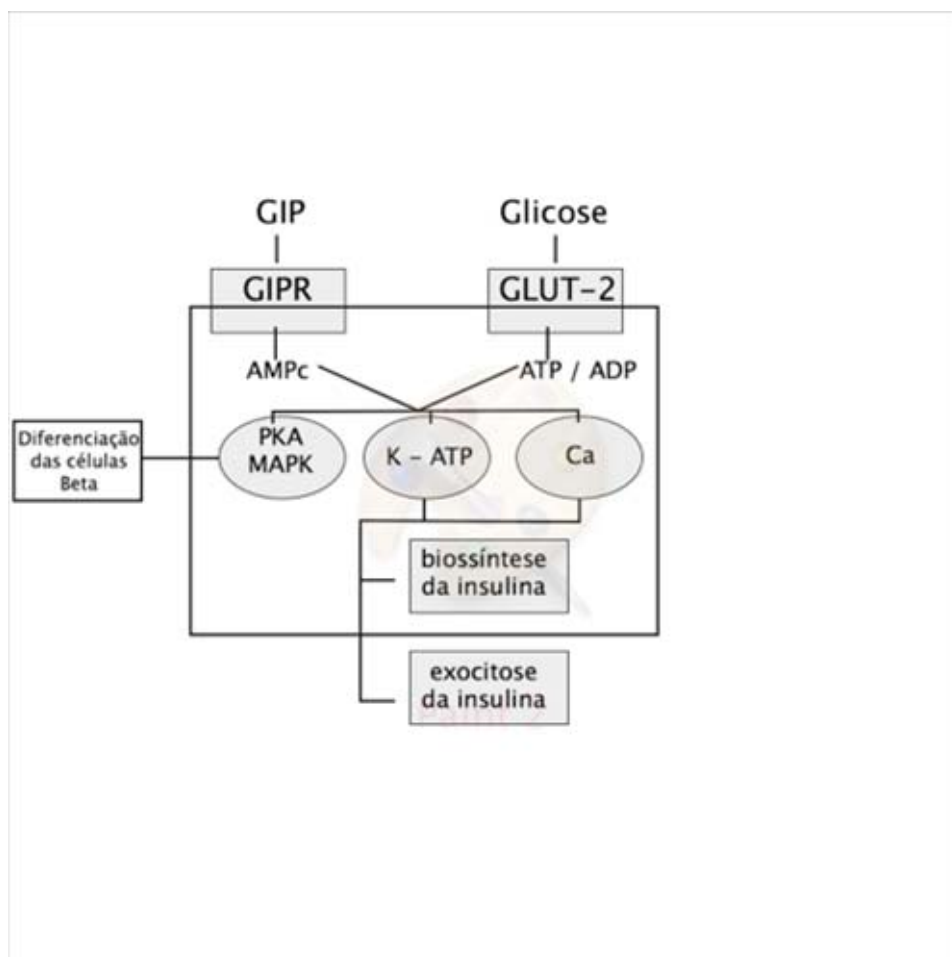


Figura 2 - Ligação do GIP ao seu receptor nas células beta pancreáticas e mecanismo de liberação de insulina. K: potássio, Ca: cálcio.

A importância fisiológica do GIP como hormônio incretínico fica evidenciada quando seu receptor GIPR está ausente. Camundongos com gene *GIPR* inativado apresentam defeito na secreção de insulina dependente de glicose e intolerância à glicose (GIRARD, 2008), mas apresentam glicemia de jejum normal e glicemia após infusão intraperitoneal de glicose normal (HANSOTIA e DRUCKER, 2005). Eles também são resistentes ao desenvolvimento de obesidade exógena, podendo ocorrer até 40% de redução no peso e nos níveis de triglicérides, ácidos graxos e colesterol (GIRARD, 2008). Esse efeito lipolítico pode ser explicado pelo uso preferencial de gordura como substrato energético e pelo aumento do gasto energético (BAGGIO e DRUCKER, 2007). Estudos *in vitro* demonstram que esses efeitos podem ser insulino-dependentes ou independentes.

Em humanos não existem evidências claras do efeito do GIP no metabolismo lipídico. Foi demonstrado seu efeito em diminuir a concentração de ácidos graxos livres após a ingestão de solução concentrada de lipídeos, provavelmente na via dependente de insulina, levando à inibição da liberação de ácidos graxos no tecido adiposo e aumentando a reesterificação deles (ASMAR et al, 2010). Outros efeitos já relatados são aqueles relacionados à ligação ao seu receptor nos adipócitos. Este hormônio, quando liberado em resposta à ingestão de gordura, pode ter efeito no metabolismo dos lipídios, principalmente ao promover o clearance dos quilomícrons da circulação pela ativação da lipoproteína lipase, facilitando o acúmulo de gordura (GIRARD, 2008) e também estimulando a síntese e o depósito de ácidos graxos (ASMAR et al, 2010). (Figura 3).

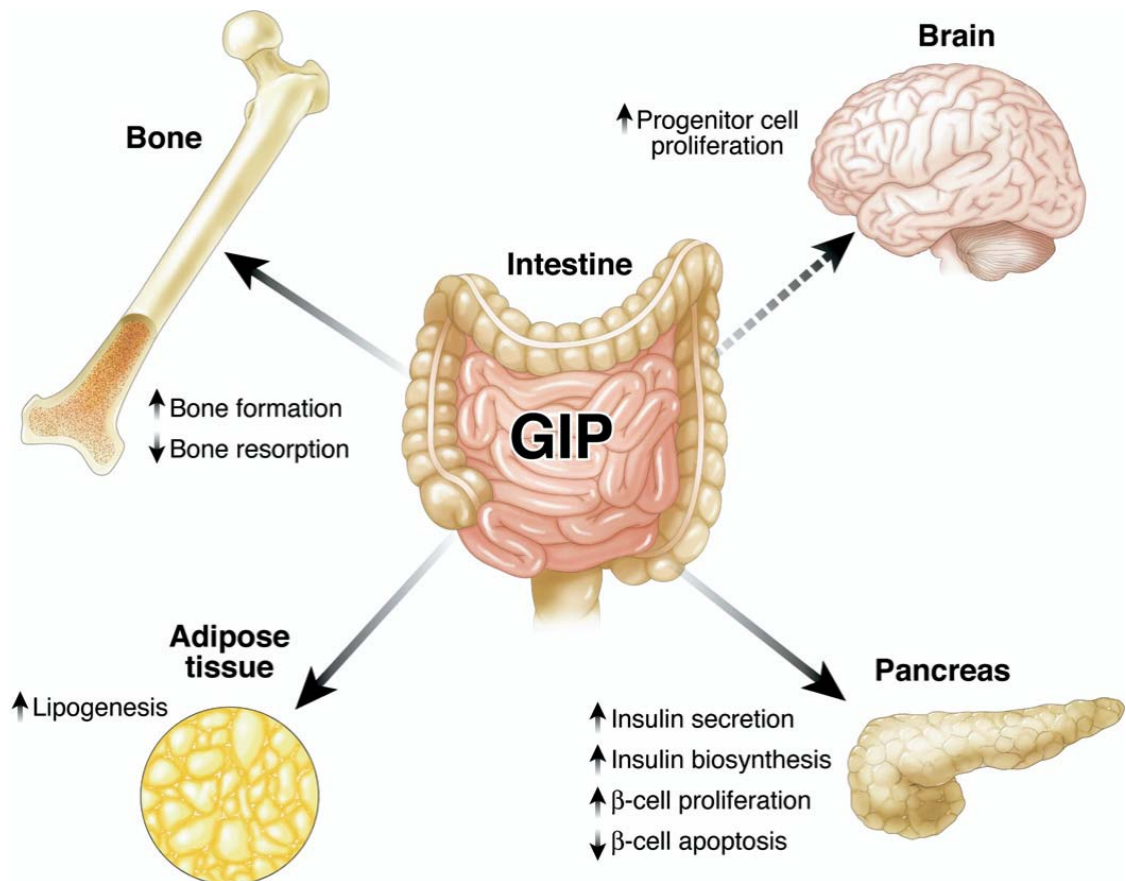


Figura 3 - Ação do GIP nos tecidos periféricos. Fonte: Baggio e Drucker, *Gastroenterology*, vol 132, n 6.

Em pacientes com diabetes mellitus tipo 2 (DM-2), a concentração plasmática de GIP é descrita como normal ou aumentada, mas seu efeito insulínico é deficiente. Os mecanismos subjacentes à redução da resposta das células beta ainda permanecem obscuros, a hipótese mais provável é que a hiperglicemia leva a hiperregulação da expressão do GIPR (KIM e EGAN, 2008).

1.4. Polimorfismos do GIPR

O genoma humano consiste em aproximadamente 100 a 150 mil genes. No total, 99 % do genoma é idêntico entre os indivíduos, sendo assim, resta apenas 1 % suscetível a variações. Quando uma variação genética alcança frequência superior a 1 % em uma população, passamos a denominá-la de polimorfismo. Existem vários tipos de polimorfismos, dentre eles os SNPs (*single-nucleotide polymorphism*) são os mais frequentes. Eles surgem a partir de mudanças em nucleotídeos únicos em

uma determinada sequência de DNA (ácido desoxirribonucleico). Os SNPs estão distribuídos uniformemente por todo o genoma, tornando-se excelentes marcadores biológicos de predisposição a doenças.

Recentemente, vêm sendo estudados os SNPs do gene *GIPR*. Foram demonstradas algumas variantes genéticas com função do receptor reduzida, causadas por alterações nos sítios de ligação ou por defeitos na ativação da cascata do receptor (FORTIN, SCHRODER e BEINBOR, 2010), levando a alterações na resposta fisiológica do receptor e culminando em associações com doenças. Na ausência de mutações ou polimorfismos, a expressão ectópica do gene *GIPR* está relacionada à tumorigênese adrenal (MAZZUCO et al, 2006).

As observações de que camundongos com *GIPR* inativado são resistentes à obesidade induzida por dieta, e que o uso de antagonistas do GIP ou a vacinação contra o GIP também diminui a chance do desenvolvimento de obesidade, além de que mutações no *GIPR* podem estar associadas a doenças cardiovasculares, alterações no metabolismo lipídico, acúmulo de gordura e resistência insulínica, despertaram o interesse no papel deste como facilitador de obesidade (SAUBER et al, 2010; VOGEL et al, 2009; SAXENA et al, 2010). Camundongos com *GIPR* inativado apresentam apenas intolerância à glicose moderada, provavelmente devido a regulação positiva das células beta para o GLP-1, que mantém a secreção de insulina nesses modelos animais (PAMIR et al, 2003).

Em nosso estudo, nós escolhemos o rastreamento para o SNP conservativo do exon 12 do *GIPR* rs1800437 alelos G/C, também conhecido por Glu354Gln. Com esse polimorfismo, ocorre a mudança do aminoácido glutamato (Glu ou E) para glutamina (Gln ou Q) na posição 354 da proteína do GIPR, causada pela troca de uma guanina (G) por citosina (C). Já foi demonstrada redução significativa da atividade basal do GIPR e também diminuição da expressão na membrana celular desse receptor causada por essa variante. Possivelmente essa mutação muda a estrutura do GIPR, que primariamente leva a um desequilíbrio do receptor e depois compromete indiretamente a interação dele com a proteína G (FORTIN, SCHROEDER e BEINBOR, 2010) (Figura 4).

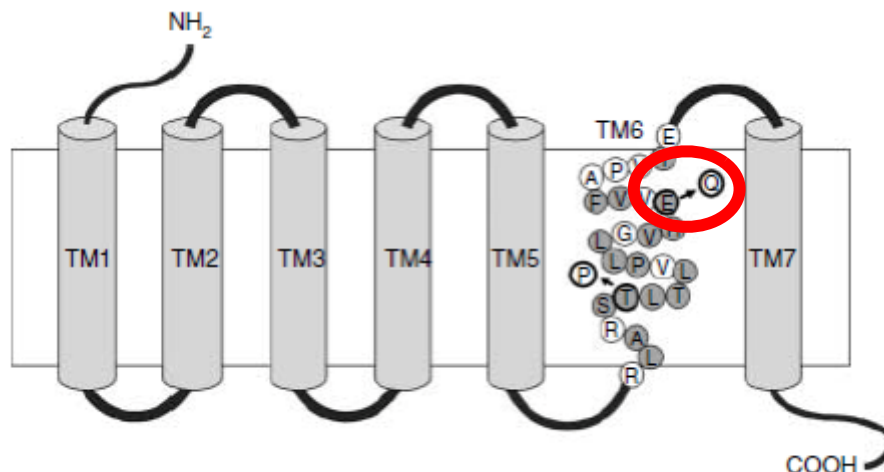


Figura 4 - Estrutura esquemática da proteína do GIPR com a troca dos aminoácidos na variante rs1800437 circulado em vermelho. Adaptado SAUBER et al, 2010.

Como em crianças o impacto do estilo de vida é menor quando comparado aos adultos, com maior relevância dos fatores genéticos sobre a obesidade, vários estudos em crianças obesas foram realizados para tentar determinar quais são os polimorfismos mais relacionados com obesidade e insulinoresistência. Em um estudo com crianças e adolescentes obesas de Berlim, foram encontradas evidências de uma associação significativa entre o alelo C do SNP rs1800437 do *GIPR* e um elevado índice no HOMA-IR (valor acima do percentil 95) nessa população (SAUBER et al, 2010). Em outro estudo em crianças alemãs com obesidade, a prevalência nos pacientes controles do alelo G foi de 0,775 e de C alelo 0,225, e apesar de não significativa ($p = 0,076$), houve maior tendência de transmissão do alelo G em indivíduos com obesidade infantil (VOGEL et al, 2009). Outro estudo faz a associação do SNP rs2287019 do *GIPR* com obesidade, sugerindo uma contribuição da variação da secreção de insulina pós-prandial, causada pelo GIP, com o aumento do peso (SPELIOTES et al, 2010).

Um estudo de uma população holandesa analisou 568 indivíduos para avaliar a relação entre o polimorfismo rs1800437 e o diagnóstico de DM-2. Não houve diferença estatisticamente significativa na distribuição dos genótipos comparando os casos com indivíduos controles e, conseqüentemente, nenhuma associação significativa desse SNP com o diagnóstico de diabetes foi obtida. Já uma análise dos 190 pacientes diabéticos dessa amostra revelou uma associação marginal com

doença cardiovascular. Os pacientes heterozigotos para o alelo C apresentaram um menor risco para doença cardiovascular (NITZ et al, 2007).

1.5. Fisiologia da insulina

A insulina exerce um papel central na regulação da homeostase da glicose e atua de maneira coordenada em eventos celulares que regulam os efeitos metabólicos e de crescimento. A secreção de insulina é estimulada por substratos energéticos, sendo a glicose o mais importante.

A glicose é transportada para o interior da célula beta por uma proteína de membrana, denominada GLUT-2, que permite que o transporte de glicose aumente rapidamente quando a glicemia se eleva. Após entrar na célula beta, a glicose é fosforilada à glicose-6-fosfato (G-6-P) por duas enzimas: a hexoquinase I e a hexoquinase IV ou glicocquinase, que é o sensor de glicose nas células secretoras de insulina. O destino preferencial da G-6-P na célula beta é a glicólise. O metabolismo de glicose gera ATP e a razão ATP/ADP aumenta no citoplasma, provocando o fechamento dos canais de potássio e a consequente despolarização da membrana celular que abre os canais de cálcio. O aumento do influxo de cálcio para a célula beta resulta em despolarização e exocitose.

A ação da insulina na célula inicia-se pela sua ligação ao receptor de membrana plasmática, é o receptor ativado, e não a insulina, que causa os efeitos subsequentes. Este receptor está presente em praticamente todos os tecidos dos mamíferos. É uma glicoproteína tetramérica constituída por 2 subunidades α e duas subunidades β , unidas por ligações dissulfeto. A subunidade α é inteiramente extracelular e contém o sítio de ligação da insulina. A subunidade β é uma proteína transmembrana responsável pela transmissão do sinal e possui atividade tirosina quinase. A ligação da insulina à subunidade α permite que a subunidade β adquira atividade quinase levando à alteração conformacional e autofosforilação em múltiplos resíduos de tirosina.

A autofosforilação do receptor, induzida pela insulina, resulta na fosforilação de substratos protéicos intracelulares, como o substrato-1 do receptor de insulina (IRS-1). O IRS-1 fosforilado associa-se a domínios da enzima PI3K, transmitindo, desta maneira, o sinal insulínico. A insulina parece exercer *feedback* positivo na sua secreção, pela interação com seu receptor nas células beta pancreáticas. A PI3K é

importante no metabolismo da glicose, com papel essencial no transporte de glicose estimulado pela insulina, mediado através da translocação de vesículas de GLUT-4 para a membrana celular, além disso, também atua na diferenciação celular. Semelhante a outros fatores de crescimento, a insulina ativa a via da MAPK, o que estimula a proliferação e diferenciação celular, sem efeito nas vias metabólicas do hormônio.

A insulina circula de forma livre, é depurada da circulação dentro de 10 a 15 minutos, degradada pela enzima insulinase, principalmente no fígado, exceto pela porção ligada ao receptor. Com níveis normais de glicose (80 a 90 mg/dl), a taxa de secreção de insulina é mínima, 25 ng/min/kg. Quando a concentração de glicose é subitamente aumentada, a secreção de insulina aumenta acentuadamente de forma bifásica: secreção de primeira fase, quando ocorre a rápida liberação de insulina pré-formada, a insulina plasmática aumenta sua concentração em até 10 vezes, dentro de 3 a 5 min; e a secreção de segunda fase, com a liberação sustentada de insulina recém sintetizada e liberação adicional de insulina pré-formada. Como a secreção inicial de insulina não é mantida, em 10 minutos a concentração de insulina cai até pela metade e aproximadamente aos 15 minutos, a secreção de insulina aumenta novamente e atinge um novo patamar que dura de 2 a 3 horas, até 25 vezes o nível basal. O desligamento da secreção de insulina é rápido, ocorrendo dentro de 3 a 5 minutos após a redução da concentração de glicose no sangue de volta ao nível de jejum (Figura 5).

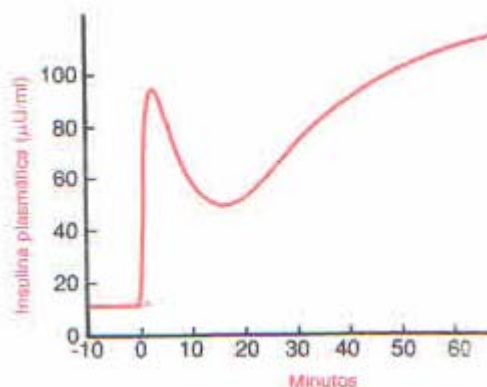


Figura 5 - Liberação bifásica da insulina após estímulo com dieta oral. Fonte: Guyton e Hall, tratado de fisiologia medica, 9ª edição.

A insulina age em vários tecidos periféricos incluindo músculo, fígado e tecido adiposo. Seus efeitos metabólicos incluem aumento da captação de glicose,

sobretudo nos tecidos muscular e adiposo, aumento da síntese de proteínas, ácidos graxos e glicogênio, bem como bloqueio da produção hepática de glicose (via diminuição da neoglicogêneses e glicogenólise), da lipólise e da proteólise. Além disso, a insulina tem efeitos na proliferação e diferenciação celular, prevenção da apoptose e aumento da produção de óxido nítrico no endotélio (CARVALHEIRA e SAAD 2002; HABER et al, 2001).

1.6. Disfunção das células beta pancreáticas

O pâncreas endócrino pode falhar em secretar insulina adequadamente para as demandas metabólicas, por disfunção secretória adquirida e/ou diminuição da massa de células beta. A disfunção secretória é caracterizada por uma redução relativa na primeira fase de secreção de insulina, facilmente demonstrada através dos testes de tolerância à glicose ou após refeições mistas. Para manter o equilíbrio entre oferta de insulina e demanda metabólica, ocorre um ajuste nos mecanismos de crescimento e sobrevivência das células beta no adulto. A regulação da massa de células beta é realizada por 4 mecanismos independentes: 1) replicação de células beta; 2) tamanho da célula beta; 3) neogênese da célula beta; 4) apoptose. O IRS-2 é fundamental nas etapas dessa regulação.

1.7. Resistência à insulina

A manutenção da glicemia normal depende principalmente da capacidade funcional das células beta pancreáticas em secretar insulina e da sensibilidade tecidual à ação da insulina (SI). A disfunção das células beta e a resistência insulínica (RI) são anormalidades metabólicas associadas na etiologia do DM-2. A resistência à insulina é uma condição clínica de alta prevalência, caracterizada por falha das células alvo em responder aos níveis normais de insulina circulantes, resultando em hiperinsulinemia compensatória. É uma anormalidade metabólica característica de indivíduos com diabetes e obesidade. Em populações normais, a RI ocorre em 20 a 25% dos indivíduos (GELONEZE e TAMBASCIA, 2006).

Apesar de ser considerada como um fator de risco independente para o diabetes mellitus, hipertensão arterial e doenças cardiovasculares, a RI tem

interligação com essas doenças em sua fisiopatologia, levando a síndrome metabólica que representa uma epidemia com impacto na saúde pública do mundo todo. Além disso, a RI é a ligação entre sobrepeso e obesidade e às complicações relacionadas ao excesso de gordura (UTSUNOMIYA, 2012).

Mesmo em populações de não diabéticos, a redução da ação insulínica pode estar acompanhada de alterações metabólicas e cardiovasculares incluindo: hipertensão arterial, hipertrigliceridemia, redução do HDL (lipoproteína de alta densidade) colesterol, intolerância aos carboidratos, obesidade abdominal, aumento de inibidor-1 do ativador do plasminogênio, hiperuricemia e doença aterosclerótica (GELONEZE e TAMBASCIA, 2006).

Nos últimos anos, identificou-se que a RI pode ser a base fisiopatológica de outras entidades clínicas prevalentes na população como doença hepática gordurosa não alcoólica, síndrome dos ovários policísticos, doença renal crônica, insuficiência cardíaca, alterações cognitivas e vários tipos de câncer (CARVALHEIRA e SAAD, 2006). Além disso, a RI pode contribuir para a disfunção endotelial, definida como um desequilíbrio na produção do endotélio de mediadores que regulam o tônus vascular, a agregação plaquetária, a coagulação e a fibrinólise. A condição pró-inflamatória associada a essas alterações, sugere ligação entre RI e disfunção endotelial no estágio inicial do processo de aterosclerose, em indivíduos obesos e em pacientes diabéticos (CARVALHO, COLAÇO e ORTES, 2006).

2. JUSTIFICATIVA

A avaliação de fatores que podem interferir sobre a homeostase glicêmica e a função das células beta pancreáticas é de alta relevância clínica e epidemiológica, por estarem associados a doenças de alta prevalência e complicações, o que motiva a busca de um marcador genético para o diagnóstico precoce.

A possível variabilidade individual na resposta fisiológica hormonal após a alimentação relacionada à elevação do GIP pós-prandial, associada à noção recente da existência de SNPs conferindo diferente atividade funcional às variantes do GIPR, demonstra a necessidade de maiores estudos em indivíduos saudáveis.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Avaliar a influência da variação genotípica Glu354Gln do receptor para o GIP sobre alguns parâmetros clínicos e bioquímicos relacionados ao metabolismo da glicose e da ação da insulina em indivíduos saudáveis.

3.2. Objetivos específicos

Pesquisar a variação genotípica Glu354Gln do receptor para o GIP em uma população de adultos saudáveis.

Descrever a associação da história familiar de diabetes com o polimorfismo do *GIPR*.

Avaliar a homeostase glicêmica de jejum em indivíduos hígidos de acordo com o polimorfismo.

Caracterizar a resposta pós-prandial da glicose e insulina em um grupo de indivíduos saudáveis.

Avaliar possíveis variações nos índices de função pancreática e de resistência insulínica conforme a presença ou ausência do alelo C para o *GIPR*.

4. MATERIAL E MÉTODOS

Estudo observacional, transversal não controlado, inicialmente descritivo, seguido de estudo analítico.

4.1. Indivíduos

A amostra foi constituída por indivíduos adultos (idade mínima de 18 anos) atendidos nos ambulatórios de Endocrinologia do Hospital das Clínicas da Universidade Estadual de Londrina e por outros voluntários da instituição, no período de agosto de 2011 até abril de 2012. Através de amostragem intencional dos indivíduos de modo consecutivo, seguida de informação sobre a realização dos testes propostos, a amostra foi constituída por 25 voluntários, 12 do sexo feminino e 13 do sexo masculino.

Os critérios de inclusão foram: IMC (índice de massa corpórea, calculado pela fórmula: $\text{Peso} / \text{Altura}^2$) menor que 30, sem antecedentes de comorbidades ou apenas portadores de hipotireoidismo bem controlado há pelo menos 1 ano.

Os critérios de exclusão foram a presença de história prévia de Diabetes Mellitus, hipertensão arterial, dislipidemia ou uso de medicamentos com efeito no metabolismo da glicose e da insulina.

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos (CEP/UEL 024/2011) e os participantes assinaram termo de consentimento após terem sido esclarecidos sobre seus propósitos.

4.2. Protocolo do experimento

Todos os indivíduos foram submetidos a 10 horas de jejum e à punção de veia periférica com instalação de via de acesso para coleta de sangue pré-prandial (tempo basal ou T0), seguida da ingestão de 100g de leite NAN pro 1 (Nestlé Brasil Ltda), composta de 58 g de carboidratos e 28 g de gorduras, dissolvido em 300ml de

água (HANSEN et al, 2011), com coleta de sangue nos tempos 30, 60, 90, 120 e 150 minutos contados a partir do início da refeição (tempos T30, T60, T90, T120 e T150).

Para a realização dos exames, os pacientes permaneceram acomodados em sala de testes com ambiente calmo, em posição sentada. Foi verificado o peso e a altura dos indivíduos na chegada e depois foi verificada a pressão arterial e a frequência cardíaca no basal e a cada 30 minutos. Foi aplicado questionário com perguntas referentes ao uso de medicações, doenças prévias e história familiar de diabetes em parentes de primeiro grau.

4.3. Procedimentos técnicos

As dosagens hormonal e bioquímica foram realizadas no laboratório do Hospital Universitário Regional Norte do Paraná, da Universidade Estadual de Londrina e foram realizadas em material colhido em tubo de hemólise com gel, seguida imediatamente por centrifugação. Foram dosados o hormônio insulina e a glicemia. Também foi coletada amostra de sangue para extração do DNA.

Dosagem de glicose

A glicemia foi dosada pelo método da hexoquinase (Dimension Gluc, Siemens, Friemley, Camberley, UK) realizada no Dimension clinical chemistry system (Siemens, Friemley, Camberley, UK). O método utilizado é uma adaptação do método da hexoquinase-glicose-6-fosfato desidrogenase. O princípio é baseado na glicose que é fosforilada pelo ATP na presença da enzima hexoquinase. A hexoquinase catalisa a fosforilação da glicose na presença de ATP e magnésio, formando G-6-P e ADP. A G-6-P é então oxidada pela glicose-6-fosfato desidrogenase na presença de nicotinamida adenina dinucleótido (NAD) para produzir 6-fosfogliconato e NADH (nicotinamida adenina dinucleótido hidreto). Um mol de NAD é reduzido para um mol de NADH para cada mol de glicose presente. A absorvância devida ao NADH (e, deste modo, a concentração de glicose) é determinada utilizando uma técnica bicromática de ponto final (340 e 383 nm). Valor de referência de 70 a 99 mg/dl.

Dosagem de insulina

A insulina foi dosada no soro através de quimioluminescência (Insulina Architect, Abbott Park, Illinois, USA), realizada no Architect i2000SR (Abbott Park, Illinois, USA). É um ensaio enzimático com dois sítios. A insulina presente na amostra forma um complexo do tipo sanduíche com os anticorpos monoclonais específicos presentes na fase sólida da reação e com os anticorpos conjugados. A amostra, as micropartículas paramagnéticas revestidas de anticorpos anti-insulina e o conjugado de anticorpos anti-insulina marcado com acridinio são combinados. Após a lavagem, as soluções pré-ativadora e ativadora são adicionadas à mistura de reação. A reação quimioluminescente resultante é medida em unidades de luz relativas. Há uma relação direta entre a quantidade de insulina na amostra e as unidades de luz relativas detectadas pelo sistema ótico. Valor de referência de 2,5 a 25 $\mu\text{U/mL}$.

4.4. Pesquisa de variante do gene *GIPR*

No T0, os voluntários foram submetidos à coleta de aproximadamente 4 mL de sangue venoso periférico pelo método de coleta a vácuo em tubos previamente tratados com EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético). O material foi imediatamente centrifugado a 3000 rpm por 15 minutos e o *buffy coat* foi aliquoteado em tubos tipo *ependorf* e armazenados em freezer a -20°C para posterior análise.

Extração de DNA

O DNA genômico foi extraído a partir de 200 μl do *buffy coat* utilizando kit de extração de DNA Biopur (Biometrix Diagnostica, Curitiba, Brasil) de acordo com as instruções do fabricante. Primeiramente foi acrescentado 200 μl de tampão A e 20 μl de proteinase K, agitado em vórtex e seguido da incubação à 56°C por 15 minutos. Na próxima etapa, foi acrescentado o tampão B6 de ligação no tubo de reação do kit (esse tubo contém uma resina), colocado na centrífuga por 2 minutos à 12 mil rpm. Depois de descartado o sobrenadante, foi acrescentado 500 μl do tampão I de lavagem, colocado na centrífuga por 1 minuto na mesma rotação. Novamente foi descartado o sobrenadante e foi acrescentado 800 μl do tampão II de lavagem,

colocado na centrífuga. Acrescentou-se 200 µl do tampão de eluição, previamente aquecido a 70°C, colocado na centrífuga por 1 minuto à 10 mil rpm.

A quantificação do DNA foi realizada por espectrofotometria a 260 nm e 280 nm e em seguida armazenadas a – 20°C. A integridade das amostras de DNA foi analisada por eletroforese em gel de agarose 1% à 100 V por 15min.

Identificação do SNP pela técnica de PCR-RFLP

Uma variante específica da região codificadora do gene *GIPR* foi analisada inicialmente através de uma abordagem *in silico* (Figura 6). Foram selecionados pares de oligonucleotídeos já descritos na literatura para o estudo do SNP rs1800437 (VOGEL et al, 2009) e a análise de especificidade destes foi feita com a ferramenta de PCR (reação em cadeia de polimerase) através do site <http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgPcr?command=start>. Em seguida, utilizando o programa pDRAW32 (versão 1.1.120, acaclone software, Dinamarca), foi realizada a busca de sítios de restrição naquele fragmento de PCR, para confirmar a localização do polimorfismo no comprimento do fragmento de restrição. Através desta técnica, chamada de RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), cada indivíduo apresenta o seu padrão de fragmentos ou 'perfil de digestão', detectado em gel de eletroforese de DNA pelo número e tamanho dos fragmentos gerados.

Após extração do DNA total, o fragmento genômico de 245pb foi isolado e amplificado utilizando reação em cadeia de polimerase. Os *primers* foram desenhados de acordo com o código de acesso *GenBank*: NM_000164.2 (VOGEL et al, 2009). A sequência utilizada para o *primer sense* foi: 5'-ATT ACC GGC GGT TGA GAG G-3' e *primer anti-sense*: R 5'-CTG GAA GGA GCT GAG GAA GA-3'. A reação de PCR foi realizada em volume final de 25 µl, contendo 2,5 µM de cada *primer* (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, USA), 2,5 U Taq polimerase, 50 mM de MgCl₂, 1,25 mM de dNTP (Invitrogen) e 100 ng de DNA. A reação de amplificação foi realizada em termociclador (Multigene Optimax, Labnet, Edison, USA), com um ciclo de desnaturação inicial de 5 minutos a 95°C; seguido por 30 ciclos de 45 segundos a 94°C para desnaturação, 45 segundos a 62°C para o anelamento, 45 segundos a 72°C para extensão e 10 minutos a 72°C para extensão final. Os fragmentos do *GIPR* amplificados pela PCR foram avaliados por meio de eletroforese em gel de

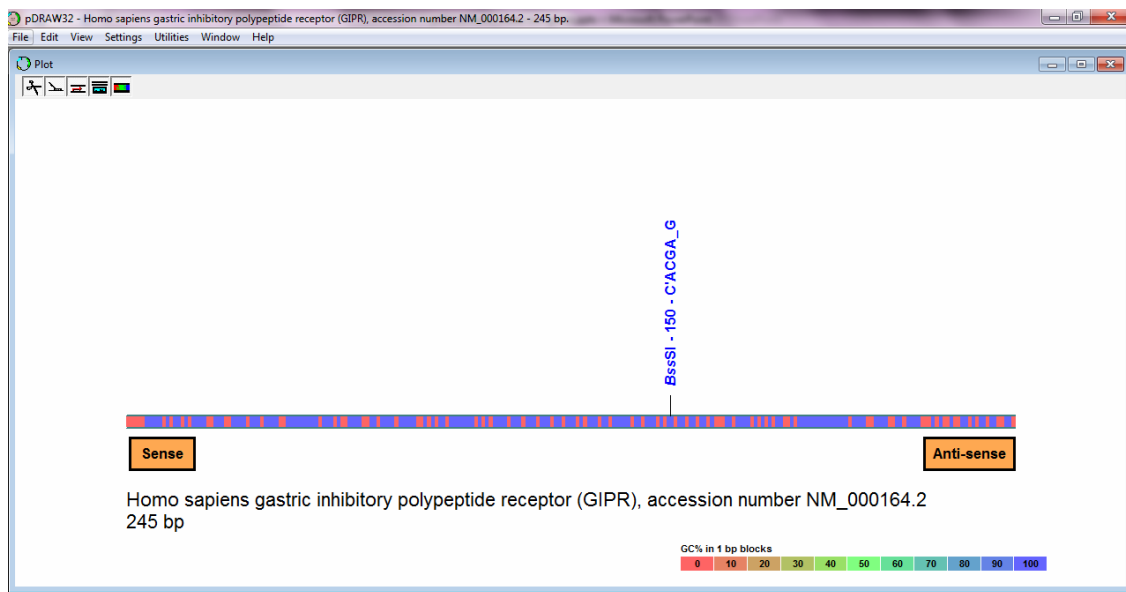
acrilamida a 10% corado com nitrato de prata, utilizando um marcador de 100 pb (Invitrogen).

Para a determinação do genótipo SNP rs1800437, foi realizada a digestão dos produtos de PCR com a enzima de restrição BssSI (Biolabs, Ipswich, New England), os quais foram submetidos a banho seco à 37°C por 3 horas (Figura 6).

A

```
UCSC In-Silico PCR  
  
>chr19:46181240+46181484 245bp ATTACCGGCTGAGGTGAGG CTGGAAGGAGCTGAGGAAGA  
ATTACCGGCTGAGGTGAGGgcatgcgcttggggaccgaggggaaggggcccg  
ggtgcgagatggggaaccagggtgcgggatcactgctgccgccctctct  
ccccaggctggctcgctccacgctgacgctggtgccctgctgggtgtcc  
acgaggtggtgttctcccgtagacaggaacaggccccggggcgccctg  
cgcttcgccaagctcggctttgagaTCTTCCTCAGCTCCTCCAG
```

B



C

[rs1800437](#) [*Homo sapiens*]

CGCTGGTGCCCCTGCTGGGTGTCCAC[G/C]AGGTGGTGT
TTGCTCCCGTGACAGA

Enzima de restrição BssSI

Pontos de corte gerando pontas coesivas (sticky ends):

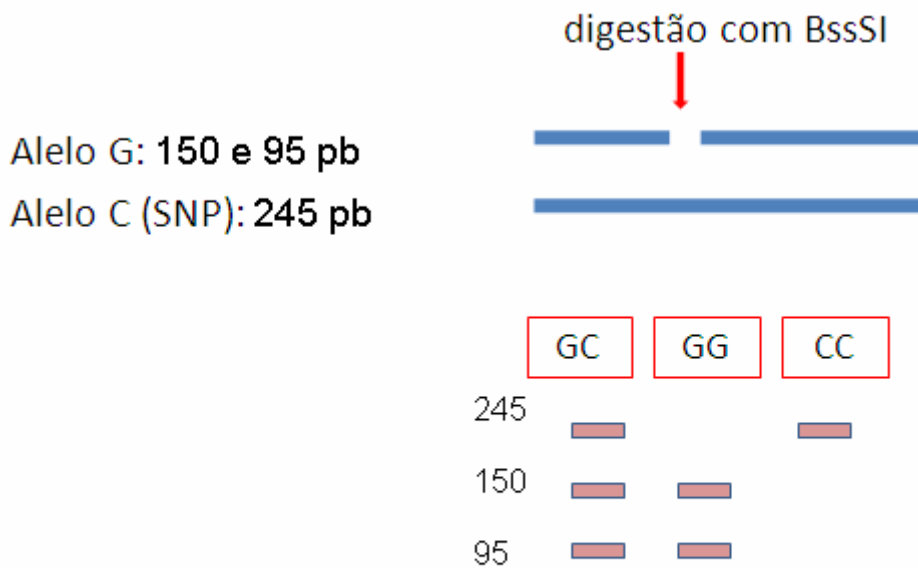
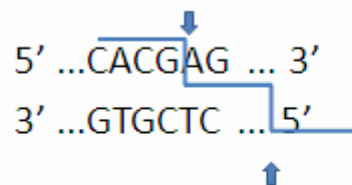


Figura 6 - Etapas do planejamento do estudo molecular do polimorfismo do *GIPR*. A) Resultado da busca dos oligonucleotídeos específicos em todo o genoma humano, demonstrando um fragmento de PCR *in silico*. B) Sítio de restrição localizado no fragmento de DNA. C) Ponto de corte e perfil da digestão com a enzima de restrição BssSI ilustrando esquematicamente a interpretação de leitura da eletroforese para os três genótipos possíveis GG, GC e CC.

Cada amostra foi classificada de acordo com a presença de alelo C (mutado): 245 pb ou G (selvagem): 95pb e 150 pb, de acordo com a quantidade de bandas presentes no gel de acrilamida. Ou seja, apenas 1 banda indica a presença do alelo mutado em homozigose; 2 bandas indicam a presença do alelo selvagem G em homozigose; e 3 bandas sugerem a presença dos dois tipos de alelo (C e G), caracterizando um heterozigoto. Os produtos da reação após digestão enzimática também foram submetidos à técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida 10% e corados com nitrato de prata.

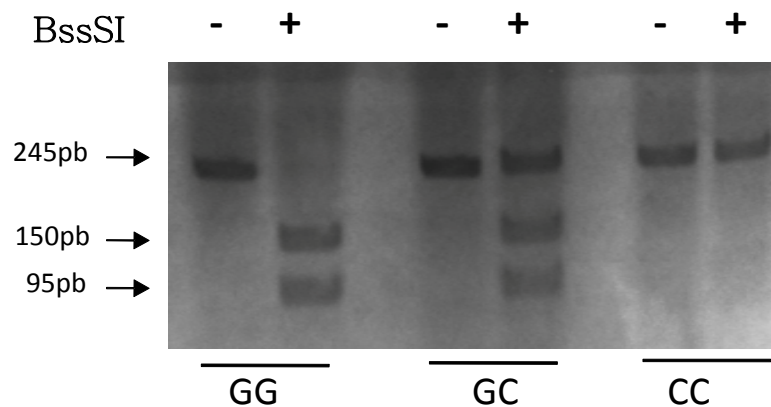


Figura 7 - Gel de acrilamida com o resultado da digestão enzimática do fragmento do *GIPR*.

Equilíbrio de Hardy-Weinberg

O princípio de Hardy-Weinberg (H-W) foi utilizado para verificar se as frequências genotípicas do polimorfismo rs1800437 da nossa população estavam em equilíbrio genético. É um modelo matemático utilizado para calcular as frequências genotípicas a partir das frequências alélicas. Demonstra que se não existir fatores evolutivos (mutações, seleção natural, fluxo gênico de populações migrantes e deriva genética) atuando sobre uma população, as frequências gênicas permanecem inalteradas e as proporções genotípicas atingem um equilíbrio estável, mostrando a mesma relação constante entre si ao longo do tempo. Para que o princípio seja demonstrado, a população em questão deve estar em equilíbrio genético. Portanto, o equilíbrio de Hardy-Weinberg é muito útil para o estudo dos mecanismos evolutivos de uma população. Na equação $p^2 + 2pq + q^2 = 1$, p é a frequência do alelo dominante (nosso caso alelo G) e q é a frequência do alelo recessivo (nosso caso alelo C). Deste $p+q=1$, portanto $(p+q)^2=1$ resultando na equação de equilíbrio de H-W, portanto p^2 e q^2 são as frequências esperadas para o

homozigoto dominante (GG) e homozigoto recessivo (CC), respectivamente, enquanto $2pq$ é a frequência esperada para heterozigoto (GC) na população. Os polimorfismos estão em equilíbrio de H-W quando $p > 0,05$ (SOUZA, 2012) (Figura suplementar).

4.5. Avaliação da homeostase glicêmica

A manutenção da glicemia normal depende principalmente da capacidade funcional das células beta pancreáticas em secretar insulina e da sensibilidade tecidual à ação da insulina. Vários métodos têm sido estudados para a avaliação desses parâmetros.

O HOMA (*homeostasis model assessment*) é um índice matemático, facilmente obtido utilizando glicemia e insulinemia de jejum, para estimar a resistência à insulina (HOMA-IR) e a capacidade funcional das células beta pancreática (HOMA-B) (LÓPEZ et al, 2008). Apresenta boa correlação com o método do *clamp* euglicêmico hiperinsulinêmico, considerado padrão-ouro na medida da sensibilidade à insulina, tornando-se uma alternativa às técnicas mais sofisticadas e trabalhosas para a utilização nas pesquisas clínicas (GELONEZE e TAMBASCIA, 2006), pois embora essa não seja a técnica com maior acurácia existente, ela representa uma ferramenta útil para estudos populacionais, em virtude da facilidade de sua aplicação e da correlação forte e significativa com as técnicas diretas de avaliação da RI e da capacidade das células beta observadas na maioria dos trabalhos de validação (VASQUES et al, 2008).

Baseado em dados da literatura foram construídas curvas relacionando glicemia no estado de homeostasia, com a resposta insulínica em indivíduos saudáveis e naqueles com variados graus de comprometimento da função da célula beta. Em resumo, o modelo prediz a insulinemia e glicemia para uma dada sensibilidade e capacidade de secreção de insulina. Inversamente, se conhecidas simultaneamente a glicemia e a insulinemia, o modelo pode fornecer os índices HOMA-IR e HOMA-B pelas equações (GELONEZE e TAMBASCIA, 2006):

$$\text{HOMA-IR} = \text{glicemia de jejum (mg/dl)} \times \text{insulinemia de jejum } (\mu\text{U/mL}) / 405$$

$$\text{HOMA-B} = 20 \times \text{insulinemia jejum (mU/L)} / (\text{glicemia jejum (mmol/L)} - 3,5)$$

(Fatores de conversão do sistema internacional de unidades para unidade métrica: insulina, pmol/L = $\mu\text{IU/mL} \times 7.175$; glicose, mmol/L = $\text{mg/dL} \times 0.0555$)

O valor considerado para o HOMA-IR foi obtido do estudo BRAMS (*BRAZilian Metabolic Syndrome study*), que considera $>2,71$ (valor absoluto) o ponto de corte para o diagnóstico de resistência à insulina.

Para o HOMA-B o valor referencial para indivíduos com concentração normal de glicose é de 100 % (VASQUES et al, 2008). Contudo, para indivíduos magros que apresentam uma alta sensibilidade à insulina, a análise isolada desse índice pode levar a falsas conclusões, visto que eles apresentam uma redução compensatória da função das células beta. Por exemplo, caso a sensibilidade seja dobrada (200%), ocorre redução em 50%.

Os testes de tolerância oral à glicose (TTOG) são métodos de referência para determinar a sensibilidade à glicose pelas células beta e a sensibilidade dos tecidos à insulina, principalmente quando utilizados índices baseados em modelos como o IGI (insulinogenic index), medida da secreção de insulina estimulada por glicose que reflete a função e a massa das células beta pancreáticas (INGELSSON, 2010). É calculado através da fórmula:

$$IGI = (Ins \text{ Tx} - Ins \text{ T0}) / (Gli \text{ Tx} - Gli \text{ T0})$$

Sendo que: Gli T0: glicemia de jejum (mg/dL); Gli Tx: glicemia em algum tempo pós-prandial, Ins T0: insulinemia de jejum ($\mu\text{U/mL}$); Ins Tx: insulina em algum tempo pós-prandial.

A razão IGI/HOMA-IR fornece uma medida ajustada da função da célula beta, responsável por variações na sensibilidade à insulina (LÓPEZ et al, 2008).

A área sob a curva para a glicose (AUCg) e para a insulina (AUCi) foi determinada utilizando os tempos 0, 30, 60, 90, 120 e 150 minutos.

A razão da área sob a curva da insulina e da glicose $AUCi/AUCg$ é correlacionada significativamente com a sensibilidade a glicose e é um parâmetro para descrever o processo de secreção da célula beta (LÓPEZ et al, 2008).

Como durante os TTOG a ingestão pura de glicose não equivale aos eventos metabólicos que ocorrem durante uma refeição mista, optamos por uma dieta líquida, mas composta por carboidratos e lipídeos como descrito previamente (HANSEN et al, 2011).

4.6. Análise estatística

Os resultados para as variáveis contínuas foram fornecidos como média \pm desvio padrão. A AUC foi calculada para a glicemia e insulina, utilizando a regra trapezoidal. Para avaliar as diferenças entre os grupos foi utilizado o teste de Mann Whitney ou teste t para as variáveis contínuas e para as variáveis qualitativas o teste de Fisher ou o teste do qui-quadrado para tendência linear quando aplicável. ANOVA *two-way* foi utilizada para análise de variâncias entre os grupos e nos diferentes tempos de curva das variáveis contínuas, com pós-teste de Bonferroni para determinar onde as diferenças ocorreram quando possível. Todas as comparações estatísticas foram consideradas significantes com $p < 0,05$. As análises estatísticas foram realizadas utilizando Graphpad Prism 5 (versão 5.01, graphpad software, San Diego, USA).

FIGURA SUPLEMENTAR

Figura suplementar - Distribuição dos polimorfismos com verificação do equilíbrio de Hardy-Weinberg. n: número de indivíduos. A análise foi feita utilizando o teste do qui-quadrado (χ^2).

Polimorfismo	Observado		Esperado		Equilíbrio de H-W
	n	%	N	%	
GG	18	72	17,64	70,48	
GC	6	24	6,72	26,88	<i>P=0,866</i>
CC	1	4	0,64	2,56	

5. RESULTADOS

Os resultados serão apresentados na forma de um artigo científico, para ser submetido à publicação em um periódico indexado ao Medline, American Journal of Physiology: Endocrinology and Metabolism, classificado na categoria MEDICINA I da CAPES como Qualis A1, apresentando a totalidade dos resultados dessa dissertação.

Influência da variação genotípica Glu354Gln do receptor para o GIP sobre a homeostase glicêmica e a sensibilidade insulínica em indivíduos saudáveis.

Resumo

Objetivo: Avaliar a sensibilidade insulínica e a função das células beta pancreáticas em pacientes conforme a presença do polimorfismo no gene para o receptor do polipeptídeo insulínico dependente de glicose (GIPR).

Metodologia: Foram estudados 25 adultos (12 mulheres, 13 homens) com IMC<30 e sem doenças relacionadas à síndrome metabólica. Foram coletadas amostras de sangue nos tempos basal (T0) e após refeição contendo 58g de carboidratos e 28g de lipídeos a cada 30 minutos até o T150, para dosagem de insulinemia e glicemia. Foi realizada pesquisa da variante Glu354Gln para o GIPR (SNP-*GIPR*, rs1800437) em amostra de sangue periférico pela técnica de PCR-RFLP e avaliada a homeostase glicêmica de jejum e pós-prandial através dos cálculos de HOMA-IR, HOMA-B, área sob a curva de insulina e glicose e sua razão (AUC_i/AUC_g), índice insulínico (IGI) em cada tempo relativo ao basal e razão IGI/HOMA-IR.

Resultados: Na curva pós-prandial, 72% dos indivíduos apresentaram picos de glicose e 64% de insulina até o T60, com média de 107 mg/dl e 42,1 UI/mL, respectivamente. A pesquisa do SNP-*GIPR* revelou alelo C presente (C+, polimórfico) em 7 indivíduos, com 72% dos genótipos GG, 24% GC e 4% CC. Houve diferença significativa entre C+ e o grupo com alelo C ausente (C-) em relação ao HOMA-B (100+/-26 vs 160+/-189%, respectivamente; p=0,04). Não houve diferença estatisticamente significativa quanto aos seguintes parâmetros: AUC_g, AUC_i, HOMA-IR, IGI e razões AUC_i/AUC_g e IGI/HOMA-IR. Porém, em todos os tempos, o IGI foi superior no grupo C+ (T30, 189%; T60, 147%; T90, 1066%; T120, 29% e T150, 93%), enquanto que uma tendência semelhante ocorreu para a razão IGI/HOMA-IR exceto no T150. O indivíduo portador do SNP-*GIPR* em homozigose (CC) apresentou resposta precoce de insulina. Além disso, 42,9% dos indivíduos C+ apresentaram história familiar de diabetes em comparação com 22,2% o grupo C- (p=0,29).

Discussão: Estudamos o perfil de glicose e insulina de jejum e na curva pós-prandial incluindo 1ª e 2ª fases de secreção insulínica de uma amostra de indivíduos saudáveis com distribuição genotípica do SNP-*GIPR* semelhante à população reportada na literatura. Indivíduos euglicêmicos C+ e C- apresentaram semelhanças em diversos dos parâmetros utilizados para avaliar a função da célula beta pancreática e resistência insulínica. Por outro lado, foi encontrada variação no HOMA-B entre os genótipos estudados, sugerindo redução na função da célula beta relacionada ao polimorfismo do *GIPR*, sem alteração na sensibilidade à insulina e independente do histórico familiar de diabetes.

Conclusão: A redução do HOMA-B em indivíduos saudáveis, sem alteração na sensibilidade à insulina, sugere aprofundar o estudo deste SNP-*GIPR* como possível marcador precoce para o risco de falência pancreática associada ao diabetes tipo 2.

Palavras-chave: homeostase glicêmica, sensibilidade insulínica, receptor do polipeptídeo insulínico dependente de glicose, polimorfismo.

INTRODUÇÃO

O conceito de que a mucosa do trato gastrintestinal (TGI) contém uma grande quantidade de peptídeos regulatórios da alimentação é conhecido desde o início do século XX. As incretinas são hormônios secretados pelo trato gastrintestinal em resposta a ingestão de nutrientes, que levam ao aumento da secreção de insulina estimulada por glicose (BAGGIO e DRUCKER, 2007). Isso significa que elas atuam como amplificadores dos sinais da glicose e são responsáveis pela secreção de 50 a 70% da insulinemia pós-prandial no eixo êntero-insular (HANSOTIA e DRUCKER, 2005).

O GIP, *glucose-dependent insulintropic polypeptide* (polipeptídeo insulinoatrópico dependente de glicose), foi a primeira incretina descrita. É liberado pelas células K do duodeno e do jejuno proximal após a absorção de glicose e gordura (GIRARD, 2008). Após sua liberação, o GIP alcança a circulação para se ligar ao seu receptor nas células alvo (GIPR), sobretudo nas células beta pancreáticas, mas o RNAm transcrito do gene *GIPR* humano foi descrito em diversos outros tecidos, incluindo traquéia, sistema nervoso central, coração, trato gastrintestinal, baço, timo, células sanguíneas, pulmão, rim e osso e mais recentemente no córtex adrenal (LAMPRON et al, 2009). O gene *GIPR* humano está localizado no braço longo do cromossomo 19, é formado por 14 exons e contém uma sequência de 1398 pb que codifica uma proteína de 466-aa (FIGUEIREDO et al, 2010).

Recentemente, vêm sendo estudados os SNPs (single-nucleotide polymorphism) do gene *GIPR*. Foram demonstradas algumas variantes genéticas com função do receptor reduzida causada por alterações nos sítios de ligação ou por defeitos na ativação da cascata do receptor (FORTIN, SCHROEDER e BEINBOR, 2010), levando a alterações na resposta fisiológica do receptor e culminando em associações com doenças.

Nesse estudo, escolhemos o rastreamento para o SNP conservativo do exon 12 do *GIPR* rs1800437 G/C, também conhecido por Glu354Gln. Com esse polimorfismo, ocorre a mudança do aminoácido glutamato (Glu ou E) para glutamina (Gln ou Q) na posição 354 da proteína do GIPR, causada pela troca de uma guanina

(G) por citosina (C). Já foi demonstrada redução significativa da atividade basal do GIPR e também diminuição da expressão na membrana celular desse receptor causada por essa variante. Possivelmente essa mutação altera a estrutura do GIPR, que primariamente leva a um desequilíbrio do receptor e depois compromete indiretamente a interação dele com a proteína G (FORTIN, SCHROEDER e BEINBOR, 2010)

A possível variabilidade na resposta fisiológica hormonal após a alimentação relacionada à elevação do GIP pós-prandial entre indivíduos, associada à noção recente da existência de SNPs conferindo diferente atividade funcional às variantes do *GIPR*, incluindo alguns estudos em pessoas obesas que avaliaram a relação entre o polimorfismo rs1800437 com obesidade e insulinoresistência (SAUBER et al, 2010; VOGEL et al, 2009), fundamenta nosso estudo para avaliar a influência desse polimorfismo na homeostase glicêmica em indivíduos saudáveis.

A disfunção das células beta e a resistência insulínica são anormalidades metabólicas associadas na etiologia do diabetes mellitus tipo 2, uma condição clínica de alta prevalência que tem em sua patofisiologia interligação com hipertensão arterial, obesidade e outras doenças cardiovasculares, levando a síndrome metabólica que representa uma epidemia com impacto na saúde pública do mundo todo (UTSUNOMIYA, 2012).

Por ser uma condição de alta prevalência e complicações, além de ser um marcador para outros processos patológicos, a avaliação de fatores que podem interferir sobre a homeostase glicêmica e a função das células beta, determinando alteração na secreção de insulina ou resistência à sua ação tecidual, é de alta relevância clínica e epidemiológica, sobretudo em indivíduos saudáveis, antes do desenvolvimento de doenças, daí a importância da busca de um marcador genético para o diagnóstico precoce.

SUJEITOS E MÉTODOS

Indivíduos

O recrutamento foi realizado por amostragem intencional dos indivíduos de modo consecutivo. A amostra foi constituída por 25 participantes, com média de idade $26,6 \pm 6,75$ anos, 12 do sexo feminino e 13 do sexo masculino, atendidos nos ambulatórios de endocrinologia do Hospital das Clínicas da Universidade Estadual

de Londrina e por outros voluntários da instituição, no período de agosto de 2011 até abril de 2012.

Todos os indivíduos apresentavam IMC (índice de massa corpórea) menor que 30, sem história prévia de Diabetes Mellitus, hipertensão arterial, dislipidemia ou qualquer comorbidades ou uso de medicações que interferissem na homeostase glicêmica.

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos (CEP/UEL 024/2011) e os participantes assinaram termo de consentimento após terem sido esclarecidos sobre seus propósitos.

Protocolo do experimento

Todos os pacientes foram submetidos a 10 horas de jejum e à punção de veia periférica com instalação de via de acesso para coleta de sangue pré-prandial (Tempo basal ou T0), seguida da ingestão de 100g de leite NAN pro 1 (Nestlé Brasil Ltda), composto de 58 g de carboidratos e 28 g de gorduras (HANSEN et al., 2011), dissolvido em 300ml de água, com coleta de sangue nos tempos 30, 60, 90, 120 e 150 minutos contados a partir do início da refeição (tempos T30, T60, T90, T120 e T150).

Foi aplicado questionário com perguntas referentes ao uso de medicações, doenças prévias e história familiar em parentes de primeiro grau de diabetes. Para a realização dos exames, os pacientes permaneceram acomodados em posição sentada. Inicialmente foi verificado o peso e a altura e depois aferido a pressão arterial e frequência cardíaca no basal e a cada 30 minutos.

A insulina foi dosada no soro através de quimioluminescência (Insulina Architect, Abbott Park, Illinois, USA), realizada no Architect i2000SR (Abbott Park, Illinois, USA), valor de referência de 2,5 a 25 μ U/mL. A glicemia foi dosada pelo método da hexoquinase (Dimension Gluc, Siemens, Friemley, Camberley, UK) realizada no Dimension clinical chemistry system (Siemens, Friemley, Camberley, UK), valor de referência de 70 a 99 mg/dl. Também foi coletada amostra de 4 mL de sangue venoso periférico em tubos previamente tratados com EDTA, para extração do DNA.

Pesquisa de variante do gene *GIPR*

O DNA genômico foi extraído a partir de 200 µl de sangue periférico utilizando kit de extração de DNA Biopur (Biometrix Diagnostica, Curitiba, Brasil), conforme as normas do fabricante. Um fragmento de 245 pb do exon 12 do gene *GIPR* foi amplificado no termociclador (Multigene OptiMAX, Labnet, Edison, USA) por PCR em 30 ciclos com temperatura de anelamento de 62°C. A sequência utilizada para o *primer sense* foi: 5'-ATT ACC GGC GGT TGA GAG G-3' e *primer anti-sense*: R 5'-CTG GAA GGA GCT GAG GAA GA-3' (VOGEL et al, 2009). A reação de PCR foi realizada em volume final de 25 µl, contendo 2,5 µM de cada *primer* (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, USA), 2,5 U Taq polimerase, 50 mM de MgCl₂, 1,25 mM de dNTP (Invitrogen) e 100ng de DNA. Para a determinação do genótipo SNP rs1800437 G/C (Glu354Gln; E354Q) foi utilizada a enzima de restrição BssSI (Biolabs, Ipswich, New England). Através da visualização no gel de acrilamida, cada amostra foi classificada de acordo com a ausência ou presença do sítio de restrição, resultando em 1 banda (245 pb) para o alelo C (mutante) ou 2 bandas (95 e 150) para o alelo G (selvagem), respectivamente.

Avaliação da homeostase glicêmica

O HOMA (*homeostasis model assessment*) foi utilizado para estimar a resistência à insulina (HOMA-IR) e a capacidade funcional das células beta pancreáticas (HOMA-B), através das fórmulas: HOMA-IR= glicemia de jejum (mg/dl) X insulinemia de jejum (µU/mL)/405. HOMA-B= 20X insulinemia de jejum (mU/L) / (glicemia de jejum (mmol/L) –3,5). (Fatores de conversão do sistema internacional de unidades para unidade métrica: insulina, pmol/L = µU/mL X 7.175; glicose, mmol/L = mg/dL X 0.0555)

O IGI (*insulinogenic index*) foi calculado através da fórmula: IGI = (Ins Tx – Ins T0) / (Gli Tx- Gli T0). Sendo que: Gli T0: glicemia de jejum (mg/dL); Gli Tx: glicemia em algum tempo pós-prandial, Ins T0: insulinemia de jejum (µU/mL) e Ins Tx: insulina em algum tempo pós-prandial.

A área sob a curva para a glicose (AUCg) e para a insulina (AUCi) foi determinada utilizando os tempos 0, 30, 60, 90, 120 e 150 minutos. As razões da área sob a curva da insulina e da glicose AUCi/AUCg e IGI/HOMA-IR também foram calculadas.

Análise estatística

Os resultados para as variáveis contínuas foram fornecidos como média \pm desvio padrão. A AUC foi calculada para a glicemia e insulina, utilizando a regra trapezoidal. Para avaliar as diferenças entre os grupos foi utilizado o teste de Mann Whitney ou teste *t* para as variáveis contínuas e para as variáveis qualitativas o teste de Fisher ou o teste do qui-quadrado para tendência linear quando aplicável. ANOVA *two-way* foi utilizada para análise de variâncias entre os grupos e nos diferentes tempos de curva das variáveis contínuas, com pós-teste de Bonferroni para determinar onde as diferenças ocorreram quando possível. Todas as comparações estatísticas foram consideradas significantes com $p < 0,05$. As análises estatísticas foram realizadas utilizando Graphpad Prism 5 (versão 5.01, graphpad software, San Diego, USA).

RESULTADOS

Foram avaliados no total 25 indivíduos, sendo 52 % do sexo masculino e 48% do sexo feminino, adultos e sem obesidade pela classificação do IMC. Apesar da diferença estatística encontrada no IMC entre os sexos, os valores da média de ambos os grupos são classificados como eutrófico pela classificação do IMC (tabela 1), com valor mínimo de 21 e 19 Kg/m², valor máximo de 27 e 24 Kg/ m², mediana de 23 e 20 Kg/m², respectivamente para homens e mulheres. A maioria dos participantes não apresentava história familiar de diabetes (72%), e a média de glicemia de jejum foi menor que 100 mg/ dl e 2 horas pós prandial $103 \pm 11,6$ (IC 95%: 98,5 – 108) mg/dl.

A pesquisa do SNP-*GIPR* revelou o alelo C presente em 7 indivíduos, sendo 1 em homozigose (CC) e 6 em heterozigose (CG). A distribuição dos genótipos foi de 72% para GG, 24% CG e 4% CC (figura 1) e a frequência para o alelo G foi de 84% e para o alelo C de 16%. Não houve diferença na presença do polimorfismo entre os sexos, 2 homens e 5 mulheres apresentaram alelo C presente (C+) (p 0,15). O princípio de Hardy-Weinberg foi utilizado para confirmar que as frequências genotípicas dos polimorfismos na nossa amostra estavam em equilíbrio genético (p 0,866).

História familiar para diabetes não diferiu entre os grupos, foi positiva em 42,9% dos indivíduos com alelo C+ em comparação com 22,2% daqueles sem

polimorfismo (C-) (p 0,29) (Painel 1). Também não houve diferença no histórico de diabetes nos familiares entre homens e mulheres (p 0,15).

Na curva pós-prandial, a maioria dos pacientes atingiu o pico até o T60, sendo 72% para a glicemia e 64% para a insulina. A média mais elevada para a glicemia foi no T30, $107 \pm 14,9$ (IC 95%: 101 – 113) mg/dl e para a insulina no T60, $42,1 \pm 26,1$ (IC 95%: 31,3 – 52,9) μ U/ml (figura 2).

A análise da média da glicose e da insulina não demonstrou diferença significativa entre os grupos de polimorfismo em nenhum dos tempos, porém o teste de Bonferroni identificou diferenças significativas em determinados tempos em relação ao basal, e a diferença foi mais acentuada nas curvas dos indivíduos C- em relação à dos C+, tanto na glicose quanto na insulina (Figura 3A). A avaliação dos tempos de pico de glicemia e insulinemia também não foi diferente entre os genótipos, no entanto, houve maior tendência do grupo C+ em apresentar os picos mais precocemente (glicemia $p=0,37$; insulina $p=0,24$) (Figura 3B). Quando analisamos em cada tempo a média da glicose e da insulina, considerando apenas os indivíduos que atingiram o pico naquele tempo, também não demonstramos variação de acordo com o polimorfismo (glicemia $p=0,74$; insulina $p=0,44$) (Figura 3C). A média da glicemia e da insulinemia máxima atingida no pico entre os grupos não foi diferente (Tabela 2). De maneira isolada, o único indivíduo com o genótipo CC, apresentou um aumento já no T30 de mais de 10 vezes na insulinemia, passando de $9,1 \mu$ U/ml no T0 para $105,5 \mu$ U/ml no T30 (Figura suplementar).

Não houve diferença significativa na AUC da glicemia e da insulina em relação à presença do alelo C e quando a sensibilidade à insulina foi analisada, o HOMA-IR também não foi relacionado ao polimorfismo (Tabela 2).

Na avaliação das medidas relacionadas à função das células beta, o HOMA-B foi significativamente relacionado com o SNP, com o grupo alelo C presente apresentando média inferior ao grupo sem o alelo C (Tabela 2). No entanto, os demais cálculos para avaliação das células beta não demonstraram diferença significativa entre os grupos para a razão AUC_i/AUC_g (Tabela 2) e para o IGI 30 (C- vs C+: $1,8 \pm 1,1$ vs $5,2 \pm 5,6$; p 0,13). Porém, em todos os tempos o IGI foi superior no grupo alelo C presente em 189% (T30), 147% (T60), 1066% (T90), 29% (T120) e 93% (T150), enquanto que uma tendência semelhante ocorreu para a razão IGI/HOMA-IR exceto no T150, 192% (T30), 147% (T60), 9400% (T90), 170% (T120) (Figura 4).

DISCUSSÃO

O presente estudo evidenciou uma associação do polimorfismo pesquisado com redução do HOMA-B mesmo em indivíduos saudáveis. A associação das variações genéticas do *GIPR* com alterações do metabolismo da glicose e insulina ainda permanece controversa, apesar de estudos de fisiologia demonstrarem um papel claro do *GIPR* na regulação do peso e na homeostase glicêmica (SAUBER et al, 2010).

O desenho do estudo foi elaborado para a análise das curvas de resposta pós-prandial de insulina e glicemia em diversos tempos, e por isso o número de indivíduos foi menor do que a amostragem utilizada em estudos epidemiológicos. Mesmo assim, nossa amostra (n=25) apresentou distribuição genotípica semelhante à população reportada na literatura, sendo a maior parte (72 % indivíduos) caracterizada pelo genótipo homocigoto comum (GG), comparável a outros resultados de Vogel e colaboradores (2009) que encontraram a frequência de 77,5 % para o alelo G e de 22,5% para o alelo C nos 588 pacientes do grupo controle do seu trabalho.

A proporção de indivíduos com história familiar positiva para diabetes foi maior no grupo portador do polimorfismo, embora não tenhamos encontrado diferença significativa dentro do grupo estudado, provavelmente relacionado ao número de indivíduos constituintes da nossa amostra e, portanto, a questão permanece aberta para futuros estudos. Além do diabetes, outros autores relacionam essa herança genética com obesidade. Um trabalho com crianças alemãs com obesidade e suas famílias, o alelo G do polimorfismo do *GIPR* rs1800437 foi mais frequente nas crianças obesas (78,7 %) e nos adultos (79,6%) que nos controles (77,5 %) e, apesar de não significativa (p 0,076), houve maior tendência de transmissão do G alelo na obesidade infantil (VOGEL et al, 2009). No presente trabalho, a obesidade não foi o objetivo do estudo, porém realizamos a comparação dos valores de IMC com alguns parâmetros clínicos. Foi observado IMC mais elevado nos homens, entretanto não houve associação deste índice com o polimorfismo, nem com antecedente de diabetes na família. Consideramos que a variação do peso entre homens e mulheres, apesar da diferença estatística, não tem

relevância clínica, pois nenhum participante apresentou obesidade pela classificação do IMC.

A maior parte dos nossos voluntários apresentaram concentrações plasmáticas máximas de glicose e insulina até 60 minutos após alimentação, tempo já relatado como dependente da função da célula beta e da sensibilidade à insulina nos tecidos periféricos em indivíduos não diabéticos (GHIO et al, 2012). Nenhum dos participantes apresentou intolerância à glicose ou diabetes durante a realização do teste, e houve um aumento em média de 4 vezes o valor basal na insulinemia.

Baseado nos valores de glicose e insulina de jejum e na curva pós-prandial incluindo 1ª e 2ª fases de secreção insulínica em indivíduos saudáveis, utilizamos fórmulas matemáticas para avaliar a função da célula beta pancreática (AUC_i/AUC_g, HOMA-B e IGI/HOMA-IR) e a sensibilidade insulínica (HOMA-IR). Nossos resultados demonstraram redução do HOMA-B associada ao polimorfismo rs1800437 do *GIPR*, sem diferença no HOMA-IR, sugerindo que a função das células beta pancreáticas em indivíduos heterozigotos ou homozigotos raros apresenta-se menos eficaz na secreção de insulina em jejum do que nos indivíduos homozigotos comuns. Apesar da diferença na função secretória, não foi encontrada diferença na sensibilidade à insulina entre os grupos do nosso estudo. Resultados semelhantes também foram reportados em um estudo de mulheres com diabetes gestacional com outros polimorfismos diabetogênicos (WANG et al, 2011).

Apesar do GIP atuar na célula beta após a alimentação para estimular a liberação de insulina, já foi demonstrada redução significativa da atividade basal do GIPR e também diminuição da expressão na membrana celular desse receptor causada por essa variante. Possivelmente essa mutação muda a estrutura do GIPR, que primariamente leva a um desequilíbrio do receptor e depois compromete indiretamente a interação dele com a proteína G (FORTIN, SCHROEDER e BEINBOR, 2010). Em algumas variações do GIPR, o efeito do receptor ativado pode estar presente mesmo em jejum sem a necessidade da ligação do hormônio incretínico ao receptor (SAUBER et al, 2010). Este efeito poderia contribuir para o nosso resultado de HOMA-B que consiste da interpretação de insulina e glicemia de jejum, momento em que a concentração sanguínea de GIP é menos pronunciada.

O papel do *GIPR* como gene candidato para a deficiência de insulina também foi relatado pela meta-análise MAGIC (Meta-Analyses of Glucose and Insulin-related traits Consortium) publicada por Saxena e colaboradores (2010). Neste trabalho, foi

identificada a associação de um outro polimorfismo do *GIPR* (rs10423928) com o aumento de glicose no T120 e uma resposta deficiente de insulina no teste de tolerância oral à glicose. Este polimorfismo está localizado em uma região intrônica, com potencial efeito em regular a função do polimorfismo exônico rs1800437 alvo do nosso trabalho. Um dado interessante advindo de nossa amostra foi a análise das curvas do único indivíduo homocigoto raro (CC). Em comparação à insulinemia basal, sua curva de resposta apresentou um aumento precoce de mais de 10 vezes, sugerindo uma alteração na sensibilidade à insulina nesse indivíduo pela resposta hormonal excessiva. Estudos com maior número de homocigotos raros são necessários para investigar a possível relação entre resistência insulínica e polimorfismo do *GIPR*.

Um estudo com crianças e adolescentes de Berlim não conseguiu evidenciar associação de alguns polimorfismos do *GIPR* com obesidade, mas encontrou associação significativa entre a presença em homocigose do alelo C do SNP rs1800437 e um elevado índice no HOMA-IR (valor acima do percentil 95) na população de obesos. Como a redução do efeito do GIP costuma levar à melhora do metabolismo glicêmico, esse aumento do HOMA-IR pode demonstrar, inversamente, a maior eficácia da sinalização do *GIPR*. Desta forma, presença do SNP descrito nos indivíduos homocigotos raros seria responsável por um ganho de função do *GIPR* (SAUBER et al., 2010).

Apesar de não significativa, o IGI, medida da secreção de insulina estimulada por glicose que reflete a função e a massa das células beta pancreáticas (INGELSSON, 2010), foi superior no grupo alelo C+ em todos os tempos e uma tendência semelhante ocorreu para a razão IGI/HOMA-IR, que fornece uma medida ajustada da função da célula beta, responsável por variações na sensibilidade à insulina (LÓPEZ et al, 2008). Ao fazer a associação com o achado de diminuição do HOMA-B, sugerimos a falência das células beta pancreáticas no jejum, mas com a preservação do aumento compensatório da insulina pós-prandial para manter a euglicemia nos indivíduos com alelo C+. Este fato também foi observado em um estudo que avaliou a relação do SNP rs2287019 do *GIPR* com obesidade, que demonstrou uma associação de glicemia de jejum mais elevada e normalização da glicemia após 2 horas no TTOG com a variante relacionada ao IMC mais elevado, sugerindo uma contribuição da variação da secreção de insulina pós-prandial causada pelo GIP com o aumento do peso (SPELIOTES et al, 2010).

É fato que a função das células beta pancreáticas já estão reduzidas em mais de 50% ao diagnóstico de diabetes mellitus tipo 2, e que essa perda pode ser iniciada até 10-12 anos antes de confirmada a doença (MASAJTIS-ZAGAJEWSKA et al, 2013). Além disso, uma análise de pacientes diabéticos com o polimorfismo rs1800437 revelou uma associação marginal com doença cardiovascular (NITZ et al, 2007). A diferença encontrada no HOMA-B, pode revelar o SNP como candidato a marcador genético relacionado ao diabetes a ser utilizado precocemente, mesmo antes de alteração na glicemia ou desenvolvimento de complicações. O diabetes mellitus é considerado um problema de saúde pública com alta prevalência, em ascendência e oneroso do ponto de vista sócio-econômico (GEORG, 2005). A análise do custo do tratamento demonstra a significativa carga econômica da doença para o sistema de saúde, além de que o diabetes é preditor clínico para agravamento dos casos, gerando maior custo (MARINHO, 2011), demonstrando a importância do rastreamento em indivíduos assintomáticos.

No nosso trabalho, a amostra foi selecionada com o cuidado de manter a mesma proporção entre homens e mulheres, bem como uma homogeneidade nos diversos parâmetros clínicos (Tabela 1). Porém, como a genotipagem consistiu de um dos objetos de nosso estudo, não tendo sido realizada previamente como critério de seleção, foram detectados 6 indivíduos heterozigotos (GC) e apenas um homozigoto raro (CC). O pequeno número de indivíduos portadores do alelo C consistiu numa limitação do nosso estudo, o que diminuiu o poder estatístico da análise comparativa entre os grupos.

Nosso trabalho demonstrou que a variação genotípica Glu354Gln para o *GIPR* está envolvida com a disfunção das células beta pancreáticas. A redução do HOMA-B mesmo em indivíduos saudáveis, independente do histórico familiar de diabetes, coloca esse SNP como possível marcador precoce para o risco de falência pancreática associada ao DM-2. Futuros estudos com maior número de participantes, incluindo uma população de diabéticos devem ser realizados para confirmar nossa evidência.

REFERÊNCIAS

BAGGIO, L.L., DRUCKER, D.J. Biology of incretins: GLP-1 and GIP. **Gastroenterology**, v. 132, n. 6, p. 2131-2157, maio, 2007.

FIGUEIREDO, C.P. et al. Role of the glucose-dependent insulinotropic polypeptide and its receptor in the central nervous system: therapeutic potential in neurological diseases. **Behav. Pharmacol.**, v. 21, n. 5-6, p. 394-408, set, 2010.

FORTIN, J.P., SCHROEDER, J.C., ZHU, Y., BEINBOR, M., KOPIN, A.S. Pharmacological characterization of human incretin receptor missense variants. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 332, n. 1, p. 274-280, jan, 2010.

GEORG, A. et al. Análise econômica de programa para rastreamento do diabetes mellitus no Brasil. **Rev. Saúde Pública**, São Paulo, v. 39, n. 3, p. 452-460, jun, 2005.

GHIO, A., et al. 1-Hour OGTT Plasma Glucose as a Marker of Progressive Deterioration of Insulin Secretion and Action in Pregnant Women. **Int. J. Endocrinol.**, v. 2012. Disponível em: <<http://www.hindawi.com/journals/ije/2012/460509>>.

GIRARD, J. The incretins: from the concept to their use in the treatment of type 2 diabetes. Part A: incretins: concept and physiological functions. **Diabetes Metab.**, v. 34, n. 6, p. 550- 559, 2008.

HANSEN, K.B., et al. Increased postprandial GIP and glucagon responses, but unaltered GLP-1 response after intervention with steroid hormone, relative physical inactivity, and high-calorie diet in healthy subjects. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 96, n. 2, p. 447-453, fev, 2011.

HANSOTIA, T., DRUCKER, D.J. GIP and GLP-1 as incretin hormones: lessons from single and double incretin receptor knockout mice. **Regul. Pept.** v. 15, n. 2, p. 125-134, jun, 2005.

INGELSSON, E. et al. Detailed physiologic characterization reveals diverse mechanisms for novel genetic Loci regulating glucose and insulin metabolism in humans. **Diabetes**, v. 59, n. 5, p. 1266-75, mai, 2010.

LAMPRON, A. et al. Regulation of aldosterone secretion by several aberrant receptors including for glucose-dependent insulinotropic peptide in a patient with an aldosteronoma. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 94, n. 3, p. 750-756, mar, 2009.

LÓPEZ, S. et al. Distinctive postprandial modulation of beta cell function and insulin sensitivity by dietary fats: monounsaturated compared with saturated fatty acids. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 88, n. 3, p. 638-644, set, 2008.

MARINHO, M. et al. Análise de custos da assistência à saúde aos portadores de diabetes melito e hipertensão arterial em uma unidade de saúde pública de referência em Recife - Brasil. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.**, v. 55, n. 6, p. 406-411, ago, 2011.

MASAJTIS-ZAGAJEWSKA, A., et al. Influence of hemodialysis on incretin hormones and insulin secretion in diabetic and non-diabetic patients. **Int. Urol. Nephrol.**, v. 45, n. 6, p. 1733-1740, dez, 2013.

NITZ, I., et al. Association analyses of GIP and GIPR polymorphisms with traits of the metabolic syndrome. **Mol. Nutr. Food Res.** v. 51, n.8, p.1046-1052, aug, 2007.

SAUBER, J., et al. Association of variants in gastric inhibitory polypeptide receptor gene with impaired glucose homeostasis in obese children and adolescents from Berlin. **Eur. J. Endocrinol.**, v.163, n. 2, p. 259-264, ago, 2010.

SAXENA, R., et al. Genetic variation in GIPR influences the glucose and insulin responses to an oral glucose challenge. **Nat. Genet.**, v. 42, n. 2, p 142-148, fev, 2010.

SPELIOTES EK, et al. Association analyses of 249,796 individuals reveal 18 new loci associated with body mass index. **Nat Genet.**, v. 42, n. 11, p. 937-948, nov, 2010.

VOGEL, C.L. et al. Gastric inhibitory polypeptide receptor: association analyses for obesity of several polymorphisms in large study groups. **BMC. Med. Genet.**, v. 2, n.10, p. 274-280, mar, 2009.

UTSUNOMIYA, K. Treatment strategy for type 2 diabetes from the perspective of systemic vascular protection and insulin resistance. **Vasc. Health. Risk Manag.**, v. 8, p. 429-436, 2012.

WANG, Y., et al. Association of six single nucleotide polymorphisms with gestational diabetes mellitus in a Chinese population. **PLoS. One.**, v. 6, n.11, nov, 2011. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/PMC3224026/>.

Tabela 1 - Características basais dos participantes. Os dados são fornecidos como média \pm desvio padrão. IMC: índice de massa corpórea; HF: história familiar de diabetes. A análise estatística foi realizada utilizando o teste *t* e o teste de Fisher para HF.

Número de participantes	25	Masculino	Feminino	<i>p</i>
Sexo (feminino/masculino)	12/13	13	12	
Idade (anos)	26,6 \pm 6,75	26,38 \pm 7,64	26,83 \pm 5,95	0,87
IMC (kg/m²)	22,2 \pm 2,3	23,22 \pm 1,95	21,0 \pm 2,13	0,01
HF (positiva/negativa)	7/18	2/11	5/7	0,15
Glicemia de jejum (mg/dl)	93,1 \pm 8,93	92,46 \pm 9,07	93,75 \pm 9,12	0,72
Insulinemia de jejum (μU/ml)	11,1 \pm 4,78	10,92 \pm 1,52	11,19 \pm 1,17	0,89

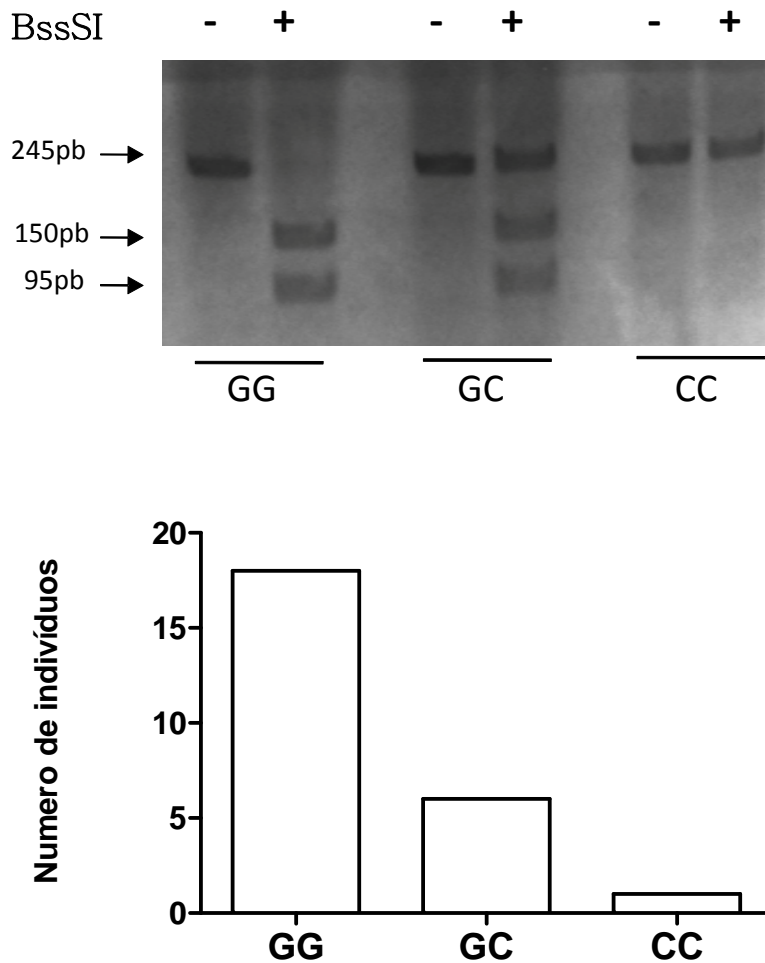
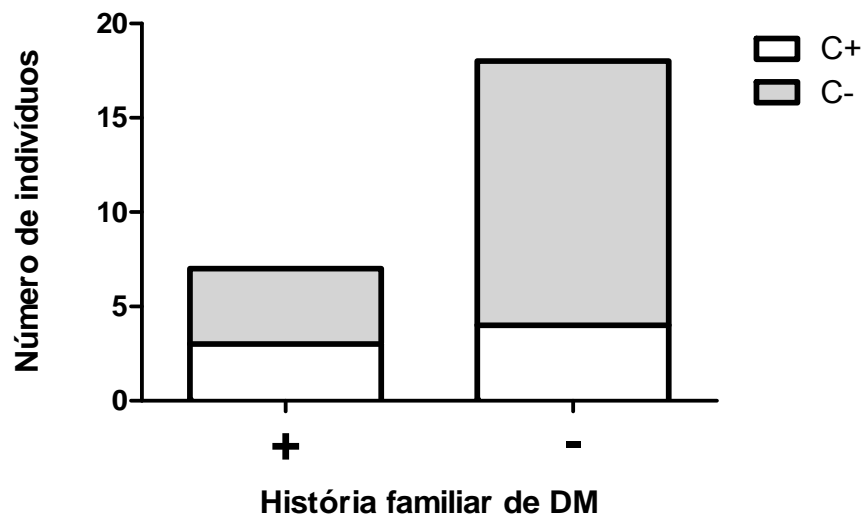


Figura 1 - Análise da pesquisa para o polimorfismo rs1800437 do *GIPR*. Resultado da digestão enzimática, mostrando os fragmentos tratados (+) ou não (-) com a enzima de restrição BssSI. Descrição do número de participantes conforme o resultado da genotipagem do *GIPR* por PCR-RFLP, considerando todos os 25 indivíduos saudáveis do estudo. pb: pares de bases.



HF	C-		C+		Total	
	N	%	N	%	N	%
Não	14	77,8	4	22,2	18	72
Sim	4	57,1	3	42,9	7	28
Total	18	72	7	28	25	100

Painel 1 - Avaliação da história familiar de diabetes de acordo com a presença do polimorfismo. Na figura encontra-se a distribuição da história familiar (HF) de diabetes presente (+) ou ausente (-). Na tabela, estão demonstradas as frequências em número absoluto e em porcentagem em relação à presença ou ausência da HF. A análise foi feita utilizando o teste de Fisher, $p= 0,29$. Diabetes Mellitus (DM), C+: alelo C presente, C-: alelo C ausente.

Tabela 2 - Associações entre os genótipos do *GIPR* e os parâmetros da homeostase glicêmica e da função da célula beta. Os dados são fornecidos como média \pm desvio padrão. AUCg: área sob a curva da glicose, AUCi: área sob a curva da insulina, HOMA-IR: *homeostasis model assessment* para insulinoresistência, HOMA-B: *homeostasis model assessment* para função da célula beta, Ins max: insulina máxima, Gli max: glicose máxima. A análise estatística foi realizada utilizando o teste *t*, sendo considerado estatisticamente significativo (*) quanto $p < 0,05$.

	C+	C-	P
AUCg	15580 \pm 406.8	15300 \pm 359.8	0,65
AUCi	4706 \pm 555.7	5001 \pm 618.6	0,78
AUCi/AUCg	0,30 \pm 0,082	0,32 \pm 0,16	0,47
HOMA-IR	2,7 \pm 1,3	2,2 \pm 0,38	0,24
HOMA-B	100 \pm 26	160 \pm 189	0,04*
Ins max (UI/ml)	52,29 \pm 9,727	53,13 \pm 6,764	0,94
Gli max (mg/dl)	112,3 \pm 4,185	114,6 \pm 3,042	0,68

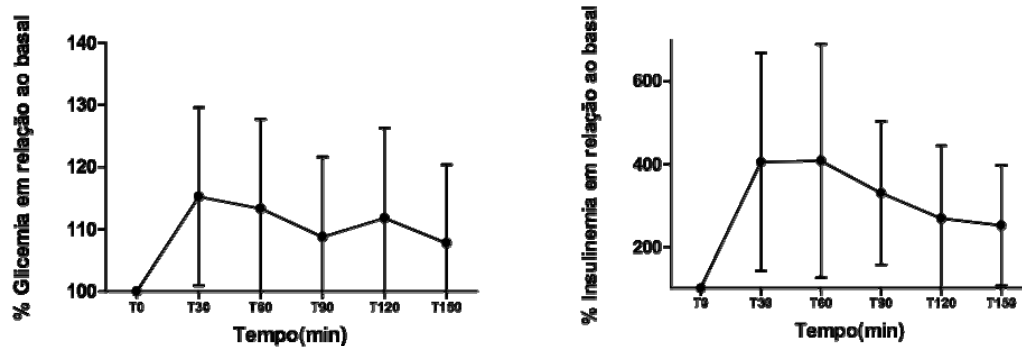
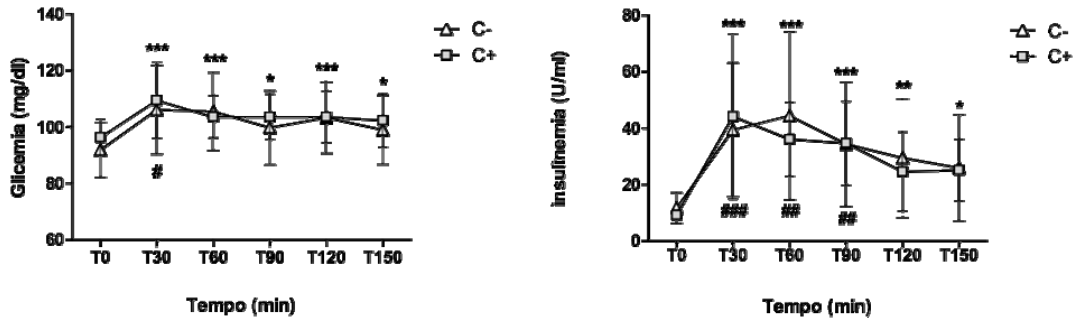
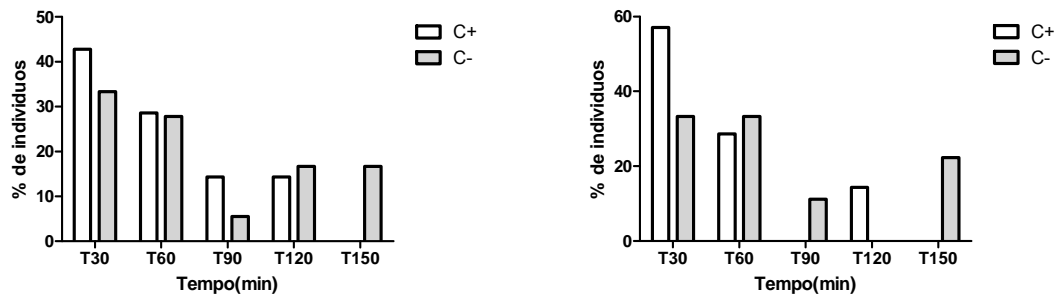


Figura 2 - Curva de glicemia e insulinemia dos 25 indivíduos saudáveis participantes do estudo. A curva foi elaborada com as médias da porcentagem da glicemia e insulinemia pós-prandias em relação ao basal (100%), considerando todos os pacientes ao longo dos tempos do estudo. Os dados são fornecidos como média \pm desvio padrão.

A



B



C

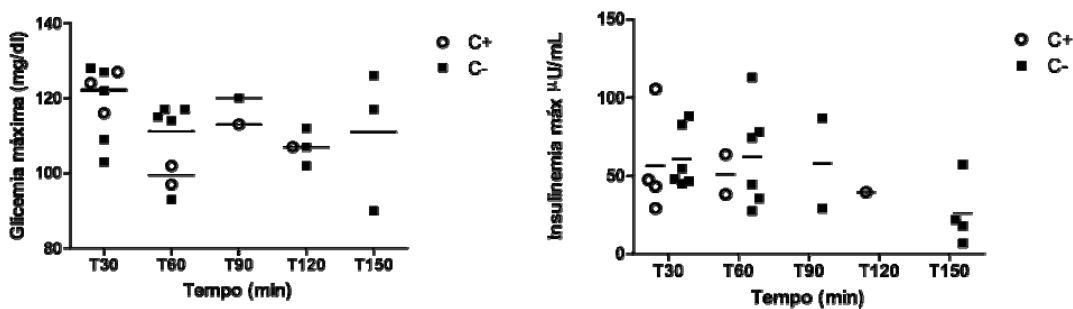


Figura 3 - Avaliação da glicemia e insulina pós-prandial conforme a presença do polimorfismo. 3A) Curva da média de glicemia e insulinemia conforme o polimorfismo. Os dados são fornecidos como média \pm desvio padrão. A análise estatística foi realizada utilizando ANOVA *two way* e pós-teste de Bonferroni para os grupos C- (*) e C+ (#). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. 3B) Avaliação da % de indivíduos que atingiram o pico de glicemia e de insulinemia em cada tempo pós-prandial conforme o polimorfismo. A análise estatística foi realizada utilizando o teste do qui-quadrado para tendência linear. 3C) Concentrações sanguíneas máximas de glicose e insulina da totalidade dos indivíduos em diagrama pontual (*dot plot*), representadas no tempo correspondente ao pico atingido por cada indivíduo. A análise foi realizada utilizando ANOVA *two way* e pós-teste de Bonferroni.

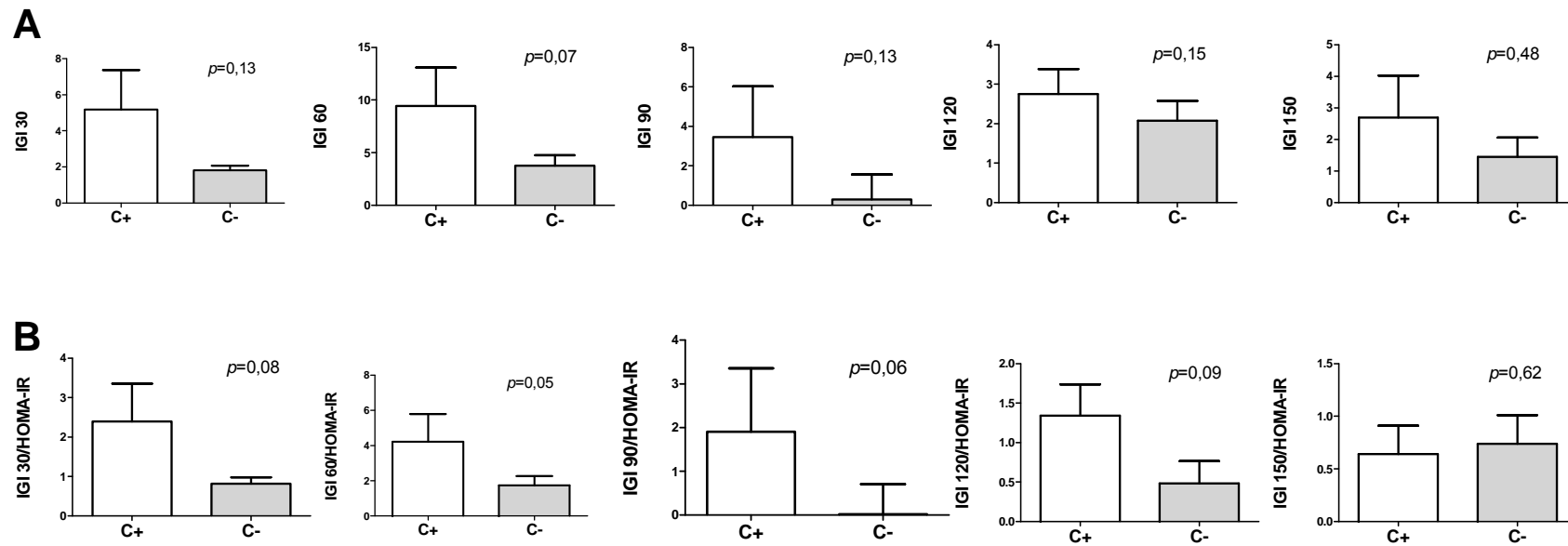
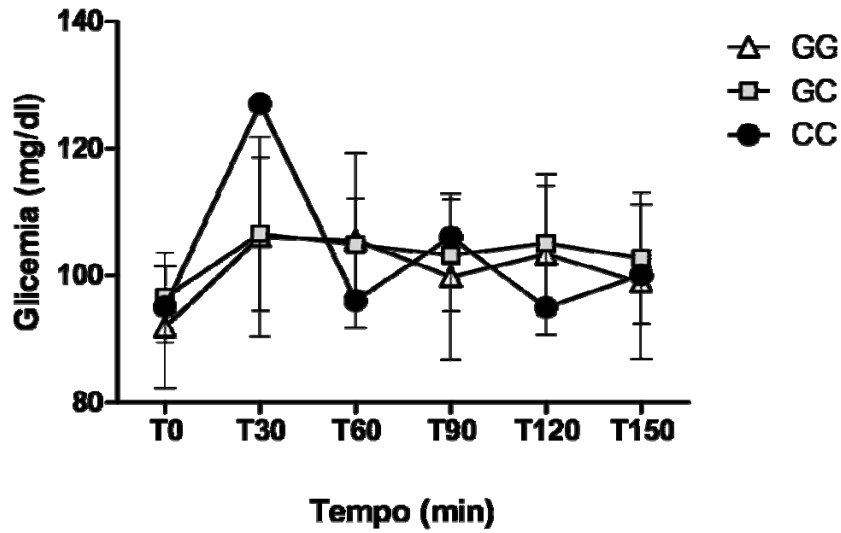


Figura 4 - Associação entre os genótipos do receptor para o GIP e os índices de função da célula beta IGI e IGI/HOMA-IR. Os dados são fornecidos como média \pm desvio padrão. A análise estatística foi realizada utilizando o teste *t* sendo o valor de *p* indicado em cada gráfico.

FIGURA SUPLEMENTAR

A



B

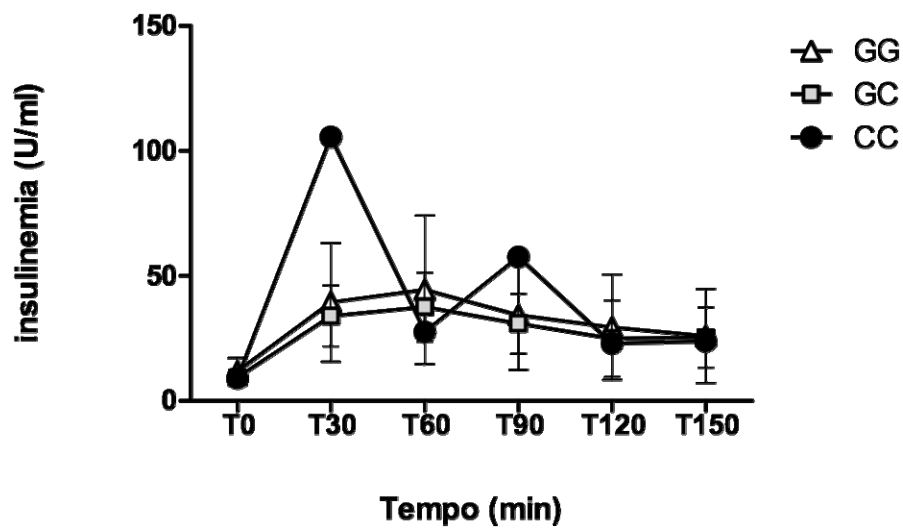


Figura suplementar - Avaliação da curva de glicemia e insulina demonstrando separadamente os 3 genótipos para o polimorfismo do *GIPR*. Os dados são fornecidos como média \pm desvio padrão em cada tempo, exceto os pontos da amostra CC ($n=1$). A análise estatística foi realizada utilizando ANOVA com pós-teste de Bonferroni.

6. CONCLUSÕES

- 1) A variação genotípica Glu354Gln encontrada em nossa amostra de indivíduos hígidos possui frequência semelhante às reportadas anteriormente na literatura.
- 2) Na avaliação da curva pós-prandial, houve em média um predomínio do pico precoce de glicemia com 30 minutos após alimentação, seguido pelo da insulinemia aos 60 minutos.
- 3) Essa variante genética do *GIPR* não se relacionou com o histórico familiar em parentes de 1º grau com diabetes mellitus.
- 4) A influência do polimorfismo estudado sobre o metabolismo da glicose e da insulina foi verificada com a redução do HOMA-B nos indivíduos portadores do alelo polimórfico C+, fato que se relaciona com a diminuição da função das células beta pancreáticas, em um estágio anterior ao desenvolvimento de doenças, uma vez que todos os estudados são saudáveis.
- 5) Em relação aos índices pós-prandiais, os indivíduos portadores do alelo C+ apresentaram uma tendência de IGI e IGI/HOMA-IR superior aos indivíduos com alelo C-.
- 6) Não houve correlação da presença do alelo C do polimorfismo com a resistência à insulina.

7. REFERÊNCIAS

- ASMAR, M., et al. On the role of glucose-dependent insulintropic polypeptide in postprandial metabolism in humans. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.**, v. 298, n. 3, p. 614-621, mar, 2010.
- BAGGIO, L.L., DRUCKER, D.J. Biology of incretins: GLP-1 and GIP. **Gastroenterology**. v. 132, n. 6, p. 2131-2157, maio, 2007.
- CARVALHEIRA, J.B.C., ZECCHIN, H.G., SAAD, M.J.A. Vias de Sinalização da Insulina. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.**, v. 46, n. 4, p. 419-425, ago, 2002.
- CARVALHEIRA, J.B.C.; SAAD, M.J.A. Doenças associadas à resistência à insulina/hiperinsulinemia, não incluídas na síndrome metabólica. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.**; v. 50, n. 2, p. 360-367, abr. 2006.
- CARVALHO, M.H.C.; COLAÇO, A.L.; ORTES, Z.B. Citocinas, disfunção endotelial e resistência à insulina. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.**, v. 50, n. 2, p. 304-312, abr. 2006.
- FIGUEIREDO, C.P. et al. Role of the glucose-dependent insulintropic polypeptide and its receptor in the central nervous system: therapeutic potential in neurological diseases. **Behav. Pharmacol.**, v. 21, n. 5-6, p. 394-408, set, 2010.
- FORTIN, J.P., SCHROEDER, J.C., ZHU, Y., BEINBOR, M., KOPIN, A.S. Pharmacological characterization of human incretin receptor missense variants. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 332, n. 1, p. 274-280, jan, 2010.
- GELONEZE, B.; TAMBASCIA, M.A. Avaliação laboratorial e diagnóstico da resistência insulínica. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.**, v. 50, n.2, p. 208-215, abr. 2006.
- GEORG, A. et al. Análise econômica de programa para rastreamento do diabetes mellitus no Brasil. **Rev. Saúde Pública**, São Paulo, v. 39, n. 3, p. 452-460, jun, 2005.
- GHIO, A., et al. 1-Hour OGTT Plasma Glucose as a Marker of Progressive Deterioration of Insulin Secretion and Action in Pregnant Women. **Int. J. Endocrinol.**,v. 2012. Disponível em: <<http://www.hindawi.com/journals/ije/2012/460509>>. Acesso em: 4 de janeiro de 2014
- GIRARD, J. The incretins: from the concept to their use in the treatment of type 2 diabetes. Part A: incretins: concept and physiological functions. **Diabetes Metab.**, v. 34, n. 6, p. 550- 559, 2008.

GREMLICH, S. et al. Cloning, Functional Expression, and Chromosomal Localization of the Human Pancreatic Islet Glucose-Dependent Insulinotropic Polypeptide Receptor. **Diabetes**. v. 44, p. 1202-1208, out, 1995.

HANSEN, K.B., et al. Increased postprandial GIP and glucagon responses, but unaltered GLP-1 response after intervention with steroid hormone, relative physical inactivity, and high-calorie diet in healthy subjects. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 96, n. 2, p. 447-453, fev, 2011.

HANSOTIA, T., DRUCKER, D.J. GIP and GLP-1 as incretin hormones: lessons from single and double incretin receptor knockout mice. **Regul. Pept.** v. 15, n. 2, p. 125-134, jun, 2005.

HABER, E.P. et al. . Secreção da insulina: efeito autócrino da insulina e modulação por ácidos graxos. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.**, v. 45, n. 3, p. 219-227, Jun, 2001.

INGELSSON, E. et al. Detailed physiologic characterization reveals diverse mechanisms for novel genetic Loci regulating glucose and insulin metabolism in humans. **Diabetes**, v. 59, n. 5, p. 1266-75, mai, 2010.

KIM, W., EGAN, J.M. The role of incretins in glucose homeostasis and diabetes treatment. **Pharmacol. Rev.** v. 60, n. 4, p. 470-512, dez, 2008.

LAMPRON, A. et al. Regulation of aldosterone secretion by several aberrant receptors including for glucose-dependent insulinotropic peptide in a patient with an aldosteronoma. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 94, n. 3, p. 750-756, mar, 2009.

LÓPEZ, S. et al. Distinctive postprandial modulation of beta cell function and insulin sensitivity by dietary fats: monounsaturated compared with saturated fatty acids. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 88, n. 3, p. 638-644, set, 2008.

LYNN, F.C. et al. A novel pathway for regulation of glucose-dependent insulinotropic polypeptide (GIP) receptor expression in beta cells. **Faseb J.**, v. 17, n. 1, p. 91-93, nov, 2003.

MARINHO, M. et al. Análise de custos da assistência à saúde aos portadores de diabetes melito e hipertensão arterial em uma unidade de saúde pública de referência em Recife - Brasil. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.**, v. 55, n. 6, p. 406-411, ago, 2011.

MASAJTIS-ZAGAJEWSKA, A., et al. Influence of hemodialysis on incretin hormones and insulin secretion in diabetic and non-diabetic patients. **Int. Urol. Nephrol.**, v. 45, n. 6, p. 1733-1740, dez, 2013.

MAZZUCO TL, et al. Ectopic expression of the gastric inhibitory polypeptide receptor gene is a sufficient genetic event to induce benign adrenocortical tumor in a xenotransplantation model. **Endocrinology**, v. 147, n. 2, p. 782-790, fev, 2006.

MEIER, J.J. et al. Stimulation of insulin secretion by intravenous bolus injection and continuous infusion of gastric inhibitory polypeptide in patients with type 2 diabetes and healthy control subjects. **Diabetes**, v. 53, n. S3, p. 220-224, dec, 2004.

NITZ, I., et al. Association analyses of GIP and GIPR polymorphisms with traits of the metabolic syndrome. **Mol. Nutr. Food Res.** v. 51, n.8, p.1046-1052, aug, 2007.

PAMIR, N. et al. Glucose-dependent insulinotropic polypeptide receptor null mice exhibit compensatory changes in the enteroinsular axis. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.**, v. 284, n. 5, p. 931-939, jan, 2003.

SAUBER, J., et al. Association of variants in gastric inhibitory polypeptide receptor gene with impaired glucose homeostasis in obese children and adolescents from Berlin. **Eur. J. Endocrinol.**, v.163, n. 2, p. 259-264, ago, 2010.

SAXENA, R., et al. Genetic variation in GIPR influences the glucose and insulin responses to an oral glucose challenge. **Nat. Genet.**, v. 42, n. 2, p 142-148, fev, 2010.

SOUZA, M.A. **Densidade mamária e polimorfismo do gene do receptor estrogênico em mulheres com mamas densas após a menopausa.** 2012. 155 fls. Dissertação (mestrado) - Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, Programa de Obstetrícia e Ginecologia.

SPELIOTES EK, et al. Association analyses of 249,796 individuals reveal 18 new loci associated with body mass index. **Nat Genet.**, v. 42, n. 11, p. 937-948, nov, 2010.

VASQUES, A.C.J.; et al. Análise crítica do uso dos índices do Homeostasis Model Assessment (HOMA) na avaliação da resistência à insulina e capacidade funcional das células-beta pancreáticas. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.**, v. 52, n. 1, p. 32-39, abr. 2008.

VOGEL, C.L. et al. Gastric inhibitory polypeptide receptor: association analyses for obesity of several polymorphisms in large study groups. **BMC. Med. Genet.**, v. 2, n.10, p. 274-280, mar, 2009.

UTSUNOMIYA, K. Treatment strategy for type 2 diabetes from the perspective of systemic vascular protection and insulin resistance. **Vasc. Health. Risk Manag.**, v. 8, p. 429-436, 2012.

WANG, Y., et al. Association of six single nucleotide polymorphisms with gestational diabetes mellitus in a Chinese population. **PLoS. One.**, v. 6, n. 11, nov, 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3214026>>.