

2.02.05 - Genética Humana e Médica.

POLIMORFISMO GENÉTICO DA ENZIMA DIPEPTIDIL PEPTIDASE IV EM IDOSOS PORTADORES OU NÃO DE DIABETES MELLITUS TIPO 2

Elisa de S. Alves^{1*}, Audrey C. Tonet-Furioso², Adriane D. Henriques², Clayton F. Moraes², Otávio T. Nóbrega³

1. Estudante de IC da Faculdade de Ceilândia da UnB

2. Pesquisador (a) da Faculdade de Medicina da UnB

3. FCE/FM-UnB / Orientador

Resumo:

Polimorfismos genéticos da dipeptidil peptidase IV (DPP IV) vêm sendo associados com diabetes mellitus tipo 2 (DM2), sobretudo em idosos. O objetivo do trabalho foi investigar a associação de polimorfismo genético desta enzima com DM2 em amostra de pacientes idosos.

Analisaram-se características clínicas, antropométricas e fisiológicas; dados bioquímicos e variáveis relacionadas ao estilo de vida de 338 idosos de ambulatórios de geriatria do Distrito Federal. Genótipos produzidos pelo polimorfismo rs3788979 do gene da DPP IV foram determinados por meio de reação em cadeia da polimerase convencional seguida de restrição enzimática.

Houve variação dos níveis de glicemia e hemoglobina glicada séricas dos pacientes conforme os genótipos de DPP IV, mas não foi encontrada associação entre os genótipos e a ocorrência de DM2. Nosso resultado corrobora que variações genéticas dessa enzima podem afetar a homeostase glicêmica, ainda que não determinante para a ocorrência de DM2.

Autorização legal: Aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP); CAAE: 42256214.4.3001.0065.

Palavras-chave: Proteinase; envelhecimento; genética.

Apoio financeiro: Fundação de Apoio à Pesquisa do Distrito Federal.

Trabalho selecionado para a JNIC pela instituição: Universidade de Brasília (UnB).

Introdução:

Sabe-se que a população mundial tem se tornado cada vez mais envelhecida, o que tem imprimido importantes mudanças no perfil epidemiológico da população, com alterações relevantes nos indicadores de morbimortalidade, como um aumento na prevalência de doenças crônicas, entre elas, o diabetes^{1,2}.

O diabetes mellitus tipo 2 (DM2) é uma condição crônica na qual o organismo produz insulina, mas é resistente à ação da mesma. Ao longo do tempo, os níveis de insulina se tornam insuficientes e a combinação da resistência à insulina com a deficiência na sua produção leva à hiperglicemia^{3,4}.

Dipeptidil peptidase IV (DPP IV) é uma serina protease ubiquitária encontrada na forma solúvel no plasma ou como um componente de membrana de diversas células, que possui uma atividade catalítica que remove os dipeptídeos N-terminais com prolina ou alanina na penúltima posição de vários substratos peptídicos. A DPP IV é amplamente distribuída nos tecidos, como pulmões, baço, fígado e rins^{5,6,7}.

A DPP IV transmembranar é clivada e liberada na circulação na forma solúvel (sDPP-4) para ser implicada na rápida degradação de incretinas, como o peptídeo semelhante a glucagon-1 (glucagon-like peptide-1, GLP-1) e o polipeptídeo gástrico inibitório (gastric inhibitory polypeptide, GIP), os quais possuem um papel essencial na homeostase da glicose⁹. Essas incretinas são liberadas em resposta a uma refeição, estimulam a secreção de insulina e suprimem a de glucagon (de maneira glicose-dependente), atrasam o esvaziamento gástrico e aumentam a saciedade¹⁰.

A DPP IV ganhou maior importância na comunidade médica e científica após a introdução de medicamentos inibidores da DPP-IV para o tratamento de DM2, as chamadas gliptinas⁸. Sabe-se que fatores genéticos desempenham um importante papel no desenvolvimento do DM2¹¹, mas há ainda poucos estudos direcionados a identificar modificações no gene DPP IV e sua associação com essa condição⁸. Vale ressaltar que DPP IV é um preditor de resistência à insulina e tem um papel fundamental na fisiopatologia do DM2, por regular incretinas. Alguns polimorfismos de DPP IV mostraram estar associados com DM2 e/ou com os níveis plasmáticos de sDPP-4⁹, mas são necessários mais estudos para confirmar essas associações.

O presente estudo teve como objetivo investigar a associação de polimorfismo genético da enzima dipeptidil peptidase IV (DPP IV) com a ocorrência do diabetes mellitus tipo 2 em amostra de pacientes idosos ambulatoriais do Distrito Federal.

Metodologia:

A amostra do estudo inclui 338 pacientes com 60 anos ou mais, incluídos entre 2011 e 2013 em dois ambulatórios de clínica geriátrica localizados no Distrito Federal, Brasil. Foi feito o levantamento da presença de DM2 por meio de auto-relato da condição confirmada por aspecto clínico em anamnese e/ou por

hemoglobina glicada em jejum $\geq 6,5\%$ ¹², além da presença de hipertensão arterial sistêmica. Mediram-se os valores de pressão sanguínea sistólica e diastólica (mmHg), de acordo com princípios básicos de semiologia. Aspectos do estilo de vida foram analisados, sendo que os praticantes de exercícios físicos foram os que exibiram 30 minutos ou mais de exercícios durante ao menos 4 dias por semana¹³, e o hábito de fumar foi definido como consumo usual de cigarros¹⁴.

Na análise antropométrica, foi avaliado o índice de massa corporal (IMC, em kg/m^2), o qual foi definido conforme o habitual, e a circunferência da cintura (cm), que foi medida 2 cm acima da linha do umbigo.

Todos os pacientes foram genotipados para a transição A/G do gene DPP-IV (rs3788979). Para a identificação dos genótipos, um segmento do gene DPP-IV foi amplificado via reação em cadeia da polimerase (PCR). A termociclagem foi realizada em aparelho Biocycler MJ96+/MJ96G (Applied Biosystems, EUA). Produtos gerados por PCR foram submetidos à digestão por *Hae* III (Invitrogen, EUA), a 37 °C durante dez horas. Os padrões de restrição obtidos foram verificados por meio de eletroforese em gel de agarose a 2% a uma corrente constante de 80 volts, durante 20 minutos. São previstos três padrões de restrição: para o genótipo heterozigoto (A/G) são esperados três fragmentos distintos (298, 194 e 103 pares de base; pb), enquanto para o homozigoto G, prevêem-se dois fragmentos (194 e 103 pb). Para o homozigoto A, espera-se apenas o segmento de 298 pb. As amostras que geravam conflitos eram submetidas a PCR e digestão de confirmação.

As seguintes medidas foram obtidas de acordo com a bioquímica clínica de rotina: glicemia ($\text{mg}\cdot\text{dl}^{-1}$), hemoglobina glicada (HbA1c, %), colesterol total e frações ($\text{mg}\cdot\text{dl}^{-1}$), triglicérides ($\text{mg}\cdot\text{dl}^{-1}$), proteína C-reativa altamente sensível ($\text{mg}\cdot\text{dl}^{-1}$), clearance de creatinina ($\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$) e TSH ($\text{mIU}\cdot\text{l}^{-1}$).

Para avaliar a ocorrência de diferenças entre medidas clínicas, bioquímicas e antropométricas na amostra conforme genótipos de DPP IV, análises estatísticas compararam medidas de tendência central pelos testes *t* de Student ou de Mann-Whitney enquanto frequências foram comparadas pelo teste do qui-quadrado. A distribuição normal de todas as variáveis foi avaliada utilizando o teste de Shapiro-Wilk. Foi adotado $P \leq 0,05$ como limiar de significância. Todas as análises foram realizadas com o Pacote Estatístico para as Ciências Sociais para Windows (SPSS, versão 17.0).

Resultados e Discussão:

A Tabela 1 apresenta os resultados obtidos de acordo com os genótipos do polimorfismo de nucleotídeo único (SNP) rs3788979. Cerca de 79% dos pacientes apresentaram genótipo homozigoto para alelo G, e 21% correspondem aos demais genótipos.

A amostra apresentou padrão homogêneo quanto às características basais, como idade e gênero de acordo com os genótipos. Quanto às variáveis antropométricas, pressóricas, clínicas e de estilo de vida não foi observada diferença significativa entre os grupos. Houve variação dos níveis de glicemia e hemoglobina glicada séricas conforme os genótipos de DPP IV, com níveis aumentados entre homozigotos para o alelo G. No entanto, não foi encontrada diferença significativa na ocorrência de DM2 entre os pacientes dos dois grupos. As demais variáveis também não foram influenciadas pelo genótipo.

Tabela 1. Variáveis antropométricas, clínicas e metabólicas da amostra.

Variáveis	Genótipos rs3788979		P
	GG (n = 267)	A_ (n = 71)	
Idade, anos	79.3 \pm 8.7	78.8 \pm 9.8	0.699
Homens, %	31.1	28.2	0.667
IMC, $\text{kg}\cdot\text{m}^2$	26.9 \pm 4.9	27.2 \pm 5.6	0.648
CC, cm	96.3 \pm 11.5	94.4 \pm 12.4	0.248
PAS, mmHg	141.1 \pm 21.4	137.6 \pm 18.7	0.183
PAD, mmHg	78.2 \pm 11.4	76.6 \pm 11.5	0.298
HAS, %	74.9	80.3	0.434
Colesterol total, $\text{mg}\cdot\text{dl}^{-1}$	203.1 \pm 74.0	197.9 \pm 41.6	0.398
Triglicérides, $\text{mg}\cdot\text{dl}^{-1}$	134.6 \pm 64.5	126.8 \pm 44.0	0.196
HDL-c, $\text{mg}\cdot\text{dl}^{-1}$	51.8 \pm 12.7	51.2 \pm 15.0	0.769
Glicemia, $\text{mg}\cdot\text{dl}^{-1}$	105.1 \pm 29.4	99.6 \pm 14.5	0.046
HbA1c, %	6.1 \pm 0.8	5.8 \pm 0.6	0.010
DM2, %	24.0	18.3	0.344
Clearance de creatinina ($\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$)	59.5 \pm 25.7	55.4 \pm 24.5	0.225
PC-R, $\text{mg}\cdot\text{dl}^{-1}$	1.60 [3.00]	1.70 [2.90]	0.853
TSH, $\text{mIU}\cdot\text{l}^{-1}$	1.87 [2.10]	2.16 [2.28]	0.263

Sedentarismo, %	61.4	66.2	0.493
Fumo, %	18.4	19.7	0.864

Dados expressos como média \pm desvio-padrão para parâmetros contínuos normalmente distribuídos. IMC = índice de massa corporal; CC = circunferência de cintura; HbA1c = hemoglobina glicada A1c; DM2 = diabetes mellitus tipo 2; HDL-c = lipoproteína de alta densidade; PAS = pressão arterial sistólica; PAD = pressão arterial diastólica; HAS = hipertensão arterial sistêmica; PC-R = proteína C-reativa; TSH = hormônio tireóide-estimulante.

O DM2 é uma doença metabólica crônica com patogênese multifatorial¹⁵, e, embora a contribuição genética para essa condição seja bem reconhecida, as características das variantes que contribuem para sua variância genética permanecem longe de serem claras¹⁶. A associação entre os polimorfismos da DPP IV e o DM2 possui impacto ainda pouco reportado na literatura. Radwan e colaboradores⁹ observaram as frequências dos genótipos de dez SNPs de DPP IV em indivíduos malaios acometidos por DM2 comparados a um grupo controle, dos quais 3 demonstraram estar associados com essa condição clínica. No entanto, o SNP rs3788979 foi excluído do estudo, porque não apresentou significância quando comparado ao grupo controle.

Resultados semelhantes foram encontrados por Bouchard e colaboradores¹⁷, que realizaram a genotipagem de sete SNPs de DPP IV em amostra de indivíduos obesos e testaram a sua associação com fenótipos relacionados ao diabetes. Na primeira amostra analisada, os homocigotos para os alelos minoritários dos SNPs rs17848915 e rs7608798 apresentaram menor risco de hiperglicemia e diabetes, mas essa associação não foi replicada em uma segunda amostra.

Conclusões:

Após avaliação clínica e bioquímica, os testes estatísticos não revelaram associação do gene da DPP IV com a ocorrência de diabetes mellitus tipo 2. Nossos resultados, no entanto, demonstraram que o polimorfismo rs3788979 do gene DPP-IV interfere na fisiologia glicêmica de pacientes idosos contribuindo para alterações na homeostase da glicose, uma vez que houve variação significativa dos níveis de glicemia e de hemoglobina glicada séricas entre os diferentes genótipos de DPP IV, apesar de não determinante para a ocorrência do diabetes mellitus tipo 2.

Referências bibliográficas

- 1 - Department of Economic and Social Affairs. World Population Prospects: The 2015 Revision. New York: United Nations; 2015.
- 2 - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Sobre as condições de saúde nos idosos: indicadores selecionados. Indicadores sociodemográficos e de saúde no Brasil. Brasília: IBGE; 2009.
- 3 - International Diabetes Federation. IDF Diabetes Atlas. 7ª Ed. 2015.
- 4 - American Diabetes Association. Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. 2010; 33: S62-S69.
- 5 - Silva Júnior W. S., Godoy-Matos A. F., Kraemer-Aguiar L. G. Dipeptidyl Peptidase 4: A New Link between Diabetes Mellitus and Atherosclerosis? BioMed Research International. 2015.
- 6 - Lee S. A., Kim Y. R., Yang E. J., Kwon E-J, Kim S. H., Kang S. H., et al. CD26/DPP4 levels in peripheral blood and T cells in patients with type 2 diabetes mellitus. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism; 98 (6): 2553-2561, 2013.
- 7 - Lamers D., Famulla S., Wronkowitz N., Hartwig S., Lehr S., et al. Dipeptidyl peptidase 4 is a novel adipokine potentially linking obesity to the metabolic syndrome. Diabetes 60: 1917–1925, 2011.
- 8 - Röhrborn D., Wronkowitz N., Eckel J. DPP4 in diabetes. Frontiers in immunology; 6: 386, 2015.
- 9 - Ahmed, R. H., Huri, H. Z., Al-Hamodi, Z., Salem, S. D., Al-Absi, B., Muniandy, S. Association of DPP4 gene polymorphisms with type 2 diabetes mellitus in Malaysian subjects. PLoS One. 2016; 11: e0154369.
- 10 - Aschner P., Kipnes M. S., Lunceford J. K., Sanchez M., Mickel C., Williams-Herman D. E. Effect of the dipeptidyl peptidase-4 inhibitor sitagliptin as monotherapy on glycemic control in patients with type 2 diabetes. Diabetes care. 2006; 29 (12): 2632–7.
- 11 - Vazquez A. I., Klimentidis Y. C., Dhurandhar E. J., Veturi Y. C., Paérez-Rodríguez P. Assessment of Whole-Genome Regression for Type II Diabetes. PloS one. 2015; 10 (4): e0123818.
- 12 - American Diabetes A. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. Diabetes care. 2011; 34 Suppl 1:S62-9.
- 13 - DHHS DoHaHS. Physical Activity Guidelines Advisory Committee report, 2008. To the Secretary of Health and Human Services. Part A: executive summary. Nutrition reviews. 2009; 67 (2): 114-20.

- 14- Backinger C.L., Fagan P., O'Connell M. E., Grana R., Lawrence D., Bishop J. A., et al. Use of other tobacco products among U.S. adult cigarette smokers: prevalence, trends and correlates. *Addictive behaviors*. 2008; 33 (3): 472-89.
- 15 - Sanghera, D.K., Blackett, P.R. Type 2 Diabetes Genetics: Beyond GWAS. *Journal of diabetes & metabolism*. 2012; 3 (198): 6948.
- 16 - Morris, Andrew P.; Voight, Benjamin F. Large-scale association analysis provides insights into the genetic architecture and pathophysiology of type 2 diabetes. *Nature Genetics*. 2012; 44 (9): 981–990.
- 17 - Bouchard L., Faucher G., Tchernof A., Deshaies Y., Lebel S., Hould F-S, et al. Comprehensive genetic analysis of the dipeptidyl peptidase-4 gene and cardiovascular disease risk factors in obese individuals. *Acta diabetologica*. 2009; 46 (1): 13–21.