

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
DEPARAMENTO DE APOIO A PESQUISA
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA**

**AVALIAÇÃO DE MUTAÇÕES NO GENE DA ENZIMA GLICOQUINASE
EM PACIENTES PORTADORES DE MODY 2**

Bolsista: Daniela de Paula Almeida, CNPq

**MANAUS
2014**

AVALIAÇÃO DE MUTAÇÕES NO GENE DA ENZIMA GLICOQUINASE EM
PACIENTES PORTADORES DE MODY 2.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
DEPARTAMENTO DE APOIO A PESQUISA
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA**

**RELATÓRIO FINAL
PIB-B/0022/2013
AVALIAÇÃO DE MUTAÇÕES NO GENE DA ENZIMA GLICOQUINASE
EM PACIENTES PORTADORES DE MODY 2.**

Bolsista: Daniela de Paula Almeida, CNPq
Orientador: Prof. Doutor Adolfo José Mota
Coorientador(a): Profa. Mestre Deborah Laredo Jezini

**MANAUS
2014**

Todos os direitos deste relatório são reservados à Universidade Federal do Amazonas, ao Instituto de Ciências Biológicas, ao Departamento de Biotecnologia, ao Laboratório de Genética Humana e aos seus autores. Parte deste relatório só poderá ser reproduzida para fins acadêmicos ou científicos.

Esta pesquisa, financiada pelo Conselho Nacional de Pesquisa – CNPq, pelo Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica da Universidade Federal do Amazonas, foi desenvolvida pelo Laboratório de Genética Humana e se caracteriza como um projeto de pesquisa Estudo do MODY.

RESUMO

Além dos quadros clássicos do diabetes mellitus, existem várias síndromes diabéticas atribuídas à doença, droga ou condição específica, que levam a alteração na homeostase glicêmica. O diabetes da maturidade no jovem (MODY) é um dos tipos específicos de diabetes, diagnosticado graças aos avanços da Biologia Molecular. É um distúrbio genético de alta penetrância e de transmissão autossômico dominante, causado por mutação heterozigota em diversos genes envolvidos no metabolismo da glicose. No Brasil não existem muitos estudos a respeito, assim, nesse projeto avaliou-se por sequenciamento, mutações no gene da glicoquinase de uma família com hipótese diagnóstica de MODY2. Quando esta enzima não catalisa corretamente a fosforilação da glicose o portador da mutação apresentará os sintomas do MODY. Foram encontradas quatro mutações na região promotora que podem estar relacionadas com a síndrome metabólica.

ABSTRACT

According to the World Health Organization there are at least 346 million people worldwide suffering from some form of diabetes. Besides diabetes mellitus (DM) types 1 and 2, today a large number of gene mutations also result in hyperglycemia, causing monogenic DM. Maturity-onset diabetes of the young (MODY) is part of a heterogeneous group of DM caused by a single gene mutation and is characterized by autosomal dominant inheritance and primary defects of insulin secretion of pancreatic beta cells and non-insulin-dependent DM with a young age at diagnosis. MODY may account for up to 5% of all cases of DM, which are often not diagnosed or are misclassified. MODY is linked with mutations within 13 different genes. Among these, mutations in the glucokinase gene can cause MODY2. More than 600 SNPs have been described in this gene, including those in intron regions. This study was performed with 3 volunteers from the same household with a MODY2 diagnosis. We propose to identify the occurrence of mutations in the GCK gene by sequencing DNA of the volunteers. Mutations in the GCK gene were observed and we report three new mutations in the promoter gene, never described before.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	8
2 OBJETIVOS.....	10
2.1 Objetivo Geral	10
2.2 Objetivos Específicos	10
3 REVISÃO DA LITERATURA.....	111
4 MATERIAL E MÉTODOS	145
4.1 Grupo de Estudo.....	15
4.2 Coleta das Amostras e Extração do DNA Total	155
4.3 Amplificação por PCR e sequenciamento pelo método de Sanger.....	16
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	178
5.1 Resultados.....	Erro! Indicador não definido.8
5.2 Discussão.....	2Erro! Indicador não definido.
6 CONCLUSÃO	23
REFERÊNCIAS.....	24
ANEXOS	26

1 INTRODUÇÃO

Além dos quadros clássicos do diabetes mellitus (DM), existem tipos específicos de diabetes que englobam uma ampla variedade de síndromes diabéticas e que levam a uma alteração na homeostase da glicemia no organismo. O diabetes da maturidade no jovem (MODY), anteriormente classificado como um subtipo do diabetes tipo 2, é um dos tipos específicos de diabetes, que só passou a ser diagnosticado em virtude dos avanços na Biologia Molecular.

O MODY é definido como um diabetes familiar com idade precoce de diagnóstico (infância, adolescência ou adultos jovens) e não dependente de insulina. É um distúrbio genético de alta penetrância e modo de transmissão autossômico dominante, causado por mutação heterozigota em diversos genes envolvidos no metabolismo da glicose, denominados genes MODY (TINTO et al., 2008).

Dentre os 11 subtipos de diabetes tipo MODY determinados até o presente e descritos no OMIM (Online Mendelian Inheritance in Man), o subtipo 2 será discutido neste trabalho. Esta forma de MODY é causada por mutações no gene codificador para a enzima glicoquinase, que catalisa a primeira etapa do metabolismo da glicose, transformando esta em glicose-6-fosfato. As mutações neste gene promovem uma redução da atividade enzimática, reduzindo sua afinidade pela glicose, ou anulando completamente a atividade desta.

Nesse trabalho nos propomos, inicialmente, continuar um estudo recente, realizado por Mota e colaboradores (2013), que determinaram a ocorrência de uma mutação sem sentido no exon 2 do gene GCK de 23 voluntários de uma mesma família, todos com hipótese diagnóstica de MODY2. No entanto, durante o desenvolvimento da proposta inicial tivemos contato com uma outra família que apresentava os sintomas de Mody II, mas que ainda estava sem o

diagnóstico molecular. Uma vez que a descrição de novos casos com possíveis alterações não descritas tem um maior impacto na literatura, decidimos analisar o material genético desses novos pacientes.

O diagnóstico específico do MODY 2 é importante, pois tem impacto imediato no tratamento daquele paciente anteriormente diagnosticado como pré-diabético. Há o benefício em curto prazo para o paciente e em longo prazo para todo o sistema de saúde pública, seja por economia em medicamentos, seja pela diminuição dos gastos com exames de rotina para os casos clássicos, ou ainda, pela diminuição dos atendimentos de um grupo de pacientes que apresenta um quadro de hiperglicemia leve e que não tem caráter progressivo. Além disso, a avaliação genética de variantes que podem interferir na catálise enzimática, reduzindo ou anulando sua eficiência, irá enriquecer o banco de mutações pontuais e irá contribuir para o entendimento desse grupo de doenças que apesar de terem sido caracterizadas há mais de trinta anos ainda são pouco conhecidas.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Identificar mutações nos genes através do sequenciamento automático direto.

2.2 Objetivos Específicos

Sequenciamento do gene GCK de pacientes com hipótese diagnóstica de MODY2 para avaliar a existência de eventuais mutações de base única, novas ou já descritas na literatura como mutações causadoras do MODY.

3 REVISÃO DA LITERATURA

Várias são as doenças relacionadas ao metabolismo e o diabetes figura entre os principais males que afetam milhões de pessoas ao redor do mundo. A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima uma espécie de epidemia com pelo menos 190 milhões de pessoas em todo o mundo sofrendo de algum tipo de diabetes atualmente, com a possibilidade desse número praticamente dobrar até 2030 (BRASILSUS, 2014). No Brasil, segundo dados da Organização Mundial da Saúde (OMS) estima-se que o País teria 4,6 milhões de diabéticos em 2000 e 11,3 milhões no ano de 2030 (WILD et al., 2004).

Atualmente, baseado na etiologia e patogênese do diabetes, um comitê internacional de especialistas, endossado pela Associação Americana de Diabetes e pela Organização Mundial da Saúde, classificam o diabetes em (1) DM tipo 1, (2) DM tipo 2, (3) um terceiro grupo, conhecido como outros tipos de diabetes, que inclui os defeitos genéticos que afetam a função da célula β , e (4) um quarto grupo que inclui o diabetes gestacional. No terceiro grupo estão as formas monogênicas de DM conhecida como MODY (Maturity-Onset Diabetes of the Young), que hoje estão em evidência e são linhas de pesquisas sólidas, contribuindo muito para o diagnóstico de vários pacientes que apresentam quadros complexos de sintomatologia, situações nas quais não é possível se chegar a um diagnóstico conclusivo.

MODY, tipicamente diagnosticada antes dos 25 anos de idade, é uma forma dominante de diabetes, não cetogênica, não dependente de insulina, com alta penetrância e modo de transmissão autossômico dominante (KYITHAR et al., 2013). Este é um grupo heterogêneo de diabetes, pois o quadro clínico pode ser causado por mutações em diferentes genes, denominados por esse motivo de genes MODY. Até o momento, o fenótipo do MODY está relacionado com mutações em 11 diferentes genes (Henzen, 2012), o subtipo 2 será discutido nesse trabalho.

MODY 2 está relacionado com mutações no gene que codifica a glicoquinase (GCK), que faz parte da família de enzimas hexoquinase. O gene GCK, que está situado no cromossomo 7 e é composto por 10 exons, apresenta importante papel regulatório nas células beta e catalisa a primeira reação da via glicolítica, convertendo a glicose em glicose-6-fosfato (G6P), tendo assim, papel crucial na regulação da secreção de insulina (MATSCHINSKY, 2002). Até o momento, já foram identificadas mais de 600 mutações nesse gene, sendo que 200 já foram associadas ao quadro clínico do MODY2 (OSBAK et al., 2009).

Clinicamente, os pacientes MODY2 apresentam hiperglicemia leve, assintomática e estável, sendo que menos de 50% dos indivíduos podem ser classificados como portadores de diabetes mellitus pelos critérios clássicos adotados segundo a glicemia de jejum ou após o TOTG (Teste Oral de Tolerância à Glicose). Uma grande parcela destes indivíduos cursa com glicemias de jejum entre 100 e 140 mg/dL, e que após segunda hora do teste oral não mostra um incremento maior do que 90 mg/dL. Desta forma, o padrão clínico típico dos portadores de mutações no gene da glicoquinase se caracteriza por uma glicemia de jejum levemente alterada, intolerante à glicose no exame TOTG ou cujo diagnóstico de diabetes foi feito em situações "diabetogênicas". A grande maioria destes pacientes evolui com um bom prognóstico, apresentando uma relativa estabilidade do diabetes com o passar dos anos, não havendo uma piora do padrão metabólico na evolução, fato contrário ao que habitualmente observa-se nos diabéticos tipo 2 clássico. O tratamento se baseia em dieta e prática de atividade física, o uso de insulina não é indicado e hipoglicemiantes orais são ineficazes. Os portadores de MODY2 cursam com baixa prevalência de complicações crônicas vasculares, nefropatia e retinopatia quando comparados às outras formas de diabetes, provavelmente devido à sua leve hiperglicemia (OLIVEIRA et al., 2002).

Vaxillaire e Froguel (2008) definem os principais critérios para o diagnóstico como sendo: 1 – hiperglicemia normalmente observada antes dos 25 anos em pelo menos um e

idealmente dois membros da família; 2 – padrão de herança autossômica dominante, com transmissão vertical por pelo menos três gerações e com o fenótipo similar entre os membros afetados da família; 3 – ausência de insulinoterapia por pelo menos cinco anos antes do diagnóstico; 4 – níveis normais de insulina. Os autores ainda observam que sobrepeso ou obesidade estão raramente associados ao MODY e não são relevantes no desenvolvimento dessa forma de diabetes, ao contrário do que acontece em crianças e adolescentes com DM tipo 2.

A prevalência de MODY não foi ainda definida, mas calcula-se que 2 a 5 % dos pacientes considerados como portadores de DM tipo 2 e cerca de 10% dos pacientes considerados do tipo 1 seriam, na verdade, portadores de MODY. A epidemiologia pode variar bastante; o MODY2 é o mais frequente na França e Itália, cerca de 60% contra 20% para o MODY 3. Entretanto, a situação se inverte na Inglaterra, Alemanha, Estados Unidos e Espanha; a exemplo, na Inglaterra pacientes MODY 3 respondem por 73% dos casos contra 11% de MODY 2 (MASSA et al., 2001). Outros aspectos interessantes da epidemiologia são a baixa prevalência em negros, e alta em caucasianos (LEDERMAN, 1995).

Acredita-se que o MODY represente de 2-5% de todos os casos de DM, a dificuldade em se estabelecer a casuística é que frequentemente estes casos não são diagnosticados ou são classificados erroneamente, como DM tipo 1 ou 2 (HENZEN, 2012). Todavia, é de fundamental importância estabelecer o diagnóstico para o tipo específico de MODY, pois tem implicações diretas na conduta médica quanto ao tratamento apropriado, visando evitar complicações futuras e ajudando a identificar o risco de diabetes em outros membros da família que ainda não apresentaram sintomas. Por este motivo, o principal objetivo deste trabalho é identificar a ocorrência de mutações em pacientes com hipótese diagnóstica de MODY 2.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Grupo de Estudo

Participam desse estudo três voluntários de uma mesma família sendo que destes, dois apresentavam o quadro clínico para o MODY2. Os voluntários foram devidamente orientados sobre o objetivo do estudo, sobre o que é a doença e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido. O presente projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos do Instituto de Biologia da Universidade de São Paulo, sob o número IBUSP 113/210 – FR 387425. Os resultados deste trabalho científico foram aceitos para publicação na edição de Julho de 2014 do Indian Journal of Medical Research and Pharmaceutical Sciences.

4.2 Coleta das Amostras e Extração do DNA Total

As amostras foram coletadas por fricção com swab (Catch-all sample collection swabs) durante 10 segundos em toda área direita ou esquerda da mucosa bucal. Após o esfregão, o swab foi lavado em 500 µL da solução de lise (50 mM Tris-Cl pH 7,5, 100 mM EDTA, 1% SDS) contida num tubo plástico (tipo Eppendorf).

As amostras foram incubadas a 65° C por 10 minutos. Em seguida, foi acrescentado às amostras 250 µL de 5 M de acetato de amônio. Os tubos permaneceram no gelo por 20 minutos antes de serem centrifugados a 7.500 g por 5 minutos para remoção do lisado celular. O sobrenadante foi coletado e transferido para outro tubo plástico contendo 750 µL de isopropanol. O sistema foi homogeneizado e mantido em congelador a -20°C por 30 minutos. Os tubos foram centrifugados por 15 minutos a 7.500 g. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado

duas vezes com 200 μ L de etanol 80% e centrifugação 5 minutos a 7.500 g. Os tubos permaneceram abertos em temperatura ambiente para a completa evaporação do etanol. O precipitado foi suspenso em 30 μ L de tampão TE-RNase (10mM TE, pH 7,5, 10 μ g.mL⁻¹ RNAs). Alíquotas de 2 μ l dos produtos de extração foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio para confirmação da extração.

4.3 Amplificação por PCR e Sequenciamento pelo Método de Sanger

Para uma cobertura satisfatória dos 10 exons do gene GCK, foram usados 14 iniciadores, conforme especificado na Tabela 1. A reação de amplificação foi realizada com o conjunto de reagentes GoTaq da Promega. Para uma reação com volume final de 25 μ l: 1X do tampão para PCR, 3 mM MgCl₂, 0,2 mM de dNTPs, 0,2 μ M de cada iniciador, 5 μ l do produto total de extração, 0,2 μ l de Taq DNA polimerase (5U/ μ l) e água ultrapura q.s.p. A ciclagem constou de 95°C 3 min, seguido de 35 ciclos: 95°C 20 s, 60°C 20 s, 72°C 1 min, seguido de um único ciclo a 72°C por 10 min.

Os amplicons foram clonados com o conjunto de reagentes TopoTa Cloning, seguindo as recomendações do fabricante. Os clones obtidos foram inoculados em caldo LB (BD) acrescido de ampicilina (Sigma) para uma concentração final de 50 μ g por ml. Em seguida foram incubados a 37°C sob agitação por 16h. A mini preparação do DNA plasmidial (pDNA) foi realizada pelo método da lise alcalina (SAMBROOK et al., 2001).

A visualização dos produtos de extração, PCR e DNA plasmidial foram feitas em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio. Para visualização do complexo DNA/brometo de etídio foi utilizado um transluminador alimentado com lâmpadas UVB.

Duzentos nanogramas do pDNAs foram usados para o sequenciamento pelo método de Sanger. Para tanto, utilizou-se o conjunto de reagentes BigDye Terminator v 3.1 (Life Technologies). Para uma reação de 10 µl utilizou-se: 1µ de pDNA, 1X do tampão para sequenciamento; 0.5 µl da mistura para sequenciamento, 0.2 µM do primer e água q.s.p. Manteve-se a ciclagem padrão do fabricante: 95°C 15 s, 50 °C, 15 s, 60°C 2 min, 40 ciclos.

Os produtos do sequenciamento foram purificados por precipitação com 3M acetato de sódio e isopropanol. Em seguida foram ressuspendidas em formamida e determinadas no analisador automático de sequências por eletroforese capilar ABI 3130XL (Life Technologies).

As sequências foram editadas com o programa DNASTar II e comparadas com os bancos de sequências nucleotídicas humanas existentes no consórcio INSDC, utilizando a ferramenta BLAST (ALTSCHUL et al., 1997).

Tabela 1. Sequências dos iniciadores que serão utilizados no trabalho

Iniciador	Sequência	Tm °C	Localização Orientação
GCK1	CAAGGCGATTGAGTGGTCACCATG	60	Promotor - sense
GCK2	GGCAAGACCCTTCTCAAAGAGCC	60	Exon 1A - antisense
GCK3	AGCAGGCAGGAGCATCTCTG	60	Exon 1B - sense
GCK4	GAGGTGAGAAGCCTGGAGGC	60	Exon 1C - antisense
GCK5	TGCAGATGCCTGGTGACAGC	60	Exon 2 - sense
GCK6	GTCAGGACTAGCTGGGCCC	60	Exon 3 - antisense
GCK7	TAGCTTGGCTTGAGGCCGTG	60	Exon 4 - sense
GCK8	CCTTGAAGCCTGTTGTACACAGGG	60	Exon 6 - antisense
GCK9	GTTCCAGACAAAGCAGAGACAGGC	60	Exon 7 - sense
GCK10	CGTCTTTCCCTCGTTAATGAGCCAG	60	Exon 8 - antisense
GCK11	CTGGCTCATTAACGAGGGAAAGACG	60	Exon 8 - sense
GCK12	CTCTCGTTCTCCAGGGAGGG	60	Exon 9 - antisense
GCK13	CCCTCCCTGGAGAACGAGAG	60	Exon 9 - sense
GCK14	CTGAGGGAAGAGGCCCGC	60	Exon 10 - antisense

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Resultados

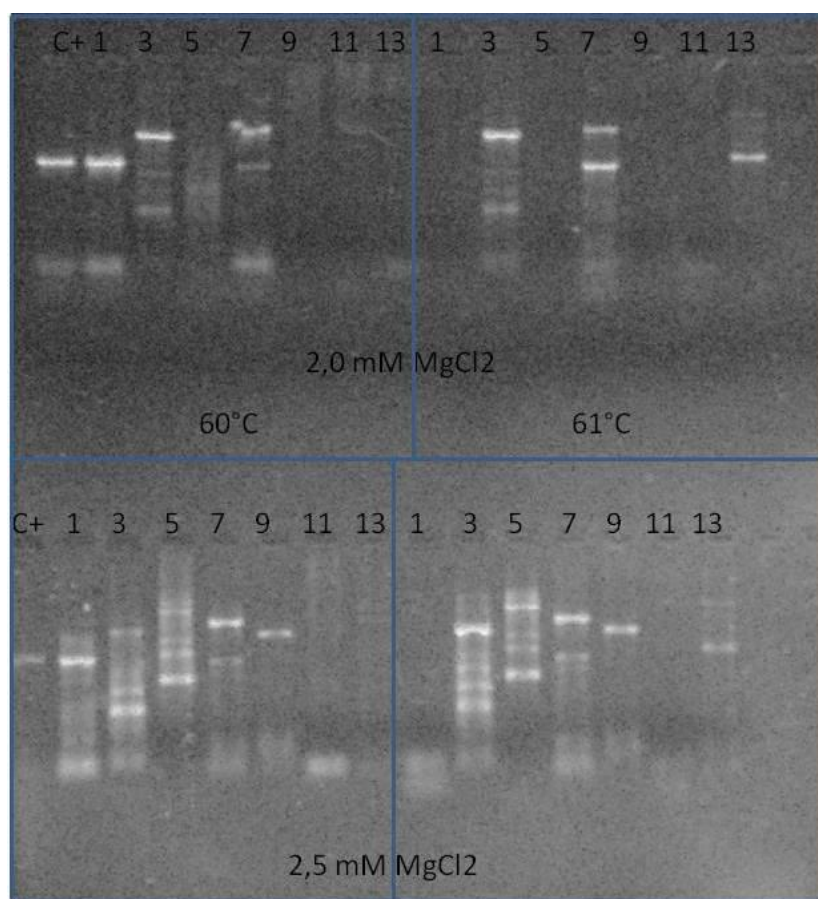


Figura 1. Perfil eletroforético dos produtos de PCR em gel de agarose 1%. Dois microlitros do produto de PCR foram aplicados em cada canaleta. Para esse teste foram usadas duas concentrações de cloreto de magnésio, 2 mM (parte superior) e 2,5 mM, parte inferior. Testou-se também duas temperaturas de pareamentos diferentes, 60°C (lado esquerdo) e 61°C (lado direito). C+ representa um amplicon de tamanho conhecido, 750 bp. O números de 1 a 13 são os 7 pares de iniciadores descritos na tabela 1.

A extração com swab rendeu uma quantidade de DNA suficiente para amplificação de PCR, com aspecto de material genético íntegro (dados não mostrados). Entretanto nem todas as reação com os pares diferentes de iniciadores renderam produtos visíveis ou quantificáveis

(Fig. 1). A possibilidade de inibidor foi descartada em virtude de algumas reações terem amplificado bem. Dessa forma restou testar as a eficiência e especificidade de cada iniciador. Para tanto, uma curva de magnésio versus temperatura mostrou que os iniciadores demandam condições diferentes de amplificação (Fig. 1).

Separadamente os pares dos iniciadores começaram a ser testados quanto a concentração ideal de magnésio e para a temperatura de 60°. Para o par 1, por exemplo, essa concentração está entre 1,5 e 2 mM (Fig.2).

Alguns pares ainda não tiveram a condição ideal estabelecida, são eles os pares GCK5/6; GCK9/10; GCK11/12 e GCK13/14. Esses pares foram redesenhados e a solicitação de compra já foi feita.

Para todos os outros pares foi possível obter amplificação, clonagem e sequências. As sequências foram comparadas com as depositadas nos bancos de dados (Fig. 3).

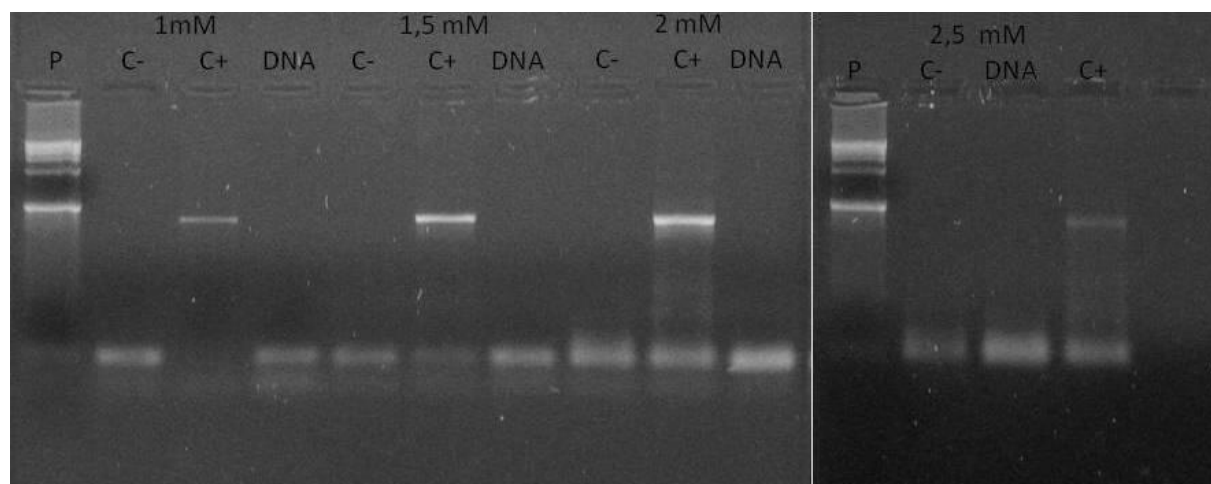


Figura 2. Perfil eletroforético dos produtos de PCR em gel de agarose 1%. Dois microlitros do produto de PCR foram aplicados em cada canaleta. Para esse teste foram usadas quatro concentrações de cloreto de magnésio (topo da figura) e uma temperatura de pareamento 60°C. P, Padrão de tamanho de banda, de 500 bp à 10 Kbp; C-, controle negativo; C+, controle positivo, DNA, amostra do paciente.

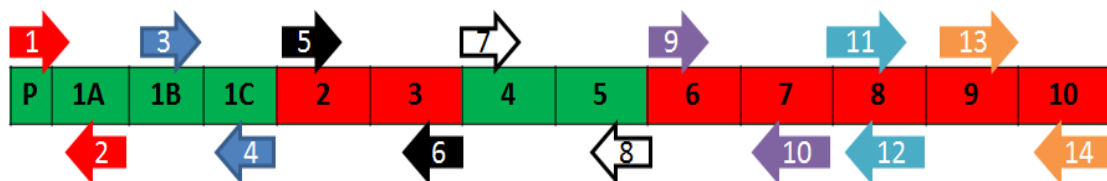


Figura 3. Representação esquemática promotor e 10 exons do gene GCK. O gene GCK é dividido em 10 exons. O exon 1 tem três isoformas que sofrem processamento alternativo tecido-dependente. As distâncias, em pares de bases, entre os exons é relativa e o esquema não está em escala. Setas representam a posição dos primers diretos (para a direita) e reversos (para a esquerda). Cores iguais das setas representam os pares. As caixas verdes representam as regiões que já tem as sequências definidas, as caixas em vermelho as regiões que faltam sequenciar.

A análise das sequências obtidas para o promotor, exon 1 (A, B e C), exon 4 e exon 5 revelou polimorfismos de base única (SNP) apenas no promotor desse gene. Todos os SNPs observados ainda não foram descritos na literatura e até o momento não é possível afirmar se são responsáveis pelas alterações metabólicas apresentadas pelos pacientes (Figura 4).

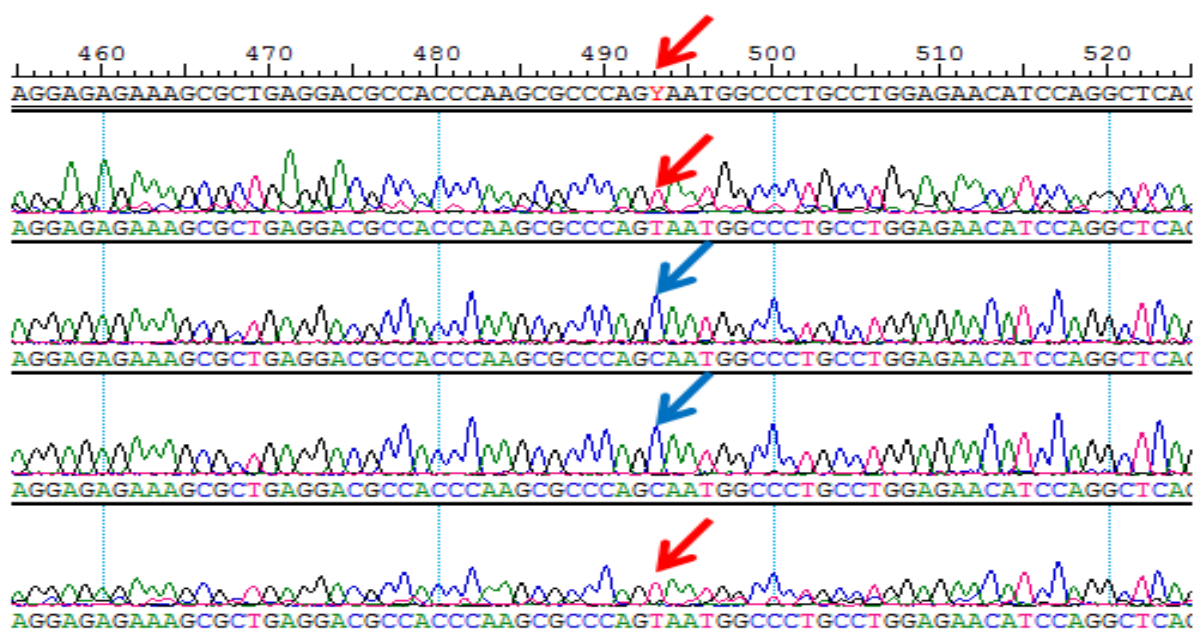
Para resolver essa indeterminação, a estratégia é sequenciar os exons que ainda faltam e verificar se existem alterações já descritas na literatura como causadoras de MODY. Duas possibilidades resultam naturalmente dessa abordagem, a ocorrência ou não de mutações MODY nesses exons. Caso não sejam encontradas mutações indicativas de MODY, a etapa seguinte será avaliar se as alterações no promotor do gene são responsáveis por uma diminuição na eficiência da maquinaria de transcrição.

5.2 Discussão

O gene GCK vem intrigando pesquisadores de todo o mundo pelo número elevado de SNPs que já foram identificados em seus exons sendo que um terço dessas mutações demonstrou correlação com alterações no metabolismo da glicose (OSBAK et al., 2009).

No presente projeto foram observadas até o momento apenas 3 SNPs no promotor desse gene, todos transições C/T (Fig. 4), estando o 1 preservado em todas as suas isoformas. Esses resultados não são conclusivos, entretanto nenhum trabalho até hoje relatou tantas alterações nesse promotor, principalmente transições.

A



B

Probando 1

```

CAAGGCGATTGAGTGGTCACCATGTGTGATGGGGATGGAGGCTCTTTGCTCACCAGTCCCAGTTTTATGCATGG
CAGCTCTAATGACAGGATGGTCAGCCCTGCTGAGGCCACTCCTGGTCACCATGACAACCACAGGCCCTCTCA

GGAGCACAGTAAGCCCTGGCAGGAGAATCCCCCACTCCACACCTGGCTGGAGCAGGAAATGCCGAGCGGCGC
CTGAGCCCCAGGGAAGCAGGCTAGGATGTGAGAGACACAGTCACCTGCAGCCTAATTACTCAAAAGCTGTCC
CCAGGTCACAGAAGGGAGAGGACATTTCCCACTGAATCTGTCTGAAGGACACTAAGCCCCACAGCTCAACAC

AACCAGGAGAGAAAGCGCTGAGGACGCCACCCAAGCGCCAGTCAATGGCCCTGCCTGGAGAACATCCAGGCT
CAGTGAGGAAGGGTCCAGAAGGGAATGCTTGCCGACTCGTTGGAGAACAATGAAAAGGAGGAAACTGTGACT
GAACCTCAAACCCCAAACAGCCCGAGGAGAACCACATTCTCCAGGGACCCAGGGCGGGCCGTGACCCCTG
CGGCGGAGAAGCCTTGGATATTTCCACTTCAGAAGCCTACTGGGGAAGGCTGAGGGGTCCCAGCTCCCCACG
CTGGCTGCTGTGCAGATG CTG GAC GAC AGA GCC AGG ATG GAG GCC GCC AAG AAG GAG
AAGGTATCTCGCCCTCCATTGGGCATTCTGGGAGTGTGTTGCTTGCCTGTCCCCAACATTCCATGGTTTGT
TGAGCCTCAGAATCTGATTTTATGCACAGGCTCTTTGAGAAGGGTCTTGCC

```

Figura 4. Processamento das sequências do promotor do gene GCK. A, recorte de parte do eletroferograma visualizado no programa DNASTar II. Nesse esquema a transição C/T foi está realçada pelas setas azuis/vermelhas respectivamente. B, Toda a sequência obtida para o promotor e exon 1A. As sequências realçadas em verde e azul correspondem à posição dos iniciadores. As transições C/T estão realçadas em amarelo. A base T em vermelho é um sítio característico da mutação -30 T/G. As sequências realçadas em cinza correspondem aos sinais clássicos AG/GT para o processamento do mensageiro. A sequência em azul separada em triples corresponde ao exon 1A.

A transição C/T é um evento mutagênico relativamente comum e espontâneo. Normalmente ocorrem em regiões ricas em G e C e ilhas CpG (JENNIFER et al., 1998). Na verdade é uma combinação de fatores, pois nessas regiões podem ocorrer eventos epigenéticos no DNA, sendo a metilação da citosina da ilha CpG um evento bastante comum. A deaminação espontânea de citosina metilada resulta em uma timina, portanto regiões ricas em GC são suscetíveis à eventos mutagênicos dessa natureza (DODGE et al., 2002). No presente trabalho, as três transições são não-CpG ou assimétricas.

6 CONCLUSÃO

Esses resultados ainda não são conclusivos para se confirmar a hipótese diagnóstica de MODY2. Uma vez que não foram observadas outras mutações nos Exons 1, 4 e 5, será necessário percorrer todos os demais exons na tentativa de detectar alguma mutação já descrita na literatura como causadora de MODY.

A determinação da correlação causa/efeito nem sempre é direta e fácil de se obter na genética molecular, isso porque inúmeras possibilidades podem acontecer sem que haja prejuízo para a tradução do RNA mensageiro, processamento pós-tradução e funcionamento enzimático. Mutações silenciosas e sinônimas em geral mantêm a maquinaria metabólica em perfeito funcionamento. Por outro lado, algumas mutações são facilmente responsabilizadas por uma disfunção da proteína, como as mutações sem sentido, inserções e deleções, que mudam a fase correta de leitura (MOTA et al., 2013).

Até o presente, apenas um SNP foi identificado no promotor desse gene e a correlação causa/efeito é ainda mais difícil de se determinar (OSBAK et al., 2009). Entretanto poucos trabalhos exploram alterações no promotor e mudanças no padrão de expressão do gene, algo que pode trazer benefícios para o presente projeto, pois a existência de 3 mutações no mesmo promotor pode exacerbar uma resposta fisiológica que seria quase imperceptível caso houvesse apenas uma mutação.

A próxima etapa desse projeto será finalizar a sequência dos demais exons e na inobservância de mutações MODY nesses exons, a avaliação do promotor será foco de um novo projeto, pois demandará mais tempo para ser executado, e um esforço experimental incompatível com o nível de iniciação científica.

REFERÊNCIAS

AIKAWA, Altschul, S.F., GISH, W., MILLER, W., MYERS, E.W., LIPMAN, D.J.. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215:403-410. 1990

BARRIO, R., BELLANNÉ-CHANTELOT, C., MORENO, J. C., MOREL, V., CALLE, H. Nine novel mutations in Maturity-Onset Diabetes of the Young (MODY) candidate genes in 22 sapanish families. *J. Clin. Endocrinol & Metabol.* 87(6): 2532-2539. 2009

DODGE, J. E., RAMSAHOYE, B. H., Z. WO, G. OKANO M., and LI , E. De novo methylation of MMLV provirus in embryonic stem cells: CpG versus non-CpG methylation. *Gene.* 289 (1-2): 41–48. 2002

FURUZAWA, G. K., GIUFFRIDA, F. M. A., OLIVEIRA, C. S. V., CHACRA, A. R., DIB, D. S., REIS, A. F. Low prevalence of MODY2 and MODY3 mutaions in Brazilian individuals with clinical MODY phenotype. *Diabetes Res. Clin Pract.* 81(3): e12-4. 2008.

JENNIFER L. CAUFIELD, JOHN S. WISHNOK, and STEVEN R.. Tannenbaum. Nitric Oxide-induced Deamination of Cytosine and Guanine in Deoxunucleotides and Oligonucleotides. *J. Biol. Chem.* 273: 12689-12695. 1998.

Ledermann, H. M. Is maturity onset diabetes at young age (MODY) more common in Europe than previously assumed? *Lancet.* 345: 648-only. 1995.

MASSA, O., MESCHI F., CUESTA-MUNOZ, A., et al. High prevalence of glucokinase mutations in italian children with MODY. Influence on glucose tolerance, first-phase insulin response, insulin sensitivity AND BMI. *Diabetologia.* 44:898-905. 2001.

MOISES, R. S., REIS, A. F., MOREL, V. Prevalence of Maturity-Onset Diabetes of the Young mutations in Brazilian families with autosomal dominant early onset type 2 diabetes. *Diabetes Care.* 24(4): 786. 2001

MOTA, AJ. BRÜGGEMANN, S. COSTA FF. MODY 2: Mutation identification and molecular ancestry in a Brazilian family. *Gene.* 512: 486-491. 2013.

OLIVEIRA, C.S.V., FURUZAWA, G.K., REIS, A.F. Diabetes Mellitus do tipo MODY. *Arq. Bras. Endocrinol. Metab.* 46(2): 186-192. 2002.

OSBAK, K.K., et al. Update on mutations in glucokinase (GCK), which cause maturity-onset diabetes of the young, permanent neonatal diabetes, and hyperinsulinemic hypoglycemia. *Hum. Mutat.* 30: 1512–1526. 2009.

SAMBROOK, J., RUSSEL, D.W. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY. 2001.

TINTO, N., ZAGARI, A., CAPUANO, M., et al. Glucokinase gene mutations: structural and genotype-phenotype analyses in MODY children from south Italy. *Plos One.* 3(4): e1870. 2008.

VAXILLAIRE, M., FROGUEL, P. Monogenic diabetes in the young, pharmacogenetics and relevance to multifactorial forms of type 2 diabetes. *Endocr. Rev.* 29: 254-264. 2008.

ANEXOS

ANEXO 1 – Parecer do Comitê De Ética e Pesquisa



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS

OF.CEP/IB/007/05/04/2011

São Paulo, 05 de abril de 2011.

Prezado Senhor

Dirijo-me a V. Sa. para informar que o Comitê de Ética em Pesquisa - Seres Humanos deste Instituto, em reunião realizada em 14 de dezembro de 2010, **APROVOU** o Projeto de Pesquisa “Glucoquinase e MODY 2: Busca por mutações no gene GCK em uma família diagnóstica de diabetes mellitus não-insulino-dependentes” (**Protocolo nº 113/2010**) – **FR. 387425**, de sua responsabilidade e sob a responsabilidade do Prof. Dr. Francisco Gorgonio da Nóbrega, conforme cópia do Parecer anexo.

Lembramos que deverá ser apresentado relatório anual e final, conforme modelo disponível no link deste Comitê.

Atenciosamente.

Profa. Dra. Célia Piszczuk Koiffmann
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa – Seres Humanos
IBUSP

CC. Prof. Dr. Francisco Gorgonio da Nóbrega

Ilmo. Sr.

ADOLFO JOSÉ MOTA

Faculdade de Odontologia de São José dos Campos-UNESP

ANEXO 2 – Carta de aceite para publicação em revista científica

Indian Journal of Medical Research and Pharmaceutical Sciences

(An peer reviewed official publication of Medical & Pharmaceutical Sciences)
ISSN: 2349 – 5340



Correspondence Address:
169, 3rd Floor, Dawa Bazar,
13-14, RNT Marg, Indore – 452001,
Madhya Pradesh, India

Date: 11/July/2014

Paper Code: IJMRPS/B103/14

Dear Author,

We are pleased to accept your manuscript entitled “**Mutations in the GCK gene promoter may be responsible for MODY2 disease**” for publication in “**Indian Journal of Medical Research and Pharmaceutical Sciences**” The paper is tentatively scheduled for publication in the “July” 2014 issue.

Publication Date: 20th July 2014

The copyright Agreement form attached to this email should be sent to the publisher as soon as possible. Manuscripts cannot be published without this form. The corresponding author is responsible for obtaining signatures of co-authors. Authors not permitted to release copyright must still return the copyright, please send us copyright form as soon as possible to avoid the delay in publishing paper.

At: ijmrpsjournal@gmail.com

Thank you for contributing. On behalf of the Executive Editor of “**Indian Journal of Medical Research and Pharmaceutical Sciences**”, we look forward to your continued contribution of the Journal.

Sincerely,
Mr. Mayur Shah
Executive Editor, IJMRPS



Note: All formalities will be completed within 7 working days