Mari Cassol Ferreira

**Análise da resposta hormonal pancreática antes e após
tratamento com GLP-1 mimético em indivíduos com diabetes
tipo 2 portadores da variante rs7903146 do gene *TCF7L2***

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Doutor em Ciências

Programa de Endocrinologia

Orientadora: Profa. Dra. Rosa Ferreira dos Santos

(Versão corrigida. Resolução CoPGr 6018/11, de 1 de novembro de 2011.
A versão original está disponível na Biblioteca da FMUSP)

**São Paulo
2013**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Ferreira, Mari Cassol

Análise da resposta hormonal pancreática antes e após tratamento com GLP-1 mimético em indivíduos com diabetes tipo 2 portadores da variante rs7903146 do gene *TCF7L2* / Mari Cassol Ferreira. -- São Paulo, 2013.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Endocrinologia.

Orientadora: Rosa Ferreira dos Santos.

Descritores: 1.Diabetes mellitus tipo 2/genética 2 Diabetes mellitus tipo 2/terapia 3.Proteína 2 semelhante ao fator 7 de transcrição/genética 4.Polimorfismo de nucleotídeo único 5.Polimorfismo genético 6.Peptídeo 1 semelhante ao glucagon/agonistas 7.Peptídeo 1 semelhante ao glucagon/genética 8.Insulina/genética 9.Proinsulina/genética 10.Glucagon 11.Células secretoras de insulina 12.Hormônios pancreáticos 13. Exenatide

USP/FM/DBD-221/13

Apoio: Fundação de Apoio a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)

**Este trabalho foi realizado no Laboratório de Carbohidratos e
Radioimunoensaio – LIM 18 da disciplina de Endocrinologia do Hospital
das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo**

Dedicatória

Aos meus pais Ruy e Neli que ao seu modo me ensinaram a questionar e ser curiosa e me incentivaram a ser médica.

Ao meu esposo Marcio que desde o momento que decidi aceitar esse desafio esteve ao meu lado, compreendendo minhas ausências, sempre pronto a dizer uma palavra de estímulo e a colaborar no que fosse preciso.

Agradecimentos

Todo o conhecimento científico é construído ao longo de várias etapas e processos, e nessas etapas muitas pessoas estão envolvidas. Gostaria de dividir esta etapa da minha vida com todas as pessoas que direta ou indiretamente contribuíram para meu aprendizado científico e participaram na construção desta tese de doutorado.

Agradeço à minha orientadora Prof^a. Dr^a. Rosa Ferreira dos Santos, pelo incentivo e orientação na realização desse trabalho, e pela oportunidade e confiança em mim depositada.

Agradeço à Prof^a. Dr^a. Elizabeth Rossi da Silva pelo exemplo de determinação, profissionalismo e respeito, e aos demais pesquisadores do LIM-18, pelas orientações, sugestões, apoio e respeito.

À enfermeira Maria do Carmo Arruda Marques, pela sua amizade, dedicação, e pela sua indispensável ajuda na organização dos atendimentos.

À bioquímica Rosa T. Fukui, pela amizade, exemplo de profissionalismo, humildade e apoio fundamental na realização impecável das análises laboratoriais, fundamentais para o sucesso desse estudo.

Agradeço à técnica Márcia Regina Soares Correia e toda a equipe do LIM-18, que de uma forma ou de outra muito colaboraram para o bom andamento desse estudo.

Aos professores Dr. Bernardo Leo Wajchenberg, Dr^a. Marcia Neri, Dra Marcia Queiroz, Dra Cintia Cercatto e Dra Maria Lúcia Gianella pela competência, sugestões, discussões e ensinamentos durante o desenvolvimento deste trabalho.

Agradecimento especial à equipe administrativa e de enfermagem do ambulatório de endocrinologia e da sala de testes do HC-FMUSP, pela cordialidade e disponibilidade em colaborar, cuja participação foi importantíssima na logística dos atendimentos e realização dos testes de refeição.

Aos meus colegas pós-graduandos do LIM 18, Teresa Cristina Colvara Mattana, Kátia Camarano Nogueira e Vinícius Silva Costa, pela amizade, e pelo sempre pronto auxílio nos mais diversos questionamentos, bem como pelas sugestões e apoio durante a qualificação.

As minhas alunas de iniciação científica da Unochapecó por acreditarem e se dedicarem as suas pesquisas, sendo assim mais um estímulo para que eu continuasse nessa árdua caminhada de obstáculos e descobertas que é a pesquisa. Em especial à Camila Piaia sempre curiosa e pronta para pesquisar e encontrar respostas, que certa vez me enviou uma frase: Um Líder é o responsável da equipe e da transformação de um sonho em realidade e das metas em resultados concretos. Um Líder é um motivador de grupos de pessoas dispostas a aprender e a crescer.

Aos meus amigos e demais familiares, por me apoiarem e entenderem minhas ausências. Em especial ao meu irmão Roni pela amizade de sempre e pelo suporte durante a minha graduação, e aos amigos Adriano e Sheila pela acolhida nas intermináveis estadas em São Paulo.

Ao meu esposo Marcio pelo apoio incondicional e pelas valorosas contribuições nas digitações dos bancos de dados.

Agradeço aos assistentes, professores e funcionários do HC-FMUSP e todos aqueles que de alguma forma contribuíram para o enriquecimento desta tese.

Obrigada!

Eu aprendi...

...que ser gentil é mais importante do que estar certo;

...que não importa quanta seriedade a vida exija de você, cada um de nós precisa de um amigo brincalhão

...que algumas vezes tudo o que precisamos é de uma mão para segurar e um coração para nos entender;

...que deveríamos ser gratos a Deus por não nos dar tudo que lhe pedimos;

...que são os pequenos acontecimentos diários que tornam a vida espetacular;

...que ignorar os fatos não os altera;

...que o amor, e não o tempo, é que cura todas as feridas;

...que a maneira mais fácil para eu crescer como pessoa é me cercar de gente mais inteligente do que eu;

...que cada pessoa que a gente conhece deve ser saudada com um sorriso;

...que um sorriso é a maneira mais barata de melhorar sua aparência;

...que não posso escolher como me sinto, mas posso escolher o que fazer a respeito;

...que todos querem viver no topo da montanha, mas toda felicidade e crescimento ocorrem quando você a está escalando;

William Shakespeare

Sumário

Lista de Abreviaturas

Lista de Figuras

Lista de Tabelas

Lista de Gráficos

Lista de Quadros

Resumo

Summary

1	INTRODUÇÃO.....	1
1.1	Diabetes Mellitus tipo 2.....	5
1.2	Genética do Diabetes Mellitus Tipo 2	7
1.3	Gene <i>TCF7L2</i> e SNP rs7903146.....	9
1.4	Sinalização Wnt e Gene <i>TCF7L2</i>	10
1.4.1	Via Wnt, GLP-1 e Exenatide.....	12
1.5	Diabetes Mellitus tipo 2 e <i>TCF7L2</i>	13
1.6	Glucagon-like Peptide - GLP-1	14
1.6.1	Vias de ação do GLP-1 em células beta.....	17
1.6.2	GLP-1, Exedin-4 e Homeostase da Glicose	18
1.6.3	Efeitos do GLP-1 Independentes da Insulina	20
1.7	<i>TCF7L2</i> e GLP-1	21
1.8	GLP-1 e Agonista do GLP-1 – Exenatida	23
2	JUSTIFICATIVA DO ESTUDO.....	25
3	OBJETIVOS.....	27
4	MÉTODOS.....	29
4.1	Considerações éticas	30
4.2	Casuística.....	30
4.2.1	População 1 - Indivíduos portadores de DM2	30
4.2.2	População 2 - Indivíduos sem diabetes e sem histórico familiar de DM2	31
4.2.3	População 3 - Indivíduos com DM2 genotipados para rs7903146 pareados por tempo de diabetes e IMC.....	32
4.3	Avaliações Bioquímicas, Hormonais e de Fatores inflamatórios.....	32
4.3.1	Glicemia.....	32
4.3.2	Insulina e Pró-Insulina	32

4.3.3	Glucagon	33
4.3.4	Peptídeo-C	33
4.3.5	GLP-1	34
4.3.6	Ácidos Graxos Livres	34
4.3.7	Proteína C reativa	35
4.3.8	TNF-alfa – Fator de Necrose Tumoral alfa	35
4.4	Estudo Genético	36
4.4.1	Extração de DNA de Sangue periférico	36
4.4.2	Genotipagem do gene <i>TCF7L2</i>	36
4.5	Teste da Refeição de 500 Kcal.....	38
4.6	Tratamento	38
4.7	Avaliação do Homeostasis Model Assessment - Oxford	39
4.8	Análise Estatística	39
5	RESULTADOS.....	42
5.1	Caracterização da População Estudada.....	43
5.2	Variáveis Clínicas de Acordo com os Genótipos	44
5.3	Variáveis Laboratoriais de Acordo com os Genótipos	46
5.4	Caracterização da Subpopulação Estudada.....	48
5.5	Testes da Refeição Antes e Após o Tratamento com Exenatide	49
5.5.1	Dosagens de Glicemia.....	50
5.5.2	Dosagens de Insulina	52
5.5.3	Dosagens de Pró-insulina	54
5.5.4	Dosagens de Peptídeo C	56
5.5.5	Dosagens de Glucagon	58
5.5.6	Dosagens de GLP-1	60
5.5.7	Dosagens de Ácidos Graxos Livres – AGL	61
5.5.8	Peso	63
5.5.9	Dosagens de PCR e TNF α	63
5.5.10	Valores de Hemoglobina Glicada A1C	63
5.5.11	Avaliação do Índice de Secreção de Insulina (IGI 30)	64
5.5.12	Avaliação do Homa Oxford.....	65
6	DISCUSSÃO.....	66
7	CONCLUSÕES.....	73
8	ANEXOS.....	75
9	REFERÊNCIAS	88

Lista de Abreviaturas

AKT	Protein Kinase B (PKB)
AMPc	Cyclic adenosine monophosphate
AUC	Área sob a curva
CREB	AMPc responsive element binding protein
DPP-IV	Dipeptidil peptidase-IV
E23K	Variante polimórfica do gene KCNJ11
ERK	Extracellular signal-regulated kinase
Fz	Frizzled receptors
GCG	Gene do pró-glucagon
GCK	Glucokinase
GLP-1	Glucagon like peptide
GLP-1-R	Receptor do glucagon like peptide
GWAS	Estudos de associação genômica ampla
HbA1C	Hemoglobina glicada fração A1c
IGI 30	Índice insulinogênico
IRS-1	Insulin receptor substrate 1
KCNJ11	Potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 11
LRP	Leucine-responsive Regulators Proteins
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
PCR	Proteína C reativa
PDX1	Pancreatic duodenal homeobox 1
PI3K	Phosphatidylinositol 3
PKA	Proteína Kinase A
PKB	Proteína Kinase B
PPARG	Peroxisome proliferator-activated receptor
siRNA	RNAs de interferência
SNP	Polimorfismos de um único nucleotídeo
<i>TCF7L2</i>	Transcription Factor 7-Like 2
TNF- α	Fator de necrose tumoral
TORC2	Transducer of regulated CREB protein 2
Wnt	Wingless-type MMTV integration site family
β -cat	Beta catenin

Lista de Figuras

Figura 1. Localização do gene <i>TCF7L2</i> no cromossoma 10 região 25.3	9
Figura 2. Transcrito do <i>TCF7L2</i> contendo o SNP rs7903146no íntron 3-4.	9
Figura 3. O <i>TCF7L2</i> , membro da família TCF na via canônica WNT	11
Figura 4. Modelo de integração dos sistemas de regulação da homeostase glicêmica pelo GLP-1 pelo SNC e periferia.	16
Figura 5. Vias de transdução de sinal de acoplamento do GLP-1 para ativação do receptor, secreção de insulina e proliferação de células β	18
Figura 6. Resultados segundo emissão de fluorescência analisada por genotipagem (TaqMan)	37

Lista de Tabelas

Tabela 1.	Frequência dos genótipos da variante rs7903146 em todos os pacientes avaliados.....	43
Tabela 2.	Frequência dos genótipos da variante rs7903146 em pacientes com DM2 em relação ao sexo e raça.....	44
Tabela 3.	Características clínicas e antropométricas dos pacientes com DM2 e resultado dos testes de comparação. Valores em média±DP	45
Tabela 4.	Características laboratoriais dos pacientes com DM2 e resultados dos testes de comparação. Valores em média±DP	47
Tabela 5.	Homa Oxford nos pacientes com DM2. Função das células beta (%B), sensibilidade à insulina (%S), resistência à insulina (IR)	48
Tabela 6.	Características clínicas dos pacientes submetidos ao teste da refeição.....	49
Tabela 7.	Resultado das comparações múltiplas entre peso e valores basais de HbA1c, PCR, e TNF α entre grupos antes e após o tratamento com exenatida.....	64
Tabela 8.	IGI 30 realizado com os valores de glicose e insulina (pmol/mmol) durante o teste da refeição, antes e após o tratamento com exenatida nos grupos CC x CT/TT	64
Tabela 9.	Modelo Homa Oxford comparando grupos CC x CT/TT antes e após o tratamento com exenatide, função das células beta (%B), sensibilidade à insulina (%S), resistência à insulina (IR).	65

Lista de Gráfico

Gráfico 1.	Glicemia (mg/dl) no teste da refeição de acordo com os genótipos CC x CT/TT antes e após tratamento, avaliado por ANOVA.....	51
Gráfico 2.	AUC 0-180 min da glicemia (mg/dl) no teste da refeição de acordo com os genótipos CC x CT/TT antes e após tratamento.	51
Gráfico 3.	Insulina (μ U/ml) no teste da refeição de acordo com os genótipos CC x CT/TT antes e após tratamento, avaliado por ANOVA.....	53
Gráfico 4.	AUC 0-180 min da insulina (μ U/ml) no teste da refeição de acordo com os genótipos CC x CT/TT antes e após tratamento. ..	53
Gráfico 5.	Pró-insulina (pmol/L) no teste da refeição de acordo com os genótipos CC x CT/TT antes e após tratamento, avaliado por ANOVA.....	55
Gráfico 6.	AUC 0-180 min da pró-insulina (pmol/L) no teste da refeição de acordo com os genótipos CC x CT/TT antes e após tratamento.	55
Gráfico 7.	Peptídeo-C (ng/ml) no teste da refeição 500 kcal de acordo de acordo com os genótipos CC x CT/TT antes e após o tratamento, avaliado por ANOVA.	57
Gráfico 8.	AUC 0-180 min do peptídeo-C (ng/ml) no teste da refeição de acordo com os genótipos CC x CT/TT antes e após tratamento.	57
Gráfico 9.	Glucagon (pg/ml) no teste da refeição de acordo com os genótipos CT/TT x CC antes e após tratamento, avaliado por ANOVA.	59
Gráfico 10.	AUC 0-180 min do glucagon (pg/ml) no teste da refeição de acordo com os genótipos CT/TT x CC antes e após tratamento.	59
Gráfico 11.	GLP-1 (pMol/L) no teste da refeição de acordo com os genótipos CC x CT/TT antes e após-tratamento.	60
Gráfico 12.	AGL (mEq/L) no teste da refeição de acordo com os genótipos CC x CT/TT antes e após-tratamento.....	62
Gráfico 13.	AUC 0-180 min dos AGL (mEq/L) no teste da refeição de acordo com os genótipos CC x CT/TT antes e após tratamento.	62

Lista de Quadros

Quadro 1. Seqüência dos primers e temperatura de annealing para genotipagem do SNP rs7903146	37

Resumo

Ferreira MC. *Análise da resposta hormonal pancreática antes e após tratamento com GLP-1 mimético em indivíduos com diabetes tipo 2 portadores da variante rs7903146 do gene TCF7L2* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, Brasil; 2013. 101p.

Introdução: O gene *TCF7L2* (Transcription Factor 7-Like 2) codifica o fator de transcrição de mesmo nome que, tem importante papel na via Wnt de sinalização intra celular. A via Wnt é constituída por proteínas de integração e ligação dos processos de diferenciação e multiplicação celulares, interagindo com os fatores TCF, e ativando a expressão de genes relacionados ao *TCF7L2*, sendo este amplamente expresso em vários tecidos. Dados epidemiológicos atuais não deixam dúvidas quanto à forte associação de polimorfismos do gene *TCF7L2* com o diabetes tipo 2 (DM2) em diferentes etnias. Apesar de serem pouco conhecidos os mecanismos que envolvem o gene *TCF7L2* no DM2, tem sido bem demonstrada a associação do alelo T no rs7903146 com redução da secreção de insulina, redução do efeito das incretinas, principalmente do GLP-1, aumento na secreção de glucagon e a longo prazo, redução da meia vida da célula beta. Em vista destas evidências, aventamos a hipótese de que pacientes com DM2 portadores da variante rs7903146 do gene *TCF7L2*, ao ser tratados com GLP-1 mimético, poderiam responder de forma peculiar. **Objetivos:** Avaliar a resposta hormonal pancreática antes e após tratamento com GLP-1 mimético em indivíduos com DM2 portadores da variante rs7903146 do gene *TCF7L2*. **Pacientes e Métodos:** Foram genotipados 162 indivíduos com DM2 portadores da variante rs7903146 do gene *TCF7L2*: idade ($57,0 \pm 7,6$) anos, IMC ($30,5 \pm 5,1$) kg/m². Dessa amostra, 56 pacientes foram divididos em dois grupos conforme o genótipo, sendo 26 CC x 30 CT/TT, e a seguir tratados com Exenatide durante oito semanas. Os testes de refeição foram realizados antes e após o tratamento, para avaliação das concentrações plasmáticas de: Glicose (mg/dl), Insulina (μ U/dl), Pró-insulina (pmol/L), Peptídeo-c (ng/ml); Glucagon (pg/ml) e GLP-1 (pmol/L). Foram comparadas as áreas sob as curvas e os pontos das curvas durante o teste. Análise estatística por ANOVA com dois fatores e medidas repetidas, nível de significância maior que 5%. **Resultados:** A distribuição genotípica CC x CT x TT foi 41,4% x 47,5% x 11,1% respectivamente. A influência do alelo T na resposta pancreática durante o teste da refeição mostrou que as concentrações plasmáticas de insulina, pró-insulina e peptídeo-c foram maiores no grupo CT/TT do que no CC ($p < 0,05$) mas, não houve diferença na secreção do glucagon, GLP-1 e na glicemia entre os grupos (NS). Com relação à influência do alelo T na resposta ao tratamento verificou-se que o grupo CT/TT apresentou maior redução da secreção de insulina ($p < 0,005$), peptídeo-c ($p < 0,05$) e pró-insulina ($p < 0,001$) do que o grupo CC durante o teste da refeição após o tratamento. Observou-se diminuição da glicemia, do glucagon e do GLP-1 de forma semelhante em ambos os grupos. Além disso, houve diminuição semelhante do peso e da hemoglobina glicosilada em ambos os grupos. **Discussão:** Os resultados do presente estudo mostraram que a presença do alelo T em indivíduos com DM2 esteve associada à maior secreção de insulina, pró-insulina e peptídeo-c em relação aos não portadores, com semelhantes concentrações séricas de glucagon e glicose em resposta ao teste da refeição.

Este dado demonstra que a função da célula β dos portadores da variante rs7903146 apresenta características diferentes dos não portadores. Após o tratamento com Exenatide, os indivíduos com DM2 e genótipo CT/TT, apresentaram valores estatisticamente menores de insulina, pró-insulina e peptídeo-c do que o grupo CC. Os efeitos do GLP-1 na glicemia pós-prandial são atribuídos a mecanismos de supressão do glucagon, lentificação do esvaziamento gástrico e também a efeitos insulínotropicos e decorrentes de aumento na sensibilidade periférica à insulina. Além disso, já foi demonstrado que o Exenatide aumenta a captação de glicose de forma insulino-independente em músculo esquelético, pelo estímulo dos transportadores de glicose. Portanto, acredita-se que as características da resposta observada após o tratamento nos portadores do alelo T correspondem ao efeito do Exenatide na célula β melhorando o processamento da pró-insulina, peptídeo-c e insulina e ao aumento da captação periférica da glicose. Sugere-se que esse processo seja resultante da melhor interação com os receptores de GLP-1, tanto em fígado, músculo esquelético e pâncreas. **Conclusões:** Os dados sugerem que indivíduos com DM2 portadores do alelo T no rs7903146 do gene *TCF7L2* apresentam mais benefícios do tratamento com Exenatide, pois a secreção de insulina, pró-insulina e peptídeo-c foram condizentes com maior qualidade na função de célula β nesse grupo após o tratamento. Além disso, o presente estudo proporcionou adicionais evidências clínicas de que os problemas que associam o *TCF7L2* ao DM2 estão relacionados à tolerância periférica a glicose.

Descritores: 1.Diabetes mellitus tipo 2/genética 2.Diabetes mellitus tipo 2/terapia 3.Proteína 2 semelhante ao fator 7 de transcrição/genética 4.Polimorfismo de nucleotídeo único 5.Polimorfismo genético 6.Peptídeo 1 semelhante ao glucagon/agonistas 7.Peptídeo 1 semelhante ao glucagon/genética 8.Insulina/genética 9.Proinsulina/genética 10.Glucagon 11.Células secretoras de insulina 12.Hormônios pancreáticos 13.Exenatide

Summary

Ferreira MC. *Analysis of pancreatic hormonal response before and after treatment with GLP-1-mimetic in subjects with type 2 diabetes carrying the rs7903146 variant in TCF7L2* [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2013. 101p.

Introduction: The *TCF7L2* gene (Transcription Factor 7 -Like 2) encodes the transcription factor of the same name that has an important role in the intracellular Wnt signaling. The Wnt pathway is composed of connecting and integrating proteins of cell proliferation and differentiation process by interacting with TCF factors, and activating the expression of genes related to *TCF7L2*, which is widely expressed in several tissues. Current epidemiological data leave no doubt as to the strong association of polymorphisms of the *TCF7L2* gene with type 2 diabetes (T2DM) in different ethnic groups. Although they are poorly known mechanisms involving *TCF7L2* gene in T2DM the association of the T allele of rs7903146 with reduced insulin secretion, reducing effect of incretins, mainly GLP-1, increase in glucagon secretion and long-term reduction in the half-life of the beta cell, have been well demonstrated. In view of this evidences, we hypothesized that patients with T2DM, carriers of the variant rs7903146 of the *TCF7L2* gene, being treated with GLP-1 mimetic, could respond in a peculiar way. **Objectives:** Evaluating the pancreatic hormone response before and after treatment with GLP-1 mimetic in individuals with T2DM, carriers of rs7903146 variant of *TCF7L2* gene. **Patients and Methods:** We genotyped 162 individuals with T2DM patients with the variant rs7903146 gene *TCF7L2*: age (57.0 ± 7.6) years old, BMI (30.5 ± 5.1) kg/m². From this sample, 56 patients were divided into two groups according to the genotype, 26 x 30 CC CT / TT, and then treated with exenatide for eight weeks. Meal tests were conducted before and after treatment to evaluate plasma concentrations of: Glucose (mg / dl) Insulin (U / dL) Proinsulin (pmol / L), C-peptide (ng / ml), Glucagon (pg / ml) and GLP-1 (pmol / L). The areas under the curves and the points of the curves were compared during the test. Statistical analysis by ANOVA with two factors and repeated measures, significance level greater than 5%. **Results:** The genotype distribution CC x CT x TT was 41.4% vs. 47.5% vs. 11.1 % respectively. The influence of the T allele in the pancreatic response during the test meal showed that plasma insulin concentrations, pro-insulin and c-peptide were higher in the CT/TT than in CC ($p < 0.05$) but no difference in the glucagon secretion, GLP-1 and glucose in both groups (NS). Regarding to the influence of the T allele in response to treatment has been found that the group CT/TT presented greater reduction in insulin secretion ($p < 0.005$) c-peptide ($p < 0.05$) and proinsulin ($p < 0.001$) than in CC group during the test meal after treatment. There was a decrease in blood glucose, glucagon and GLP- 1 similarly in both groups. In addition, there was a similar decrease in weight and glycosylated hemoglobin in both groups. **Discussion:** The results of this study showed that the presence of the T allele in individuals with T2DM was associated with higher insulin secretion, proinsulin and c-peptide compared to non-carriers, with similar serum concentrations of glucagon and glucose in response to the test meal. This data demonstrates that the function of β cells of carriers of the variant rs7903146 shows different features from non-carriers.

After treatment with Exenatide, individuals with T2DM and genotype CT/TT, showed statistically lower values of insulin, proinsulin and c-peptide than the CC group. The effects of GLP-1 on postprandial glycemia mechanisms are attributed to suppression of glucagon, retardation of gastric emptying and also the insulintropic effects and resulting increase in peripheral sensitivity to insulin. In addition, it was demonstrated that the Exenatide increases glucose uptake independent of insulin in skeletal muscle, by the stimulation of glucose transporters. Therefore, it is believed that the characteristics of the response observed after treatment in patients with the T allele corresponds to the effect of Exenatide in β cell improving the processing of proinsulin, insulin and c-peptide and increasing peripheral glucose uptake. It is suggested that this process is best resulting from the interaction with the GLP-1 receptor in both liver, skeletal muscle and pancreas. **Conclusions:** These data suggest that T2DM patients with T allele in rs7903146 of *TCF7L2* presents more benefits of treatment with Exenatide, because the secretion of insulin, proinsulin and c-peptide were consistent with higher quality in β cell function in that group after treatment. Moreover, this study provided further evidence that the clinical problems associated with T2DM and *TCF7L2* are related to peripheral glucose tolerance.

Descriptors: 1.Diabetes mellitus, type 2/genetics 2.Diabetes mellitus, therapy 3.Transcription factor 7-like 2 protein 4.Polymorphism, single nucleotide 5.Polymorphism, genetic 6.Glucagon-like peptide 1/agonists 7.Glucagon-like peptide 1/genetics 8.Insulin/genetics 9.Proinsulin/genetics 10.Glucagon 11.Insulin-secreting cells 12.Pancreatic hormones 13.Exenatide

1 INTRODUÇÃO

A prevalência do diabetes mellitus tipo 2 (DM2) tem crescido de forma epidêmica e global fato este atribuído à associação entre predisposição genética e estilo de vida das populações. O DM2 exerce grande impacto em saúde pública, em decorrência de suas complicações, além de comprometer a qualidade de vida das populações por ele acometidas.

Apesar de se tratar de uma doença poligênica, com ampla expressão fenotípica, o conhecimento da genética envolvida no desenvolvimento de suas manifestações será sem dúvida, uma das melhores armas no controle de seu aparecimento e tratamento. O rastreamento de polimorfismos genéticos associados ao DM2, em várias populações, destacou o gene do fator de transcrição *TCF7L2* (*Transcription Factor 7-Like 2*), localizado no cromossomo 10q25.3 ⁽¹⁾.

Este gene foi diretamente associado com o DM2 em uma população islandesa em 2003, mas os resultados foram também replicados em coortes no norte da Europa por Grant et al ⁽¹⁾, o gene foi identificado a partir do estudo de uma região previamente relacionada ao DM2 ⁽²⁾. Inicialmente cinco polimorfismos (SNPs) do gene *TCF7L2*: rs12255372, rs7903146, rs7901695, rs11196205 e rs7895340 foram associados ao DM2. Dentre os quais, os 2 primeiros apresentaram mais forte correlação, RR=1,52 para o alelo T no rs12255372 e RR=1,54 para o alelo T no rs7903146 ⁽¹⁾. Flores e cols verificaram que indivíduos portadores do alelo T no rs7903146 foram mais propensos a ter progressão da intolerância à glicose para o diabetes do que os

homozigotos CC. Nesse mesmo estudo o alelo T foi associado à diminuição da secreção de insulina, mas não à piora da resistência à insulina ⁽³⁾. Seguiram-se a partir de então uma série de investigações confirmando o papel de polimorfismos do gene *TCF7L2* no aumento do risco para o DM2 em várias populações ^(4,5,9,10,11,12,13). Foram verificadas fortes associações entre DM2 e os polimorfismos rs7903146 (OR 2.15) e rs12255372 (OR 1.69) ⁽²²⁾, sendo que mais recentemente uma meta-análise realizada com 35,843 casos de DM2 e 39,123 controles, evidenciou OR 1,9 para desenvolvimento de DM2 na presença do alelo T do rs7903146 ⁽³⁹⁾.

Estudos de associação genômica ampla (GWAS) tem desempenhado um papel importante na identificação de vários loci de susceptibilidade ao diabetes e, alguns desses loci estão em genes envolvidos no desenvolvimento pancreático e síntese de insulina ^(6,9,15,18). O *TCF7L2* é um componente importante da via de sinalização WNT que regula a expressão do gene do proglucagon e a secreção do *Glucagon like peptide* (GLP-1) pelas células endócrinas intestinais em resposta às refeições ⁽¹⁴⁾. Já é bem estabelecido que o GLP-1 é um potente secretagogo de insulina. Portanto, variantes polimórficas presentes no gene *TCF7L2* podem comandar uma alteração na sinalização da via WNT resultando em redução na secreção da insulina estimulada pela ação secretória GLP-1 ^(24, 25).

Dahlgren e colaboradores ⁽²²⁾ usando a técnica do clamp euglicêmico hiperinsulinêmico, pesquisaram a sensibilidade à insulina e as secreções da pró-insulina e insulina em jejum. As análises de insulina plasmática em jejum ou sensibilidade à insulina, não apresentaram resultados significativos, entretanto houve associação entre a presença do alelo T no rs7903146 e

12255372 e elevação dos níveis de pró-insulina plasmática ⁽²²⁾. Entretanto, estudos mais recentes têm demonstrado que o gene *TCF7L2* influencia a ação periférica da insulina ^(38,75), assim como a produção deste hormônio ⁽⁶⁷⁾. Nesse sentido, várias funções no metabolismo da glicose, previamente desconhecidos em relação ao *TCF7L2*, tem sido sugeridas.

Embora vários sejam os questionamentos quanto ao papel do *TCF7L2* no DM2, não há dúvida quanto a sua importância em influenciar a resposta de secreção de insulina ao estímulo do GLP-1. Reconhece-se também a importância do GLP-1 não só na manutenção da secreção de insulina estimulada pela glicose, mas também na sobrevivência das células β ^(28, 43). Além disso, recentes estudos demonstraram correlação do *TCF7L2* com ação periférica da insulina ^(38,75). Portanto acredita-se que o *TCF7L2* exerça seu efeito sobre a produção de insulina (com base em estudos de associação genética no DM2) e sobre a ação da insulina (com base em estudos de isoformas em tecidos-alvo) ⁽⁶⁷⁾. O reconhecimento de que o *TCF7L2* é expresso num padrão amplo, incluindo os tecidos com papel importante no metabolismo da glicose tais como cérebro, fígado, músculo esquelético, gordura e ossos ^(73,74) levanta a possibilidade de que, in vivo, o *TCF7L2* possa regular o metabolismo da glicose não somente por meio de seu efeito sobre a célula beta, mas também em tecidos fora do pâncreas ⁽⁷⁴⁾.

Compreender os mecanismos pelos quais a sinalização Wnt /*TCF7L2* regula o metabolismo da glicose pode revelar novos insights sobre a patogênese do DM2, realçar as vias celulares e genéticas passíveis de se tornarem alvos terapêuticos, bem como direcionar escolhas terapêuticas.

1.1 Diabetes Mellitus tipo 2

O DM2 caracteriza-se pela presença de resistência à insulina e redução na produção e secreção deste hormônio pela célula beta. A principal ação da insulina é sinalizar para que tecidos sensíveis ao hormônio, como o músculo-esquelético, fígado e tecido adiposo, aumentem a captação da glicose em situações de hiperglicemia. Além disso, o papel regulador da insulina sobre a homeostase glicêmica estende-se também ao fígado por meio da regulação da gliconeogênese e glicogenólise, garantindo um padrão adequado de glicemia basal durante o jejum. Adicionalmente, a insulina inibe a secreção de glucagon pelas células alfa pancreáticas sinalizando assim, para que o fígado, no estado pós-prandial, interrompa a produção de glicose via glicogenólise e neoglicogênese ^(7,23). Insulina e glucagon são potentes reguladores do metabolismo da glicose e, por décadas, o diabetes foi considerado como uma doença bi-hormonal. No entanto, esta perspectiva é incompleta para explicar todas as dificuldades de se manter um controle adequado das concentrações de glicose em pacientes com diabetes.

Nos anos 70 vários hormônios intestinais foram identificados e um deles, o GLP-1 (Glucagon like peptide-1), foi reconhecido como outro importante contribuinte para a manutenção da glicemia. Assim, passou-se a entender o processo glicorregulatório como resultado da interação com outros hormônios e particularmente a relação dos hormônios pancreáticos (insulina e glucagon) com hormônios intestinais e o diabetes passou a ser visto com uma doença multi-hormonal ⁽²⁸⁾. Os principais papéis fisiológicos para o GLP-1 são os seus efeitos sobre as ilhotas pancreáticas (estimulação da secreção de insulina e

supressão da liberação de glucagon), sobre o trato digestivo (inibição do esvaziamento gástrico e motilidade intestinal) e seu efeito sobre o apetite. Pacientes com diabetes podem apresentar uma diminuição das concentrações de GLP1 no estado pós-prandial, o que contribui para o quadro clínico do diabetes tipo 2, pois diminui o estímulo fisiológico da secreção de insulina e não contribui para a supressão do glucagon ⁽²⁸⁾.

Precocemente, no DM2, a função da célula beta está alterada no estado pós-prandial, o que é evidenciado pela perda da resposta rápida da secreção de insulina após uma refeição. Ocorre também resistência periférica à ação da insulina e, assim, a patogênese do DM2 caracteriza-se pela combinação de uma série de fatores que incluem a resistência à insulina no fígado, músculo e tecido adiposo, um progressivo declínio da massa e da função das células beta e um defeito na supressão dos níveis de glucagon, aumentando a produção hepática de glicose ⁽²³⁾.

A descoberta de novos determinantes genéticos para o DM2 tem focado principalmente na secreção e ação da insulina ^(15,18). Além disso, alguns estudos têm demonstrado associação clara entre variantes de risco do *TCF7L2* e aumento das concentrações de pró-insulina no plasma. Este achado é uma evidência de que o aumento do risco de DM2 conferido pelas variantes pode estar associado à disfunção na produção de insulina dentro das células beta ⁽²²⁾. A pró-insulina é o precursor molecular para a insulina e tem baixa atividade semelhante à insulina, sua conversão enzimática em insulina madura e peptídeo C é um passo crítico na produção e secreção de insulina. A hiperinsulinemia tipicamente indica resistência à insulina, no entanto, a elevação da pró-insulina em relação à insulina, além de indicar stress da célula beta como resultado da

resistência à insulina, pode ser decorrente de defeito no processamento da insulina, assim como anormalidades de secreção ⁽²⁷⁾. Em indivíduos normais 10 a 15% de insulina secretada é pró-insulina e os seus intermediários de conversão. Em contraste ao percentual > 40% de pró-insulina no DM2 ⁽²⁷⁾.

Além do mecanismo já mais estudado, de secreção de insulina dependente de GLP-1 ser responsável por parte da alteração no metabolismo da glicose associada ao *TCF7L2* ^(21,44), o papel funcional do *TCF7L2* no metabolismo da glicose hepática ainda não está esclarecido. Recentes evidências propõem que o *TCF7L2* seja crítico na mediação do controle transcricional da produção de glicose hepática e que a expressão hepática de isoformas de *TCF7L2* sejam reduzidas em modelos de ratos com resistência à insulina ⁽⁷⁵⁾.

1.2 Genética do Diabetes Mellitus Tipo 2

A etiologia do DM2 é multifatorial, e o excesso de peso representa um dos principais fatores de risco. Contudo, cerca de 10% dos portadores de DM2 possuem peso normal e, por outro lado, muitos dos indivíduos obesos nunca desenvolverão diabetes, indicando que outros fatores são importantes, incluindo os fatores genéticos ⁽⁶⁴⁾. Resultados de vários estudos confirmam a importância de fatores genéticos no desenvolvimento de DM2: filhos de um dos pais com DM2 apresentam um risco 3,5 vezes maior de desenvolvimento da doença, quando comparados a população geral, e de 6,1 vezes, quando ambos os pais possuem DM2. De acordo com a hipótese mais aceita, a hipótese da variante comum ⁽⁶⁴⁾, as doenças complexas, como diabetes tipo 2, são causadas pela ocorrência

simultânea de variantes comuns (alterações da sequência do DNA, com frequências alélicas maiores que 5%) em vários genes. Supõe-se que cada uma destas variantes do DNA exerça apenas efeitos moderados sobre a função e/ou expressão dos genes afetados, mas, na sua soma, essas variações conferem maior susceptibilidade. Polimorfismos de um único nucleotídeo (SNPs) com trocas de simples pares de bases, respondem por cerca de 90% da variação na sequência do genoma humano sendo consideradas como os grandes determinantes da predisposição individual a doenças complexas. Entretanto, inserções, deleções, duplicações, inversões ou variações de números de cópia de segmentos do DNA (devido à deleção e/ou duplicação de segmentos de DNA) podem, também, desempenhar importante papel no risco genético de DM2 ⁽⁶⁴⁾. Estas variações em vários loci genéticos conferem uma maior susceptibilidade à doença seja diretamente seja por meio da interação com fatores ambientais.

Encontrar genes que predispõem às formas multifatoriais de DM2 representa um desafio, em 2006 foi identificado o *TCF7L2*, o gene mais importante de susceptibilidade genética ao DM2 até o momento. A partir de 2007, estudos de associação genômica ampla tem sido destinados a fornecer novos insights sobre a arquitetura genética e biologia do DM2 ⁽⁶⁵⁾. Os mais fortes candidatos adicionais para esta lista incluem a variante E23K do *KCNJ11* ⁽⁶⁶⁾ e a variante P12a do *PPARG* ⁽⁶⁷⁾, cuja associação com DM2 foi de 1,2 vezes. Há uma longa lista de genes para os quais as evidências de associação são menores. A lista inclui variantes de ambos os gene calpaina 10 (*CAPN10*), e alguns dos genes implicados em formas de diabetes monogênicas ⁽⁶⁵⁾. Existe sobreposição entre os genes para diabetes monogênico e formas multifatoriais de diabetes, sendo o fenótipo associado ao *KCNJ11* o melhor exemplo ⁽⁶⁵⁾. Semelhante ao que

ocorre com PPARG, HNF1A, HNF4A e GCK. Em contrapartida, não há nenhuma evidência de que as mutações raras em *TCF7L2* possam contribuir para o diabetes monogênico. Dos novos genes candidatos um dos mais importantes é o ENPP1 (codificando pirofosfatase ectonucleotídeo fosfodiesterase 1, um inibidor de sinalização de insulina) ⁽⁶⁵⁾.

1.3 Gene *TCF7L2* e SNP rs7903146

O transcription factor 7-like 2 (T-cell specific, HMG-box), sinônimo TCF-4 Gene ID [ENSG00000148737](#), localiza-se no cromossomo 10, região 25.3, apresenta 237 Kb (Figura 1), são conhecidos pelo menos 22 transcritos. O produto do gene faz parte de um grupo de alta mobilidade (HMG) que contém fatores de transcrição implicados na homeostase da glicose. O *TCF7L2* age através da regulação do pró-glucagon, promovendo a repressão desse gene nas células enteroendócrinas pela via de sinalização WNT ⁽²⁵⁾. O polimorfismo rs7903146 (C/T) localiza-se no íntron 3-4 (Figura 2) e faz parte do transcrito *TCF7L2* 003 ENST 00000369397, composto por 14 exons.

Figura 1. Localização do gene *TCF7L2* no cromossoma 10 região 25.3

Figura 2. Transcrito do *TCF7L2* contendo o SNP rs7903146 no íntron 3-4.

Apesar de muitas associações genéticas terem sido robustamente descobertas por meio dos GWAS para várias características complexas ao longo dos últimos anos, apenas poucos genes tem a variante causal subjacente real determinada como no caso da associação *TCF7L2* e DM2 , onde a avaliação com múltiplas etnias determinou a principal associação a uma única variante, o rs7903146 ⁽⁶⁷⁾.

1.4 Sinalização Wnt e Gene *TCF7L2*

Somente em estudos genéticos recentes em humanos passou a ser aceita a contribuição da sinalização Wnt no DM2 ^(41,43). O gene *TCF7L2* é amplamente expresso em vários tecidos e, está intimamente relacionado à via Wnt (Figura 3), a qual está envolvida em muitas atividades fisiológicas e fisiopatológicas. O maior efetor da via canônica da via WNT é o fator de transcrição bipartido β -catenina / TCF (β -cat/TCF). Este é formado pela heterodímerização da β -cat livre com um dos quatro membros da família TCF, sendo o *TCF7L2* o principal parceiro da β -cat no epitélio intestinal. A via Wnt é constituída por proteínas de integração e ligação dos processos de diferenciação e multiplicação celulares. A via canônica é um dos principais ramos da via Wnt, suas proteínas se ligam a receptores frizzled (Fz) em conjunto com correceptores da família LRP (Leucine-responsive Regulators Proteins), a ligação a ambos os receptores ativa a via Wnt canônica, que leva a uma inibição da GSK-3b, resultando na fosforilação e estabilização da molécula de β -catenina, que migra para o

núcleo e interage com os fatores TCF, ativando a expressão de genes relacionados ao *TCF7L2*.

Figura 3. O *TCF7L2*, membro da família TCF na via canônica WNT

A via canônica é importante na modulação da proliferação, sobrevivência e diferenciação celulares e desenvolvimento de órgãos ⁽⁵³⁾ e associado à produção do GLP-1 ^(25, 32). A sinalização Wnt é crítica no desenvolvimento do pâncreas e intestino ⁽⁴²⁾, na proliferação de precursores de células das vilosidades da cripta e células diferenciadas no epitélio intestinal, células-tronco hematopoiéticas, osteoblastos, e vários tipos de células cancerosas ⁽⁶²⁾. Componentes da via Wnt estão presentes no pâncreas adulto, e em especial, os vários membros da família de receptores Wnt frizzled foram identificados na

ilhota ⁽⁴²⁾. Os dados existentes são discrepantes sobre o papel da via de sinalização Wnt em ilhotas maduras. Mas existem evidências de que a essa sinalização está envolvida na diferenciação endócrina ou na função da ilhota adulta, e já foram descritos efeitos de sinalização Wnt sobre replicação das células beta ⁽⁴³⁾.

1.4.1 Via Wnt, GLP-1 e Exenatide

Alguns estudos tem investigado os efeitos dos análogos do GLP-1 de curta ação, como o exenatide, sobre a sinalização Wnt e proliferação e de células beta pancreáticas. Liu, Z e Habener ⁽⁷⁷⁾ verificaram a ativação da beta-catenina induzida pelo exenatide. Adicionalmente, foi verificado que a inibição do *TCF7L2* por um mutante negativo dominante inibiu a taxa de proliferação basal do Ins-1 celular e aboliu o efeito estimulante do exenatide na proliferação de células beta. Esses autores também identificaram que o GLP-1 pode ativar a via canônica Wnt de sinalização por meio da proteína quinase A (PKA), um efetor conhecido do GLP-1. Portanto, parece haver uma ligação entre a ativação de PKA, receptor de GLP-1 e via canônica de sinalização Wnt nas células-beta ⁽⁷⁶⁾.

Além disso, já foi demonstrado que um knock-out do *TCF7L2* por siRNA em ilhotas de ratos e humanas, resultou em redução de liberação insulina em resposta a glicose ⁽⁴⁴⁾. Da mesma forma, o efeito do GLP-1 na secreção de insulina estimulada por glicose foi diminuída após a depleção de *TCF7L2*. E a depleção de *TCF7L2* levou a uma diminuição da proliferação e um aumento da apoptose de ilhotas em humanos ⁽⁴⁴⁾.

1.5 Diabetes Mellitus tipo 2 e *TCF7L2*

Em meta-análise recente o rs7903146 do *TCF7L2* foi associado com DM2 com proporções alélicas de chance de 1,46 ⁽⁴⁾. A presença do polimorfismo considerado de risco esteve relacionada à menor secreção de insulina pela célula beta assim como redução da secreção de GLP-1 pela célula L do jejuno ou redução da ação do mesmo nas células beta ⁽¹⁵⁾. Porém, muito pouco é conhecido sobre como a expressão do *TCF7L2* é regulada para o desenvolvimento do DM2. A localização e a expressão do *TCF7L2* em ilhotas humanas, no núcleo das células beta, foram verificadas por Shu L et al, cujos dados mostram que a regulação do *TCF7L2* desempenha um papel importante na regulação tanto da sobrevivência quanto da função da célula beta ⁽⁸⁾. Esses autores através de outro experimento também afirmam que a redução na expressão do *TCF7L2* observada através de siRNA em ilhotas isoladas de humanos e roedores resultou no aumento da apoptose e redução na função das células beta ⁽⁴⁴⁾. No entanto Savic D et al em experimento realizado, in vivo, em roedores, demonstraram que a superexpressão do *TCF7L2* pode levar ao DM2 pela redução da tolerância à glicose e enfatiza o potencial papel dos elementos cis-regulatórios em regiões da variante rs7903146 ⁽⁴⁵⁾. Os mesmos autores demonstraram que os roedores geneticamente modificados e knockout de *TCF7L2* apresentaram glicemias mais baixas, assim como tiveram melhor tolerância à glicose associada a menores níveis de insulina, sugerindo que estes estariam mais protegidos em relação ao DM2, eles sugerem que a redução da proteína *TCF7L2* reflete uma perda de função em um elemento cis-regulatório ⁽⁴⁵⁾. Em conformidade com os resultados de Savic D et al,

recente estudo avaliando roedores com knockout para *TCF7L2* específicos do pâncreas concluiu que a exclusão seletiva de *TCF7L2* no pâncreas reproduz os aspectos chave da alteração da homeostase da glicose em portadores humanos do alelo de risco do *TCF7L2*, indicando o papel direto desse fator no controle da função da célula beta ⁽⁸⁰⁾.

Sabe-se pouco sobre a maneira como o *TCF7L2* influencia na massa de células beta, mas acredita-se que um importante regulador de sobrevivência das células beta é a proteína-quinase via B / AKT. Uma reduzida ativação AKT foi associada com a redução da inativação GSK-3, um gene associado com aumento da apoptose das células beta e componente da via de sinalização Wnt, que degrada β -catenina. Dessa forma restringindo a ativação nuclear do *TCF7L2*. Portanto a concentração quase indetectável p-AKT em ilhotas com inibição do *TCF7L2*, por conseguinte, pode explicar os efeitos deletérios da falta de *TCF7L2* sobre a sobrevivência da célula beta e secreção de insulina ⁽⁸⁾. E, além disso, sabe-se também que o mecanismo anti-apoptótico do GLP-1 é mediado através AKT ⁽⁴⁰⁾.

1.6 Glucagon-like Peptide - GLP-1

O glucagon-like peptide 1 (GLP-1) é sintetizado a partir pró-glucagon nas células L do íleo, duodeno e do cólon distal em resposta a alimentação, após a qual é rapidamente liberado para a veia porta ⁽¹⁷⁾. A principal forma ativa e de GLP-1, GLP-1 [7-36], é rapidamente degradado pelas dipeptidil-peptidase IV em GLP-1 [9-36] nos tecidos intestinais, bem como no sangue. A consequência

é uma rápida eliminação de GLP-1 do plasma com uma meia-vida estimada em 1-2 minutos em várias espécies ⁽¹⁷⁾.

A verificação dos perfis de concentração plasmática do GLP-1 após a ingestão de nutrientes sugere que sua ação ocorra por vários mecanismos. Estas vias potenciais incluem a participação do sistema nervoso autônomo ^(31,33), bem como por meio de hormônios gastrointestinais ⁽³⁴⁾, ambos os quais podem ser ativados quando os nutrientes apropriados entram no duodeno.

Um dos efeitos biológicos mais conhecidos do GLP-1 é sua capacidade de aumentar a secreção de insulina dependente de glicose, bem como a transcrição do gene da pró-insulina e biossíntese de insulina ⁽²⁸⁾. A ação incretínica está relacionada a 70% do total de insulina secretada após a administração oral de glicose ⁽⁵⁵⁾. Os efeitos no aumento da insulina e na redução do glucagon diminuem a produção hepática de glicose e favorecem a captação de glicose periférica. Tais efeitos juntamente à restrição sobre o esvaziamento gástrico efetivamente limitam os níveis glicêmicos pós-prandiais.

O GLP-1 é um dos vários produtos de clivagem do gene pré-proglucagon, mas também é um neurotransmissor sintetizado por uma pequena população de neurônios no núcleo do trato solitário (NTS) no tronco cerebral caudal. Ao longo das duas últimas décadas, vários estudos têm apontado um papel para o GLP-1 não só na secreção de insulina, mas também no controle da ingestão de alimentos, peso corporal, esvaziamento gástrico, função cardiovascular e proliferação e sobrevivência de vários diferentes tipos de células ⁽⁵⁵⁾. A crescente relevância clínica do GLP-1 e seus receptores torna ainda mais importante que se compreenda a fisiologia subjacente. Sabendo-se que o

próprio peptídeo é produzido tanto periféricamente como centralmente e que os receptores de GLP-1 (GLP-1-R) são expressos em vários tecidos periféricos, assim como no cérebro, não é surpreendente que a questão da mediação central versus periférica seja debatida em relação a muitos dos efeitos do GLP-1. Para a ingestão de alimentos e homeostase de glicose, as evidências atuais favorecem a idéia de que ambos os locais de ação desempenham seu papel (Figura 5) ^(50,69).

Figura 4. Modelo de integração dos sistemas de regulação da homeostase glicêmica pelo GLP-1 pelo SNC e periferia. a) Depois de uma refeição, o GLP-1 periférico é secretado a partir das células-L no intestino delgado. b) O GLP-1 liga-se a GLP-1 no interior da região hepatoportal. c & d) Isso ativa o feedback aferente vagal para o gânglio nodoso. e & f) este feedback aferente estimula os neurônios sensíveis ao GLP-1, no núcleo arqueado do hipotálamo. g) isto leva a um aumento da atividade eferente ao pâncreas, fígado e músculo esquelético e, conseqüentemente, um aumento da secreção de insulina, e diminuição da produção de glicose. ⁽⁵⁰⁾ O efeito global do sistema do GLP-1 central e periférico é de limitar excursões glicêmicas pós-prandiais.

1.6.1 Vias de ação do GLP-1 em células beta

A ligação do GLP-1 ao seu receptor em células β resulta em um aumento no AMPc intracelular, que conduz à estimulação da exocitose da insulina por duas vias diferentes: PKA-dependente e independente de PKA (proteína quinase A) ⁽⁶¹⁾. O GLP-1 também aumenta a atividade da PDX1 (pancreatic duodenal homeobox 1), levando à regulação da expressão do gene. O efeito anti-apoptótico de GLP-1 é mediado pela ativação do CREB (AMPc responsive element binding protein) através da fosforilação pela PKA e da sua interação com o chamado coativador TORC2 (Transducer of regulated CREB protein 2). Para migrar para o núcleo, o TORC2 é desfosforilado por meio da ativação sinérgica da TORC2 fosfatase e inibição da TORC2 quinase, mediada por cálcio e AMPc, respectivamente. O CREB aumenta a expressão de genes (por exemplo, IRS-2, a qual está envolvido na ativação da PKB) ⁽⁶¹⁾. O GLP-1 também ativa a via PI3K (Phosphatidylinositol 3), por dois mecanismos distintos: ativação do receptor da proteína Gs em que o dímero de subunidades $G\beta\gamma$ interage com PI3K, e ativação de c-Src seguida da liberação de EGF (fator de crescimento endógeno epidérmico) -like, β -celluline, que por sua vez ativa o receptor de EGF e aumenta a atividade da PI3K. PI3K posteriormente ativa MAPK (Mitogen-activated protein kinase) a jusante, ERK, PKC ζ e PKB / Akt. Em células β , PKC e MAPK estão associadas com a proliferação induzida por GLP-1, ao passo que a ativação da ERK e MAPK leva a diferenciação das células beta. Estimulação da PKB protege as células beta contra a apoptose ⁽²⁰⁾.

Figura 5. Vias de transdução de sinal de acoplamento do GLP-1 para ativação do receptor, secreção de insulina e proliferação de células β . AC, adenilil ciclase; CREB, proteína elemento de resposta AMPc de ligação; EGF-R: o receptor do fator de crescimento epidérmico; GK: enzima glicoquinase; GLUT2, transportador de glicose-2; insulina Ins; IRS-2, insulina-receptor-substrato 2; TORC2, transdutor de atividade regulada CREB ⁽²⁰⁾

1.6.2 GLP-1, Exedin-4 e Homeostase da Glicose

A administração de GLP-1 na circulação periférica aumenta de forma potente a secreção de insulina e melhora a tolerância à glicose, esses efeitos forneceram a base para terapias com GLP-1. De acordo com vários estudos, quando a sinalização do GLP-1 foi bloqueada ou reduzida, foram verificados níveis de glicose anormalmente elevados no sangue após administração de glicose enteral ou parenteral. Assim, as ações do GLP-1 formam um conjunto de processos coordenados que promovem a tolerância à glicose ⁽⁵⁰⁾.

Inicialmente a literatura foi centrada na idéia de que o GLP-1 sistêmico exerceria seus efeitos através de GLP-1-R nas vísceras, particularmente aqueles expressos pelas células beta pancreáticas. Estudos in vitro mostraram

que o GLP-1 atua diretamente sobre as células beta. E, em doses farmacológicas de GLP-1 ou Exedin-4, in vivo, este efeito se confirmou ^(69,70). No entanto, dada a rápida degradação do GLP-1, por DPP-IV, não está claro se o efeito endógeno do GLP-1 derivado do intestino seja mediado por ação direta insulínica sobre os receptores do pâncreas. Evidências consideráveis sugerem que o GLP-1 periférico afeta o metabolismo da glicose através de uma via autonômica (Figura 5). Infusão de GLP-1 na veia portal hepática ativa vias aferentes vagais, juntamente com um sinal eferente vagal descendente para o pâncreas ^(69,70). O suporte para um efeito de GLP-1 endógeno no sistema porta vem da demonstração de que a infusão portal de antagonista de GLP-1R [des-His1 Glu9,] Ex4 promove piora da tolerância à glicose, enquanto que a mesma dose do antagonista entregue através infusão intra jugular não teve nenhum efeito ⁽⁷¹⁾.

Recentes estudos sugerem que o receptor do GLP-1 (GLP-1-R) exerce papel no metabolismo da glicose, tanto central como periférico e, particularmente, os neurônios hipotalâmicos podem determinar alterações no metabolismo da glicose através de modulações autonômicas ⁽⁷²⁾. O GLP-1-R está expresso no núcleo arqueado do hipotálamo, uma área conhecida por contribuir para o metabolismo de glicose periférica. Já foi demonstrado que, durante clamps euglicêmicos-hiperinsulinêmicos, a injeção de GLP-1 no núcleo arqueado reduziu significativamente a produção de glicose, enquanto a administração de GLP-1 no núcleo paraventricular não teve esse efeito. Será importante determinar se esses efeitos intra arqueados do GLP-1 são farmacológicos ou representantes da fisiologia normal ⁽⁶⁹⁾.

Adicionalmente, já foram descritas ações não metabólicas do exenatide, na redução das concentrações plasmáticas da proteína C reativa e da pressão arterial sistólica ⁽⁸²⁾. Mais recentemente o exenatide tem sido associado à redução do estresse oxidativo e de mediadores inflamatórios como TNF alfa, foi sugerido que a ação do exenatide reduzindo TNF-alfa poderia atenuar a interferência desse mediador na sinalização da insulina no IRS-1 (substrato receptor da insulina 1), assim esse efeito anti-inflamatório poderia contribuir para a melhora na sensibilidade a insulina ⁽⁸³⁾. Outros mecanismos possíveis para o efeito antiinflamatório e antioxidante do exenatide incluem a supressão dos AGL descrita mediante uso agudo e crônico da medicação ⁽⁸³⁾.

1.6.3 Efeitos do GLP-1 Independentes da Insulina

Ambos GLP-1 e GIP (Glucose-dependent insulintropic polypeptide) são insulíntrópicos, no entanto as incretinas também modulam a glicemia pós-prandial pelo aumento da sensibilidade periférica à insulina ⁽⁵⁵⁾. Meneilly GS e cols avaliaram a utilização de GLP-1 em idosos portadores de DM2 com alteração na captação de glicose não mediada por insulina e com produção hepática de glicose semelhante, e verificaram que a utilização de GLP-1 melhorou parcialmente o defeito na captação de glicose não mediada por insulina ⁽⁵⁶⁾. Outros autores descrevem para o GLP-1 efeitos independentes da insulina na redução da produção de glicose hepática ⁽⁴⁸⁾. Embora não seja classicamente descrito que os receptores do GLP-1 sejam expressos em tecidos periféricos sensíveis à insulina, como músculo, tecido adiposo e fígado, vários estudos tem sugerido que o tratamento crônico com agonistas do GLP-1 está associado com melhora da sensibilidade à insulina ⁽⁵⁴⁾.

O exenatide se assemelha ao GLP-1 estimulando o transporte de glicose e o metabolismo no fígado de ratos, no músculo esquelético e tecido adiposo, de uma forma insulino-independente, o mesmo ocorre em relação a lipogênese e lipólise nas células adiposas ⁽⁷⁸⁾. No músculo de ratos, o exenatide tal como GLP-1, estimula a expressão in vivo de transportadores de glicose ⁽⁷⁹⁾. Os efeitos relatados do exenatide em tecidos extrapancreáticos são dependentes de um aumento na atividade de várias quinases, algumas delas estão também envolvidas nas ações do GLP-1 e da insulina. Acredita-se que as ações do exenatide, do tipo glicorregulatórias sejam exercidas, não só através do receptor pancreático do GLP-1, mas também através da interação com os receptores de GLP-1 no fígado e no músculo ^(79, 81), que parecem ser estruturalmente e/ou funcionalmente diferentes daquele do pâncreas.

1.7 *TCF7L2* e GLP-1

O tratamento do DM2 com incretinas tem sido alvo de especial atenção na diabetologia, pela perspectiva que apresenta em melhorar as condições de vida da célula beta, além de proporcionar controle fisiológico da glicemia pós-prandial. Estudos como de Lyssenko e colaboradores ⁽¹⁵⁾ associam o efeito do *TCF7L2* à redução da secreção de insulina pela célula beta. Segundo estes autores o efeito incretínico normal, que implica em uma melhor resposta insulínica à ingestão de glicose do que à infusão endovenosa, apresentou-se prejudicado nos portadores do alelo T do SNP rs7903146, sugerindo um defeito no eixo entero-insular. Estes autores acreditam que a redução do efeito

incretínico pode ser devido à piora da ação das incretinas, tendo em vista que estudos preliminares sugerem que a secreção do GLP-1 é normal nos carreadores do alelo T^(16,24). Lyssenko e cols⁽¹⁵⁾ demonstraram também que carreadores do alelo T, apresentaram maior resposta na secreção de glucagon e menor na secreção de insulina, diante do estímulo do GIP em comparação aos carreadores do alelo C, demonstrando que houve uma correlação entre tipo de alelo e efeito incretínico⁽¹⁵⁾. Schaffer e colaboradores⁽¹⁶⁾ demonstraram que pacientes com DM2, portadores da variante de risco rs7903146 apresentam menor secreção de insulina ao estímulo do GLP-1, e concentrações de GLP-1 normais durante o OGTT. Os resultados desses estudos demonstram que os carreadores do alelo de risco T, apresentam comportamento de resposta diferente diante do estímulo incretínico.

Acredita-se então que a presença dessas variantes determina um defeito funcional na sinalização do GLP-1 sobre a célula beta, embora a secreção deste último pelas células L intestinais possa estar preservada⁽¹⁶⁾. Além disso, a progressiva redução na secreção de insulina nos pacientes com DM2 seria um componente do fenótipo presente nos portadores de determinadas variantes do *TCF7L2*⁽¹⁷⁾. Os resultados desses estudos, assim como o de outros existentes na literatura, mostram que a presença do alelo de risco em pacientes com DM2, confere respostas ao estímulo com GLP-1, que diferem não somente no padrão hormonal, mas que também guardam certa individualidade entre pacientes.

1.8 GLP-1 e Agonista do GLP-1 – Exenatida

O exedin-4 é um peptídeo natural de 39 aminoácidos, presente na glândula salivar do lagarto monstro de gila (*Heloderma suspectum*). O peptídeo tem efeitos potentes na homeostase da glicose em mamíferos ⁽²⁹⁾. Os efeitos do exendin-4 são atribuíveis a semelhança na sequência de aminoácidos com o GLP-1, que é liberado pelas células L intestinais em resposta à ingestão de alimentos ⁽²⁹⁾. O exenatide, forma sintética do exedin-4, é um agente largamente utilizado para o tratamento dos pacientes diabéticos, que induz redução de peso, atua na redução da glicemia em jejum e pós-prandial, reduz HbA1c, e pode estimular a proliferação das células beta ^(35,41). Uma das principais diferenças entre o GLP-1 mimético e inibidores DPP-4 é o aumento modesto nos níveis de GLP-1 endógeno e a ativação dos receptores do GLP-1. Como a via neural parece ser mais importante do que a rota endócrina para estímulo da secreção de insulina, e requer menores níveis de GLP-1, este aumento modesto poderia ser suficiente para induzir a maioria das ações mediadas pelo GLP-1. Tais ações podem ser atribuídas à estimulação da sinalização da via WNT, através dos receptores do GLP-1, também presentes nas células beta ⁽²⁵⁾.

O GLP-1 tem uma infinidade de ações periféricas e centrais que contribuem para a melhora da tolerância à glicose aguda e crônica. Recentes evidências afirmam que o papel do GLP-1 na homeostase da glicose pode contribuir para o aumento da sensibilidade à glicose pós-prandial, através de maior utilização muscular de glicose e/ou inibição da produção de glicose hepática através de um mecanismo central, envolvendo receptores na área porto-hepática ^(30,31). Seus efeitos na glicemia pós-prandial são atribuídos a

vários mecanismos, incluindo supressão do glucagon, redução do esvaziamento gástrico, bem como pelos efeitos insulíntrópicos. Além disso, o tratamento crônico com exenatide foi associado a aumento da sensibilidade à insulina em modelos pré-clínicos ^(46,47).

2 JUSTIFICATIVA DO ESTUDO

A presença do SNP rs7903146 do gene *TCF7L2* em pacientes com DM2 tem sido relacionada à menor secreção de insulina assim como à redução da ação do GLP-1 nas células beta ^(15,16,24). Mas também já foi sugerido que a utilização de GLP-1 pode melhorar o defeito na captação de glicose não mediada por insulina ⁽⁵⁶⁾. E alguns autores descrevem para o GLP-1, efeitos independentes da insulina na redução da produção de glicose hepática ^(48,81).

O *TCF7L2* é um fator de transcrição envolvido no desenvolvimento de uma ampla variedade de linhagens de células e órgãos ⁽²⁵⁾. Os mecanismos potenciais pelos quais as variantes do *TCF7L2* influenciam o DM2 incluem: defeito na secreção de insulina ^(15,61), deficiência no processamento da insulina ⁽⁵⁷⁾ e diminuição da sensibilidade ao GLP-1 ⁽²⁵⁾. Em condições fisiológicas, em tecidos alvos da ação insulínica, o GLP-1 estimula a síntese e ativação de proteínas de sinalização intracelular deste hormônio. Desta forma, a presença da variante polimórfica do *TCF7L2* determinaria menor efeito do GLP-1, o qual também poderia estar envolvido na regulação da sensibilidade periférica à insulina. Questiona-se, portanto, se a presença dessas variantes poderia então determinar um defeito funcional na sinalização do GLP-1 sobre a célula beta, assim como nos demais tecidos como fígado e músculo esquelético.

Diante dessas considerações sugeriu-se que indivíduos com DM2 portadores da variante polimórfica rs7903146 (C/T) do gene *TCF7L2*, apresentariam resposta hormonal pancreática, na fase pós-prandial, diferente dos não portadores, frente ao tratamento com um agonista do GLP-1.

3 OBJETIVOS

Avaliar o padrão de resposta hormonal pancreática em indivíduos com diabetes tipo 2, portadores e não portadores do alelo T no rs7903146 do gene *TCF7L2* em jejum e mediante a realização de teste de refeição mista, antes e após a utilização de um GLP-1 mimético.

4 MÉTODOS

4.1 Considerações éticas

Este estudo foi realizado de acordo com os princípios éticos, seguindo as orientações contidas na declaração de Helsinki. Consentimento por escrito foi obtido de todos os pacientes, antes do início dos procedimentos necessários. O protocolo de estudo foi submetido à Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do HCFMUSP (CAPPesq0261/09) e aprovado - Protocolo de Pesquisa. A medicação exenatide – Byetta® foi adquirida com recursos financeiros do projeto, não conferindo, portanto conflito de interesses.

4.2 Casuística

4.2.1 População 1 - Indivíduos portadores de DM2

Foram selecionados 182 indivíduos portadores de DM2, provenientes do ambulatório de endocrinologia do HC-FMUSP, bem como selecionados durante campanhas do dia mundial do diabetes promovidas pela ANAD. Para a seleção foram utilizados os seguintes critérios de inclusão:

- Portadores de DM2 com menos de 10 anos de diagnóstico
- IMC entre 25 e 35
- Idade entre 45 e 65 anos
- Não usuários de insulina, inibidores da DPP-4 ou GLP-1 miméticos

Foram excluídos pacientes com complicações graves como: nefropatia grave (creatinina > 2,0); hepatopatia com transaminases maiores do que 2 vezes o limite normal; cardiopatia grave (isquemia coronariana clínica ou laboratorial); pancreatite e patologias pregressas ou atuais como: neoplasias, HIV, pneumopatologias crônicas, etc. Dos 182 indivíduos selecionados e submetidos ao protocolo de avaliação clínica, 162 permaneceram no estudo e foram submetidos à coleta de sangue periférico, para extração de DNA, dosagens bioquímicas e hormonais. Todos os pacientes foram genotipados para a variante polimórfica rs7903146 do gene *TCF7L2*.

Foram consideradas para o cálculo amostral, as variáveis peptídeo C e insulina em jejum, sendo que a variável com maior coeficiente de variação foi a insulina (39%), então esta foi escolhida para determinar o tamanho amostral.

4.2.2 População 2 - Indivíduos sem diabetes e sem histórico familiar de DM2

Foi realizada genotipagem para o rs7903146 do gene *TCF7L2* em 120 amostras provenientes de banco de DNA do LIM 18, composto por indivíduos sem DM2, avaliados por meio de glicemia de jejum e hemoglobina glicada, sem histórico familiar de DM2, e com idade acima de 40 anos.

4.2.3 População 3 - Indivíduos com DM2 genotipados para rs7903146 pareados por tempo de diabetes e IMC.

Realizou-se a seleção dos indivíduos com DM2 de acordo com os genótipos CC, CT e TT. Os pacientes de cada grupo CC versus CT / TT foram pareados em relação às variáveis fenotípicas: tempo de diabetes e IMC. Foram selecionados 56 pacientes a partir da população 1 para avaliação com testes da refeição mista de 500 kcal e tratamento com exenatide.

4.3 Avaliações Bioquímicas, Hormonais e de Fatores inflamatórios

4.3.1 Glicemia

Para a dosagem de glicemia plasmática utilizou-se o método enzimático-colorimétrico, específico: sistema (glicose oxidase-peroxidase), kit comercial LABTEST GOD-ANA (Brasil). Os valores normais foram de 70 a 99 mg/dL, em jejum, e as variações intra e entre-ensaios foram menores que 3%.

4.3.2 Insulina e Pró-Insulina

A insulina e a pró-insulina humana foram determinadas no soro pelo método de radioimunoensaio em fase líquida e duplo anticorpo. Utilizamos os reagentes da Millipore Corporation, USA, cat.# HI-14K e cat. # HPI-15K. respectivamente. As amostras foram centrifugadas sob refrigeração para

preservar a atividade e depois estocados a -20°C . A variação intra ensaio foi menor que 5% e entre-ensaios, menor que 6% para insulina e para pró-insulina, a variação intra-ensaio foi menor que 7% e entre-ensaios, foi menor que 11%. Quando os resultados atingiam valores superiores da curva, as amostras foram reavaliadas com diluição.

4.3.3 Glucagon

Para glucagon, as amostras de sangue foram colhidas em tubos Vacutainer® da BD contendo 7,2mg de EDTA, para 4 mL de sangue e adicionados 0,150mL de Aprotinina (Sigma A-6279) como inibidor de proteases, mantidos o tempo todo em gelo até o seu processamento final. As alíquotas de plasma foram estocadas a -20°C e determinadas por radioimunoensaio fase líquida duplo anticorpo, utilizando reagentes da Millipore Corporation, USA, cat.# GL-32K. As variações intra-ensaio foram menores que 7% e entre-ensaios, menores que 14%.

4.3.4 Peptídeo-C

Os resultados de peptideo C no soro foram obtidos utilizando kit de radioimunoensaio para pesquisa, da Millipore Corporation, Billerica, MA, USA: Human C-Peptide cat. # HCP-20K. A metodologia original foi adaptada com pequena modificação no LIM18, para que fosse possível a determinação dos intervalos hormonais alcançados pelas amostras nos testes com dieta. A curva padrão utilizada foi com 7 pontos, variando de 0,156 ng/mL a 10 ng/mL, e o

volume de ensaio foi de 50 microlitros para amostras séricas de pacientes. Os coeficientes de variação intra-ensaio e entre-ensaio foram menores que 6% e a reatividade cruzada do anticorpo do kit foi menor que 4% com a pró-Insulina.

4.3.5 GLP-1

Os níveis plasmáticos de GLP-1 na forma ativa, foram dosados por ELISA, kit da Millipore Corporation, USA, cat.# EGLP-35K, por medidas de fluorescência em placa. As amostras de sangue foram colhidas em tubos gelados contendo 7,2mg de EDTA, 0,150 mL da Aprotinina (Sigma A 6297) e 40 µl de Diprotin A a 10mM (Sigma I 9759) para 4mL de sangue. A manutenção do sangue em gelo desde o início é essencial, para preservar GLP-1. As alíquotas plasmáticas para GLP-1 foram estocadas em freezer -70°C, com acréscimo de 10 microlitros de Diprotin A / mL de plasma. As unidades de fluorescências em placas foram efetuadas no leitor SPECTRA max M5 da Molecular Devices (Faculdade de Saúde Pública – laboratório de Nutrição). As variações intra-ensaios foram menores que 9% e entre-ensaios, foram menores que 13%.

4.3.6 Ácidos Graxos Livres

As dosagens de Ácidos Graxos Livres (AGL) foram realizadas pelo método enzimático utilizando reagentes HR Series NEFA-HR ⁽²⁾ da Wako Químicos USA realizados no Laboratório LIM-18 FMUSP, com adaptações para microplacas.

4.3.7 Proteína C reativa

A PCR foi determinada pelo método ELISA, em amostras de soro basais, de acordo com as instruções do manual do fabricante. O ensaio é específico para proteína C reativa humana e não apresentou qualquer interferência significativa ou alguma reatividade cruzada nos ensaios. Sensibilidade média dos ensaios foi de 0,010ng/mL. Os coeficientes da variação intra-ensaio e entre-ensaios foram menores que 5% e 7%, respectivamente. Nos soros de 35 indivíduos saudáveis, descrito pelo fabricante, o intervalo obtido de PCR no soro pelo método foi de 109 a 4291 ng/mL, sendo a média, de 1769ng/mL (1,77mg/L). Reagentes utilizados: cat # DCRP00 (human C-Reactive Immunoassay), Quantikine® ELISA) manufaturados pela R&D Systems, Inc. Minneapolis, USA.

4.3.8 TNF-alfa – Fator de Necrose Tumoral alfa

O TNF- alfa foi determinado com reagentes da R&D Systems, cat # HSTA00D com método ELISA específicos e de alta sensibilidade (Quantikine® HS ELISA), em amostras de soros basais, de acordo com as instruções do fabricante. Os coeficientes de variação intra-ensaio e entre-ensaios foram menores de 9% e 11%, respectivamente. A sensibilidade média foi de 0,2 pg/mL. A curva padrão foi de 0,5 a 32 pg/mL. Nos soros de 33 indivíduos supostamente saudáveis, descrito pelo fabricante, os níveis de TNF alfa foram detectados em 100% das amostras e o intervalo foi de 0,55 a 2,816pg/mL, com o valor médio de 1,2pg/mL nesses soros.

As demais dosagens bioquímicas de triglicérides, creatinina, TGO, TGP, gama-GT, ácido úrico, colesterol total e frações foram realizadas pela rotina do Laboratório Central do Hospital das Clínicas (LACE) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP) utilizando kits comerciais; assim como as hemoglobinas glicadas por HPLC (CLAE). Os valores normais foram considerados entre 4,1% a 6,0%.

4.4 Estudo Genético

4.4.1 Extração de DNA de Sangue periférico

O DNA genômico foi obtido a partir de 10 a 12 mL de sangue periférico, colhidos em 3 tubos EDTA de 4 mL da BD Vacutainer® (Becton Dickinson) contendo 7,2 mg de EDTA. A técnica utilizada foi a de extração com sal (*salting-out*). Estas amostras de DNA estão estocadas no Banco de DNA do Laboratório de Carboidratos e Radioimunoensaio (LIM-18).

4.4.2 Genotipagem do gene *TCF7L2*

A genotipagem do polimorfismo do gene *TCF7L2*, rs7903146 (Quadro 1) foi realizada por Real Time PCR utilizando TaqMan fluorogenic 5' nuclease assay (Applied Biosystems, Foster City, CA) (Figura 6). O volume final previsto da reação em cadeia da polimerase (PCR) foi de 10 µL, sendo 5 µL do DNA genômico a 10ng/µL e 5 µL de TaqMan PCR MasterMix com os primers na

proporção de 9:1, conforme a recomendação do fabricante (ensaio ID: C29347861_10 para rs7903146). O equipamento utilizado foi STEP ONE PLUS da Applied Biosystems

Figura 6. Resultados segundo emissão de fluorescência analisada por genotipagem (TaqMan)

Quadro 1. Sequência dos primers e temperatura de annealing para genotipagem do SNP rs7903146

SNP	Primers sequência	annealing
rs 7903146 - F	5' AAG AGA AGA TTC CTT TTT AAA TGG TG 3'	58
rs 7903146 - R	5'CCT CAT ACG GCA ATT AAA TTA TAC A 3'	

4.5 Teste da Refeição de 500 Kcal

Os pacientes compareceram a sala de testes do Ambulatório de Endocrinologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP em jejum de 12 horas, sem ingestão de água, receberam um desjejum de 500 calorias, balanceado em 50% de carboidratos, 30% proteínas e 20% gorduras. Foram colhidas amostras de sangue da veia do antebraço nos tempos 0', 15', 30', 45', 60', 90', 120', 180' e 240 minutos. Em todos os tempos do teste foram dosados: glicose, insulina, pró-insulina, peptídeo C, glucagon e GLP-1, nos tempos 0', 60', 120', 180' e 240' foram dosados ácidos graxos livres, e no tempo 0' TNF- α , PCR e hemoglobina glicada A1c.

4.6 Tratamento

Após a seleção, dois grupos, portadores e não portadores das variantes de risco, receberam tratamento com o GLP-1 mimético por um período de 8 semanas. O tratamento consistiu na administração de Exenatide (Byetta®) via sc, na dose de 5mcg duas vezes ao dia, nas semanas 1 a 4 e 10 mcg duas vezes ao dia nas semanas 5 a 8. Inclusive no dia da realização do teste da refeição após o tratamento, os pacientes receberam Exenatide 10 mcg 30 min antes da refeição. Ambos os grupos estavam em uso de metformina e foram mantidos com a medicação durante todo o estudo.

4.7 Avaliação do Homeostasis Model Assessment - Oxford

O Homeostasis Model Assessment (HOMA) foi desenvolvido para estimar em estado basal a função das células beta (%B) e a sensibilidade à insulina (%S), em relação a uma população normal de referência. Estas medidas correspondem às estimativas no estado pós prandial da função das células beta e sensibilidade à insulina derivados de modelos estimulatórios, como o clamp hiperinsulinêmico/hiperglicêmico, o teste de tolerância à glicose por via intravenosa (resposta de insulina aguda) e com o teste de tolerância à glicose oral (0-30 delta I/G) ⁽⁷⁾. Esse modelo matemático de avaliação da homeostase (HOMA) estima os graus da função das células beta (B%) e a sensibilidade à insulina (S%) e resistência à insulina (IR), que é o recíproco da % S ($100\% / S$).

A análise do modelo Homa %B, %S e RI foi realizada utilizando as dosagens de glicemia e peptídeo C nas amostras basais coletadas de todo o grupo DM2 e novamente para o tempo zero dos testes da refeição antes e após o tratamento, para o subgrupo de indivíduos CC e CT/TT selecionados.

4.8 Análise Estatística

Foram descritos os genótipos dos genes avaliados com uso de frequências absolutas e relativas. A análise de equilíbrio de Hardy-Weinberg para distribuição dos genótipos foi estimada por teste de qui-quadrado. As características nominais

dos pacientes foram descritas segundo cada genótipo e foi verificada a existência de associação entre genótipos e características com uso de testes qui-quadrado, ou testes da razão de verossimilhança quando a amostra foi insuficiente para aplicação do teste qui-quadrado.

Os exames laboratoriais e características antropométricas foram descritas segundo cada genótipo e comparados entre os genótipos com uso de ANOVA ou testes Kruskal-Wallis. Para o SNP rs7903146 foram avaliados separadamente os genótipos CC, CT e TT e depois agrupados CT e TT para descrição dos exames laboratoriais e características, para as comparações entre as categorias foram utilizados testes t-Student ou testes Mann-Whitney.

As análises dos testes da refeição foram descritas segundo grupos (CC e CT/TT), momentos (pré e pós-tratamento) e tempos de avaliação na curva (tempos do teste) com uso de medidas resumo e comparados entre grupos, momentos e tempos com uso de análises de variâncias (ANOVA) com três fatores com medidas repetidas nos fatores momento e tempo. Foi suposta matriz de correlações componente simétrica entre os momentos e tempos de avaliação. Para as medidas que apresentaram diferenças estatisticamente significativas foram realizadas comparações múltiplas de Bonferroni ou via contrastes para verificar entre quais grupos, momentos ou tempos ocorreram as diferenças. Foram realizadas comparações entre os grupos e momentos dentro de cada tempo da curva de seguimento com uso de comparações múltiplas de Scheffé usando contrastes. Já para as áreas sobre a curva (AUC) e IGI30 foram utilizadas ANOVA com dois fatores e medidas repetidas entre os momentos de avaliação, com matriz de correlações componente simétricas entre os momentos.

O peso, HbA1C, PCR e TNF foram avaliados pré e pós tratamento e foram comparados segundo genótipo (CC e CT/TT) com uso de equações de estimação generalizadas (EEG), sendo peso e HbA1C com uso de distribuição normal e função de ligação identidade, já para PCR e TNF foram consideradas funções de distribuição gama com função de ligação identidade. Todas as análises foram seguidas de comparações múltiplas de Bonferroni para identificar entre quais genótipos ou momentos ocorrem as diferenças nos parâmetros.

As áreas sob a curva (AUC) foram geradas utilizando programa do GraphPAD PRISM *software*. Os resultados foram ilustrados usando gráficos de perfis médios com os respectivos erros padrões e os testes foram realizados com nível de significância de 5%.

5 RESULTADOS

5.1 Caracterização da População Estudada

Foram selecionados 182 indivíduos portadores de DM2 e 120 controles não diabéticos. No grupo DM2 162 indivíduos foram genotipados para o SNP rs7903146, a média de idade do grupo DM2 foi de $57,1 \pm 7,3$ anos, que foi semelhante de acordo com os genótipos, $p=0,141$. No grupo controle a média de idade foi $47,1 \pm 6,9$ anos, sendo, portanto, menor que do grupo DM2 ($p < 0,001$). Verificou-se respectivamente para os genótipos CC, CT e TT uma prevalência semelhante nos grupos DM2 e controles (Tabela 1). Na avaliação dos pacientes DM2 não foi verificada diferença de acordo com os genótipos em relação a sexo e raça (Tabela 2).

Tabela 1. Frequência dos genótipos da variante rs7903146 em todos os pacientes avaliados

Grupo							
rs7903146	Controle		DM2		Total		p
Genótipo	N	%	N	%	N	%	
CC	56	46,7	67	41,4	123	43,6	0,673
CT	52	43,3	77	47,5	129	45,7	
TT	12	10,0	18	11,1	30	10,6	
Total	120	100	162	100	282	100	

Tabela 2. Frequência dos genótipos da variante rs7903146 em pacientes com DM2 em relação ao sexo e raça

Grupo DM2	rs7903146						Total	p
	CC		CT		TT			
	N	%	N	%	N	%		
Sexo								
Feminino	34	35,4	49	51,0	13	13,5	96	0,144
Masculino	33	50,0	28	42,4	5	7,6	66	
Raça								
Branca	44	39,8	49	47,6	13	12,6	106	
Parda	10	55,6	8	44,4	0	0,0	18	0,076*
Negra	12	33,3	19	52,8	5	13,9	36	

Resultado do teste qui-quadrado

* Resultado da razão de verossimilhanças

5.2 Variáveis Clínicas de Acordo com os Genótipos

Obteve-se uma amostra homogênea de acordo com o tempo de diagnóstico de DM2, em relação aos genótipos, com média de $5,6 \pm 3,6$ anos, $p=0,647$. Verificou-se que os portadores do alelo T no rs7903146 apresentaram diagnóstico de DM2 em idade inferior aos não portadores, $p=0,047$, menor relação pescoço/coxa, $p=0,008$ e também tendência a menor circunferência do pescoço, $p=0,053$, do que os não portadores (Tabela 3).

Tabela 3. Características clínicas e antropométricas dos pacientes com DM2 e resultado dos testes de comparação. Valores em média±DP

Variável	rs7903146	Média	DP	Mediana	Mínimo	Máximo	N	p
Idade (anos)	CC	58,42	6,15	59	43	69	67	0,054
	CT/TT	56,26	7,96	57	35	73	95	
	Total	57,15	7,32	58	35	73	162	
Idade no diagnóstico (anos)	CC	53,27	6,66	54	34	65	67	0,047
	CT/TT	50,88	8,47	52	30	68	94	
	Total	51,88	7,83	52	30	68	161	
Tempo de diagnóstico (anos)	CC	5,33	3,68	5	0	13	67	0,428
	CT/TT	5,79	3,56	6	0	12	94	
	Total	5,60	3,61	5	0	13	161	
Peso (kg)	CC	80,67	14,16	79,2	52,7	134,3	67	0,695
	CT/TT	81,63	16,86	78	48,8	132	95	
	Total	81,23	15,76	78,75	48,8	134,3	162	
IMC	CC	30,43	4,51	29,94	23,48	43,36	67	0,823
	CT/TT	30,61	5,44	29,73	20,48	50,92	95	
	Total	30,54	5,06	29,75	20,48	50,92	162	
Cintura (cm)	CC	103,43	11,18	102	81	143	67	0,804
	CT/TT	102,99	10,92	102	80	135	94	
	Total	103,18	10,99	102	80	143	161	
Quadril (cm)	CC	104,66	9,61	104	86	137	67	0,478
	CT/TT	105,87	11,25	104	85	147,5	93	
	Total	105,37	10,58	104	85	147,5	160	
Pescoço (cm)	CC	38,69	3,43	38,5	32	47	67	0,053
	CT/TT	37,63	3,34	37,5	32	48,5	93	
	Total	38,07	3,41	37,5	32	48,5	160	
Relação Pescoço/Coxa	CC	0,67	0,08	0,67	0,51	0,87	67	0,008
	CT/TT	0,64	0,07	0,64	0,49	0,77	93	
	Total	0,65	0,08	0,66	0,49	0,87	160	
PAS (mmHg)	CC	137,08	18,21	136	90	171	65	0,108
	CT/TT	132,19	19,18	128	103	180	95	
	Total	134,18	18,88	130	90	180	160	
PAD (mmHg)	CC	82,40	11,16	84	52	103	65	0,217
	CT/TT	80,29	10,14	79,5	62	114	94	
	Total	81,15	10,59	80	52	114	159	

5.3 Variáveis Laboratoriais de Acordo com os Genótipos

As características clínicas dos indivíduos estudados estão apresentadas na tabela 4. Os portadores dos genótipos TT e CT do rs7903146 demonstraram menores concentrações plasmáticas de peptídeo-C quando comparados aos portadores do genótipo CC. Verificou-se diferença média do peptídeo C entre as variantes do rs7903146 ($p=0,040$), sendo estatisticamente maior nos homozigotos selvagens CC do que nos CT ($p=0,029$) e TT ($p=0,037$). A tabela 4 evidencia também que o ácido úrico e o HDL apresentam diferenças médias significativas entre os genótipos ($p=0,017$ e $p=0,041$), sendo que os portadores do alelo T apresentam menores valores médios de ácido úrico e maiores valores de HDL que os não portadores.

Tabela 4. Características laboratoriais dos pacientes com DM2 e resultados dos testes de comparação. Valores em média±DP

Variável	rs7903146	Média	DP	Mediana	Mínimo	Máximo	N	p
Glicemia (mg/dl)	CC	146,69	59,48	134	67	380	61	0,988
	CT/TT	146,84	58,63	126	67	314	91	
	Total	146,78	58,78	126,5	67	380	152	
Hb Glicada (%)	CC	7,57	1,70	7	5,4	12	61	0,943
	CT/TT	7,59	1,78	7,1	5,2	13,4	87	
	Total	7,58	1,74	7,1	5,2	13,4	148	
Colesterol total (mg/dl)	CC	187,84	41,59	189,5	43	279	62	0,072
	CT/TT	200,57	43,00	201	112	286	89	
	Total	195,34	42,75	195	43	286	151	
HDL (mg/dl)	CC	46,48	10,88	45,5	26	71	60	0,041
	CT/TT	50,89	13,87	50	18	108	87	
	Total	49,09	12,88	48	18	108	147	
LDL (mg/dl)	CC	110,77	34,12	109,5	37	194	60	0,126
	CT/TT	119,37	32,73	118	43	185	87	
	Total	115,86	33,46	115	37	194	147	
VLDL (mg/dl)	CC	32,65	11,05	32	10	59	55	0,020
	CT/TT	28,06	11,18	26	7	59	80	
	Total	29,93	11,32	29	7	59	135	
Triglicérides (mg/dl)	CC	181,71	87,88	162	48	515	63	0,106
	CT/TT	157,97	89,08	133	34	496	89	
	Total	167,81	89,07	151	34	515	152	
Ácido úrico (mg/dl)	CC	5,93	1,78	5,6	3	10,1	53	0,017
	CT/TT	5,23	1,40	5	2,6	10,6	83	
	Total	5,50	1,59	5,35	2,6	10,6	136	
Insulina (mUI/ml)	CC	17,65	12,13	15,7	4,4	61,7	63	0,099
	CT/TT	14,55	10,80	11,65	2,5	63,1	90	
	Total	15,82	11,43	12,2	2,5	63,1	153	
Peptídeo C (ng/ml)	CC	3,47	1,65	3,2	0,8	8	63	0,015*
	CT/TT	2,87	1,36	2,6	0,6	8,4	93	
	Total	3,11	1,51	2,8	0,6	8,4	156	

Resultado do teste t-Student

* Resultado do teste Mann-Whitney

Verificou-se que na avaliação do modelo Homa Oxford, utilizando as concentrações basais de glicemia e peptídeo-c, os portadores do alelo T apresentaram maior sensibilidade à insulina (%S) ($p=0,021$), e menor resistência à insulina (IR) ($p=0,020$) do que os não portadores.

Tabela 5. Homa Oxford nos pacientes com DM2. Função das células beta (%B), sensibilidade à insulina (%S), resistência à insulina (IR)

HOMA	rs7903146	Média	DP	Mediana	Mínimo	Máximo	N	P
% B	CC	100,97	58,67	101,20	11,2	279,6	60	0,095*
	CT/TT	85,69	51,98	76,10	14,4	316,3	91	
% S	CC	44,22	29,05	34,65	8,3	168	60	0,021
	CT/TT	50,92	29,51	44,90	11,7	226,9	91	
RI	CC	3,10	1,82	2,90	0,6	12	60	0,020
	CT/TT	2,53	1,42	2,20	0,4	8,5	91	

Resultado do teste Mann-Whitney

* Resultado do teste t-Student

5.4 Caracterização da Subpopulação Estudada

Foram avaliados 56 indivíduos, sendo 26 portadores da variante CC e 30 portadores das variantes CT/TT do rs7903146. Conforme apresentado na tabela 6, a amostra é representativa da população geral estudada.

Tabela 6. Características clínicas dos pacientes submetidos ao teste da refeição

Variável	rs7903146	Média	DP	Mediana	Mínimo	Máximo	N	P
Idade (anos)	CC	59,65	6,07	60,50	47	69	26	0,310
	CT/TT	57,80	7,28	58,50	40	71	30	
IMC	CC	30,29	3,45	30,02	23,7	36,9	26	0,704
	CT/TT	29,86	4,74	29,34	21,1	39,4	30	
Tempo de doença (anos)	CC	6,31	3,90	5,00	1	13	26	0,197#
	CT/TT	4,93	3,34	4,50	0	12	30	
HbA1c (%)	CC	7,79	1,86	7,50	5,4	11,8	21	0,054
	CT/TT	6,89	0,95	6,85	5,5	9	28	
Insulina (μ U/mL)	CC	15,36	8,00	13,40	4,8	30,3	24	0,483
	CT/TT	13,79	8,09	11,80	4	42	29	
Peptídeo C (ng/mL)	CC	3,37	1,79	2,90	0,8	7,6	25	0,154
	CT/TT	2,80	0,90	2,70	1,3	5	30	

Resultado do teste t-Student

Resultado do teste Mann-Whitney

5.5 Testes da Refeição Antes e Após o Tratamento com Exenatide

Nos testes da refeição antes do tratamento foram avaliados 56 indivíduos, sendo 26 portadores da variante CC e 30 portadores das variantes CT/TT no rs7903146. Nos testes da refeição após o tratamento foram avaliados 46 indivíduos, sendo 21 portadores da variante CC e 25 portadores das variantes CT/ TT. Um total de 10 pacientes descontinuaram o tratamento, sendo 4 por motivos particulares e 6 (3 CC e 3 TT) por efeitos adversos da medicação, em maioria náuseas, vômitos ou dores abdominais. As variáveis analisadas durante os testes compreenderam: avaliação das concentrações plasmáticas de glicose, insulina, pró-insulina, peptídeo-C, glugacon, GLP-1 e

ácidos graxos livres. Foram também analisados peso, HbA1c, PCR e TNF- α basais antes e após o tratamento com exenatide. E realizado cálculo do índice insulinogênico (IGI 30), HOMA Oxford e relação pró-insulina/insulina.

5.5.1 Dosagens de Glicemia

Verificou-se que nos grupos CC e CT/TT as concentrações plasmáticas de glicose apresentaram comportamento semelhante durante o teste da refeição antes e após o tratamento, e em ambos os grupos houve redução significativa ($p=0,003$) das concentrações plasmáticas de glicose comparando o teste da refeição antes e após tratamento (Gráfico 1). Nos tempos 30 a 180 minutos o valor de glicemia média pré-tratamento foi estatisticamente maior que no pós-tratamento para ambos os grupos ($p < 0,05$) e tanto para o genótipo CC como para CT/TT houve redução média da glicemia com o tratamento ($p < 0,001$). As AUC 0-180 min de glicose foram semelhantes antes do tratamento, mas apresentaram diferença comparando-se antes e após o tratamento em ambos os grupos, ou seja, apresentaram redução após o tratamento em ambos os grupos de pacientes ($p < 0,001$) (Gráfico 2).

Gráfico 1. Glicemia (mg/dl) no teste da refeição de acordo com os genótipos CC x CT/TT antes e após tratamento, avaliado por ANOVA. Ambos os genótipos apresentaram redução semelhante das concentrações plasmáticas de glicose após o tratamento ($p<0,001$)

Gráfico 2. AUC 0-180 min da glicemia (mg/dl) no teste da refeição de acordo com os genótipos CC x CT/TT antes e após tratamento. Ambos os genótipos apresentaram redução semelhante das concentrações plasmáticas de glicose após o tratamento ($p<0,001$)

5.5.2 Dosagens de Insulina

Antes do tratamento, as concentrações plasmáticas de insulina durante o teste da refeição, foram maiores nos indivíduos CT/TT nos tempos 30 a 120 min, comparados aos indivíduos CC ($p < 0,05$), e somente os indivíduos CT/TT demonstraram redução significativa das concentrações de insulina durante o teste da refeição após o tratamento ($p < 0,05$), nos tempos 30 a 180 min da curva. Enquanto nos portadores do genótipo CC não verificamos diferença nas concentrações de insulina comparando os testes antes e após tratamento, pela avaliação da análise de variância (Gráfico 3). Na avaliação das AUC 0-180 min as concentrações de insulina foram semelhantes entre os grupos antes do tratamento, e na avaliação comparativa após o tratamento verificamos que as AUC médias de insulina, diminuíram apenas nos pacientes CT/TT ($p < 0,001$) (Gráfico 4).

Gráfico 3. Insulina ($\mu\text{U/ml}$) no teste da refeição de acordo com os genótipos CC x CT/TT antes e após tratamento, avaliado por ANOVA. No grupo CT/TT valores mais elevadas de insulina nos tempos 30 a 120 min antes do tratamento ($p < 0,05$). Redução somente no grupo CT/TT nos tempos 30 a 180 min após o tratamento ($p < 0,005$)

Gráfico 4. AUC 0-180 min da insulina ($\mu\text{U/ml}$) no teste da refeição de acordo com os genótipos CC x CT/TT antes e após tratamento. Apenas indivíduos CT/TT apresentaram redução das concentrações plasmáticas de insulina após o tratamento ($p < 0,001$)

5.5.3 Dosagens de Pró-insulina

Durante o teste da refeição antes do tratamento, as concentrações plasmáticas de pró-insulina, foram maiores nos indivíduos CT/TT nos tempos 45 a 240 min comparados aos indivíduos CC ($p < 0,05$). Os indivíduos CT/TT demonstraram maior redução durante o teste da refeição após o tratamento ($p < 0,001$), nos portadores do genótipo CC houve redução nas concentrações de pró-insulina, porém menor do que no grupo CT/TT após o tratamento (Gráfico 5). As AUC médias de pró-insulina foram maiores no grupo CT/TT antes do tratamento e diminuíram apenas nos pacientes CT/TT após o tratamento ($p < 0,001$), sendo que neste grupo a redução na AUC de pró-insulina foi suficiente para verificarmos que a AUC média após o tratamento é menor nos pacientes CT/TT ($p = 0,019$) (Gráfico 6).

Gráfico 5. Pró-insulina (pmol/L) no teste da refeição de acordo com os genótipos CC x CT/TT antes e após tratamento, avaliado por ANOVA. No grupo CT/TT concentrações mais elevadas de pró-insulina antes do tratamento nos tempos 45 a 240 ($p < 0,001$). Após tratamento redução dos valores de pró-insulina no grupo CT/TT nos tempos 30 a 240 min ($p < 0,001$) e grupo CC nos tempos 90 a 180 ($p < 0,05$). A redução da pró-insulina após tratamento foi maior no grupo CT/TT do que no CC ($p < 0,001$)

Gráfico 6. AUC 0-180 min da pró-insulina (pmol/L) no teste da refeição de acordo com os genótipos CC x CT/TT antes e após tratamento. Redução apenas no grupo CT/TT ($p < 0,001$) após tratamento, a AUC 0-180min média pós tratamento foi menor no grupo CT/TT ($p = 0,019$)

5.5.4 Dosagens de Peptídeo C

O valor médio de peptídeo-C no grupo CT/TT foi estatisticamente maior que no grupo CC na avaliação pré-tratamento nos tempos 60 a 120 minutos ($p < 0,05$). Na avaliação após o tratamento apenas o grupo CT/TT apresentou redução nas concentrações séricas do peptídeo-C, observada nos tempos 60 a 180 minutos ($p < 0,001$) (Gráfico 7). Na avaliação das AUC 0-180 min não foi significativa a diferença entre os genótipos antes do tratamento, porém verificou-se que apenas os indivíduos CT/TT apresentaram redução na AUC de peptídeo-C após tratamento ($p < 0,001$) (Gráfico 8).

Gráfico 7. Peptídeo-C (ng/ml) no teste da refeição 500 kcal de acordo de acordo com os genótipos CC x CT/TT antes e após o tratamento, avaliado por ANOVA. No grupo CT/TT concentrações plasmáticas de peptídeo-C mais elevadas antes do tratamento nos tempos 60 a 120 min. Redução apenas no grupo CT/TT após o tratamento, nos tempos 60 a 180 min ($p<0,001$)

Gráfico 8. AUC 0-180 min do peptídeo-C (ng/ml) no teste da refeição de acordo com os genótipos CC x CT/TT antes e após tratamento. Valores semelhantes de peptídeo-C antes do tratamento. Apenas no grupo CT/TT redução na AUC de peptídeo-C após tratamento ($p<0,001$)

5.5.5 Dosagens de Glucagon

Verificou-se que antes do tratamento as concentrações plasmáticas de glucagon foram semelhantes entre os genótipos CC e CT/TT e que após o tratamento ambos os grupos apresentaram o mesmo comportamento, com redução nas concentrações plasmáticas de glucagon nos tempos 15 a 120 minutos ($p < 0,001$) (Gráfico 9). As AUC 0-180 min de glucagon foram semelhantes antes do tratamento, mas apresentaram redução após o tratamento em ambos os grupos de pacientes ($p < 0,001$) (Gráfico 10).

Gráfico 9. Glucagon (pg/ml) no teste da refeição de acordo com os genótipos CT/TT x CC antes e após tratamento, avaliado por ANOVA. Ambos os grupos apresentaram redução semelhante do glucagon após o tratamento ($p < 0,001$)

Gráfico 10. AUC 0-180 min do glucagon (pg/ml) no teste da refeição de acordo com os genótipos CT/TT x CC antes e após tratamento. Ambos os grupos apresentaram redução semelhante do glucagon após o tratamento ($p < 0,001$)

5.5.6 Dosagens de GLP-1

As concentrações plasmáticas de GLP-1 foram semelhantes de acordo com os genótipos, sendo significativa a redução nas concentrações após o tratamento em todos os tempos da curva independente do genótipo ($p < 0,001$). Verificou-se aumento médio estatisticamente significativo do GLP-1 de 0 até 90 minutos em ambos os grupos em relação aos tempos finais (picos 30 e 45 minutos) ($p < 0,05$).

Gráfico 11. GLP-1 (pMol/L) no teste da refeição de acordo com os genótipos CC x CT/TT antes e após tratamento ($p < 0,001$)

5.5.7 Dosagens de Ácidos Graxos Livres – AGL

As concentrações plasmáticas médias dos AGL após o tratamento foram maiores em ambos os grupos após 120 minutos ($p < 0,05$) e observou-se aumento médio significativo dos AGL após o tratamento em ambos os genótipos ($p < 0,05$). Sendo que os AGL apresentaram comportamento diferente de acordo com os genótipos quando comparados os momentos antes e após o tratamento ($p = 0,027$). Considerando as curvas após o tratamento com exenatide, os pacientes com genótipo CC apresentam em média níveis mais baixos de AGL que pacientes com genótipos CT/TT ($p = 0,017$).

Gráfico 12. AGL (mEq/L) no teste da refeição de acordo com os genótipos CC x CT/TT antes e após-tratamento. Elevação após o tratamento em ambos os genótipos ($p < 0,05$), o grupo CT/TT apresentou valores mais elevados ($p = 0,017$)

Gráfico 13. AUC 0-180 min dos AGL (mEq/L) no teste da refeição de acordo com os genótipos CC x CT/TT antes e após tratamento. Elevação após o tratamento no grupo CT/TT ($p = 0,0001$), grupo CC (NS)

5.5.8 Peso

A redução de peso após o tratamento foi significativa em ambos os grupos CC ($p<0,001$) e CT/TT ($p<0,001$), sendo que os pacientes CC apresentaram redução média de $2,16 \pm 2,2$ kg após 2 meses de tratamento e os pacientes CT/TT apresentaram redução média de $2,49 \pm 6,8$ kg (Tabela 7).

5.5.9 Dosagens de PCR e TNF α

Os valores de PCR não apresentaram diferenças na avaliação de acordo com os genótipos antes ou após o tratamento. As concentrações plasmáticas de TNF α apresentaram redução após o tratamento com exenatide ($p<0,001$) em ambos os grupos CC e CT/TT, no entanto os valores de TNF α foram maiores no grupo CT/TT tanto antes quanto após o tratamento, sendo em média 0,72 maior nesses pacientes independente do momento do tratamento ($p<0,001$) (Tabela 7).

5.5.10 Valores de Hemoglobina Glicada A1C

Os valores de HbA1C foram semelhantes antes do tratamento, e apresentaram redução significativa em ambos os grupos CC e CT/TT após o tratamento de 8 semanas com exenatide ($p=0,036$) (Tabela 7).

Tabela 7. Resultado das comparações múltiplas entre peso e valores basais de HbA1c, PCR, e TNF α entre grupos antes e após o tratamento com exenatida

Variável	Comparação	Diferença média	Erro Padrão	p	IC (95%)	
					Inferior	Superior
Peso (Kg)	CC (pré) VS CC (pós)	2,16	0,04	<0,001	2,08	2,25
	CC (pré) VS CT/TT (pré)	-0,23	3,71	>0,999	-7,51	7,05
	CC (pós) VS CT/TT (pós)	0,09	3,71	>0,999	-7,19	7,37
	CT/TT (pré) VS CT/TT (pós)	2,49	0,04	<0,001	2,41	2,56
HbA1C (%)	Pré x Pós	0,24	0,11	0,036	0,02	0,46
PCR (mg/dl)	CC (pré) x CC (pós)	-0,38	0,33	>0,999	-1,02	0,27
	CC (pré) x CT/TT (pré)	-1,68	1,27	>0,999	-4,18	0,81
	CC (pós) x CT/TT (pós)	-0,26	1,15	>0,999	-2,52	1,99
	CT/TT(pré) x CT/TT(pós)	1,04	0,46	0,133	0,15	1,94
TNF α (pg/ml)	CC x CT/TT	-0,72	0,12	<0,001	-0,96	-0,48
	Pré x Pós	0,32	0,04	<0,001	0,23	0,41

5.5.11 Avaliação do Índice de Secreção de Insulina (IGI 30)

Índice de secreção de insulina ou índice insulinogênico (IGI 30) avalia a função da célula beta usando a primeira fase de resposta insulínica pós-prandial, o qual foi definido como a taxa de incremento da insulina plasmática no tempo 30 min após a refeição: $IGI\ 30 = \frac{I\ 30 - I\ 0}{G\ 30 - G\ 0}$. Não houve diferença no índice de secreção de insulina de acordo com os genótipos CC e CT/TT antes do tratamento ($p = 0,877$) e nem na comparação entre genótipos antes e após o tratamento ($p = 0,473$) (Tabela 8).

Tabela 8. IGI 30 realizado com os valores de glicose e insulina (pmol/mmol) durante o teste da refeição, antes e após o tratamento com exenatida nos grupos CC x CT/TT

Variável	Momento	Grupo						
		CC			CT/TT			
		Média	DP	N	Média	DP	N	Sig.
IGI 30 pmol/mmol	Antes	1,52	3,49	26	1,31	1,95	30	p>0,05
	Após	0,82	3,00	21	1,21	2,69	25	

5.5.12 Avaliação do Homa Oxford

A avaliação do Homa estimou os graus da função das células beta (B%), sensibilidade à insulina (S%) e resistência à insulina (IR), de acordo com os genótipos antes e após o tratamento com exenatide, para o cálculo foram utilizadas as concentrações séricas basais de glicemia e peptídeo c. Verificou-se que % B foi semelhante de acordo com os genótipos, no entanto verificamos uma tendência a menores valores de B% nos portadores do alelo T ($p=0,053$). Houve elevação do B% após o tratamento em ambos os grupos, em média 21,3% ($p = 0,015$). O IR apresentou diferença entre os grupos de genótipos ($p=0,042$), tanto antes quanto após o tratamento, sendo em média 0,87 menor nos pacientes com alelo T. Não foi constatada diferença no IR após o tratamento com exenatide (Tabela 9).

Tabela 9. Modelo Homa Oxford comparando grupos CC x CT/TT antes e após o tratamento com exenatide, função das células beta (%B), sensibilidade à insulina (%S), resistência à insulina (IR).

Homa	Tratamento	CC		CT/TT		p
		Média	DP	Média	DP	
B (%)	Pré	124,19	68,68	92,77	59,06	0,015*
	Pós	147,63	119,68	102,41	72,81	
S (%)	Pré	34,61	18,76	50,84	31,13	0,058
	Pós	39,93	33,21	53,53	26,64	
IR	Pré	3,59	1,60	2,78	1,64	0,042 #
	Pós	3,61	1,85	2,48	1,64	

* Elevação B(%) antes x após tratamento independente do genótipo,

IR médio menor no grupo CT/TT independente do tratamento

6 DISCUSSÃO

Os resultados do presente estudo mostraram que a presença do alelo T em indivíduos com DM2 em resposta ao teste da refeição esteve associada à maior secreção de insulina, pró-insulina e peptídeo-c em relação aos não portadores, embora não tenha havido diferença nas concentrações séricas de glucagon e glicose. Demonstrou-se também que após o tratamento com exenatide, somente os portadores do alelo T apresentaram redução significativa nas concentrações plasmáticas pós-prandiais de insulina e peptídeo-c e, ambos os grupos apresentaram redução da pró-insulina, no entanto, a redução da pró-insulina foi maior nos portadores do alelo T.

Tem sido bem estabelecido que o efeito diabetogênico do *TCF7L2* se expressa na secreção de insulina ^(18,36). Entretanto já foi evidenciado um efeito negativo do alelo T no rs7903146 do *TCF7L2* na sensibilidade à insulina ^(38,39). Assim como, sabe-se da interferência das variantes do *TCF7L2* no efeito incretínico, relacionado ao DM2 ^(13,15). Na população de indivíduos com DM2 estudada, verificamos que o grupo de portadores do alelo T no rs 7903146 do gene *TCF7L2*, apresentou no jejum, concentrações plasmáticas de peptídeo-C menores do que os não portadores, associadas a semelhantes concentrações plasmáticas de glicose e insulina em ambos os grupos. No entanto, evidenciamos nos portadores do alelo T uma maior elevação das concentrações de insulina, peptídeo-c e pró-insulina pós-prandial, aspecto que diferiu de estudos prévios, realizados com indivíduos não diabéticos durante o OGTT ^(14, 84).

Na avaliação do modelo Homa Oxford verificou-se tendência a um menor percentual de função da célula beta nos portadores do alelo T antes do tratamento, mas ambos os grupos de genótipos demonstraram melhora nesse índice após o tratamento. Além disso, o índice de resistência à insulina foi menor nos portadores do alelo T e não foi constatada diferença após o tratamento com exenatide. Esses dados apontam para uma interferência do alelo T na função basal da célula beta ^(15,18). No entanto, acrescenta-se o fato de que o modelo Homa utiliza valores laboratoriais basais, e neste estudo verificamos que as maiores diferenças entre os genótipos se salientaram durante o teste da refeição. Adicionalmente, os não portadores do alelo T manifestaram algumas características fenotípicas associadas à resistência à insulina, como maior relação pescoço/coxa, menores concentrações plasmáticas de HDL e maiores concentrações de ácido úrico. O gene *TCF7L2* tem sido apontado como o de maior risco para o DM2 independente de etnias, na população brasileira, poucos são os estudos que descrevem a prevalência dos genótipos da variante rs7903146 do gene *TCF7L2* ⁽⁸⁶⁾ em pacientes com DM2. No presente estudo, verificou-se que a prevalência do alelo T tanto em homo como em heterozigose, foi semelhante entre grupo controle e DM2. Acredita-se que esse resultado provavelmente seja decorrente do tamanho da amostra, que é pequena para este tipo de investigação.

Após o tratamento com exenatide houve redução nas concentrações séricas de glicose pós-prandial, em ambos os grupos CC e CT/TT. Por outro lado, as concentrações séricas de insulina, que foram maiores nos portadores do alelo T durante o teste da refeição antes do tratamento, reduziram significativamente após o tratamento apenas neste grupo. Já foi sugerido em

alguns estudos que indivíduos portadores do alelo T, podem apresentar maior redução na sensibilidade à insulina aliada à falência das células beta em compensar totalmente o grau de resistência ⁽³⁸⁾. As menores elevações nas concentrações de insulina no estado pós-prandial nos portadores do alelo T após o tratamento, associadas a comparáveis glicemias e semelhante redução no peso, observadas em nosso estudo, sugerem que o tratamento com GLP-1 mimético promove a secreção de uma insulina mais eficiente, melhora sensibilidade à insulina ou ainda determina melhor captação de glicose mediada pelo GLP-1 em indivíduos CT/TT comparados aos CC. Sugerindo que os portadores do alelo T são, em certos aspectos, melhor responsivos ao tratamento com o GLP-1 mimético. Por outro lado, o tratamento com exenatide foi também eficaz em reduzir as concentrações séricas pós-prandiais de glucagon, independente do genótipo. Evidenciando que a responsividade da célula alfa ao GLP-1 não parece ser afetada pelos genótipos do *TCF7L2* ⁽⁸⁵⁾, mas acredita-se que a redução na produção hepática de glicose devido à diminuição do glucagon, possa influenciar a resposta observada. Além disso, sabe-se que a resposta ao tratamento com exenatide pode estar relacionada a outros fatores que melhoram a sensibilidade à insulina, como sua influência nas citocinas inflamatórias ^(31,83), verificamos redução nas concentrações de TNF α após o tratamento independente do genótipo, sendo os portadores do alelo T o grupo que apresentou valores mais elevados tanto antes como após o uso da medicação, assim o efeito anti-inflamatório associado ao exenatide pode ter contribuído para a melhora na sensibilidade a insulina observada nos portadores do alelo T. Adicionalmente, não verificamos supressão dos AGL mediante o uso da medicação, conforme descrito previamente ⁽⁸³⁾.

Verificou-se ainda que, os carreadores do alelo T apresentaram maiores concentrações plasmáticas de pró-insulina durante o teste da refeição antes do tratamento, e que houve redução mais significativa deste hormônio nesse grupo após o tratamento. Sabe-se que, a elevação da pró-insulina pode estar associada à defeito da célula β em processar a insulina ou, à resistência à insulina ^(27,59,60). A maior redução da pró-insulina, observada no grupo CT/TT após o tratamento, sugere que o uso de exenatide nesses indivíduos pode ter apresentado um papel mais importante na resposta funcional da célula beta comparados ao grupo CC. Assim, os resultados do presente estudo proporcionam adicionais evidências de que os fatores que relacionam o polimorfismo do gene *TCF7L2* ao DM2, podem estar em dois dos mecanismos principais de sua fisiopatologia, defeitos na ação do GLP-1 na ilhota pancreática bem como na ação periférica do GLP-1.

Sugere-se que, a maior redução nas concentrações séricas de insulina e pró-insulina nos portadores do alelo T, após administração do GLP-1 mimético tenha ocorrido em parte, devido aos efeitos extra-pancreáticos já conhecidos do GLP-1 em vários tecidos, como fígado, músculo esquelético e tecido adiposo, melhorando a captação de glicose nesses tecidos. Embora não seja classicamente descrito que os receptores do GLP-1 sejam expressos em tecidos periféricos sensíveis à insulina, vários estudos têm sugerido que o tratamento crônico com agonistas do GLP-1 está associado com melhora da sensibilidade à insulina ^(54,59). O exenatide assemelha-se ao GLP-1 estimulando o transporte de glicose e o metabolismo no fígado de ratos, no músculo esquelético e tecido adiposo, de uma forma insulino-independente, o mesmo ocorre em relação a lipogênese e lipólise nas células adiposas ⁽⁷⁸⁾. No músculo

de rato, o exenatide tal como GLP-1, estimula a expressão in vivo de transportadores de glicose ⁽⁷⁹⁾. Acredita-se que as ações do exenatide, do tipo glicorregulatórios GLP-1-like sejam exercidas, não só através do receptor pancreático do GLP-1, mas também através da interação com os receptores de GLP-1 no fígado e no músculo ^(79,81), que parecem ser estruturalmente e/ou funcionalmente diferentes daquele do pâncreas. Além disso, a regulação da homeostase da glicose pelo GLP-1, em parte, pode ser central, acredita-se que o fenótipo da presença do alelo T no rs7903146 do gene *TCF7L2* pode ser também associado a um defeito central da ação do GLP-1 ⁽³⁶⁾. Existem evidências de que as características fenotípicas dos portadores do alelo T, que incluem diminuição na secreção de insulina estimulada pela glicose e redução da sensibilidade hepática à insulina, são semelhantes às observadas em ratos com knockout do receptor do GLP-1 ⁽³⁷⁾. Recentes estudos sugerem que o GLP-1 mimético pode contribuir para a redução da glicose pós-prandial pelo aumento da utilização muscular e/ou redução da produção hepática de glicose ⁽⁵¹⁾. Essas características ficam evidentes em nossos achados, os quais sugerem que a ação do GLP-1mimético, especialmente nos portadores do alelo T, promoveu maior redução nas concentrações plasmáticas de pró-insulina, insulina e peptídeo C pós-prandiais.

As concentrações plasmáticas de GLP-1 não apresentaram diferenças importantes de acordo com a presença do alelo de risco, e apresentaram redução significativa após o tratamento com exenatida em ambos os grupos. Esse dado está de acordo com a hipótese de que a presença do alelo T no rs7903146 estaria mais relacionada à menor resposta ao GLP-1 endógeno do que a um defeito de secreção de GLP-1 ⁽²⁴⁾.

Trabalhos anteriores já demonstraram que o GLP-1 também inibe a secreção do glucagon, além do efeito parácrino e inibitório da insulina sobre a secreção de glucagon pela célula α ⁽⁵⁸⁾. Acredita-se, entretanto, que outros mecanismos, ainda pouco conhecidos, regulem a função da célula α . Sabe-se também que o efeito hipoglicemiante pós-prandial do exenatide tem sido explicado, pela supressão do glucagon e pelo atraso no esvaziamento gástrico ⁽³⁰⁾. No presente estudo, o efeito de redução do glucagon após o tratamento foi bem demonstrado, mas não foram verificadas diferenças nessa variável de acordo com os genótipos, sugerindo que nos portadores do alelo T a diferença na resposta à medicação envolveu principalmente outros mecanismos de ação do GLP-1.

O presente estudo é o primeiro a demonstrar o efeito positivo da presença da variante rs7903146 do gene *TCF7L2* na resposta ao exenatide em pacientes com DM2. Além disso, possibilitou a análise da resposta terapêutica à droga de acordo com a presença do polimorfismo em questão e enfatizou a relevância deste polimorfismo na resposta ao medicamento.

7 CONCLUSÕES

Considerando os dados do presente estudo, conclui-se que, indivíduos com DM2 portadores do alelo T no rs7903146 do gene *TCF7L2*, apresentam diferentes padrões de resposta ao teste da refeição de 500 kcal, em relação as secreções de pró-insulina, insulina e peptídeo-C comparados aos não portadores. Antes do tratamento os portadores do alelo de risco apresentaram concentrações pós-prandiais mais elevadas de pró-insulina, insulina e peptídeo, e após o tratamento esse grupo apresentou redução significativa nessas variáveis, ao contrário dos indivíduos não portadores do alelo T. Portanto, os pacientes com DM2 portadores do alelo T manifestam uma resposta adequada ao tratamento com o GLP-1 mimético e manifestam frente ao uso da medicação um comportamento que sugere mais importante melhora na função da célula beta e melhor captação periférica de glicose em relação aos não portadores.

8 ANEXOS

Anexo A

Tabela 1. Descrição das médias e desvios padrões das variáveis em estudo em todos os tempos de resposta ao teste da refeição antes e após o tratamento avaliado por ANOVA

Glicemia (mg/dl) Tempo da curva (minutos)	Pré-tratamento						Pós-tratamento					
	CC			CT/TT			CC			CT/TT		
	Média	DP	N	Média	DP	N	Média	DP	N	Média	DP	N
0	143,96	53,60	26	140,10	43,42	30	139,24	59,53	21	127,48	41,77	25
15	152,38	60,07	26	150,10	43,34	30	136,95	57,58	21	130,52	41,56	25
30	182,08	74,56	26	188,10	57,88	30	146,90	59,34	21	141,68	47,76	25
45	202,46	76,98	26	209,63	59,22	30	154,10	56,24	21	150,20	56,11	25
60	216,08	83,04	26	224,27	69,01	30	152,33	54,95	21	150,60	61,16	25
90	225,73	81,60	26	226,33	68,23	30	144,00	52,00	21	146,80	65,67	25
120	228,77	82,41	26	218,73	66,59	30	130,57	48,58	21	139,20	62,36	25
180	203,23	81,49	26	179,17	70,38	30	136,05	51,77	21	130,68	46,83	25
240	170,65	77,11	26	141,13	61,07	30	143,14	54,63	21	132,60	43,86	25

GLP-1 (pmol/L) Tempo da curva (minutos)	Pré-tratamento						Pós-tratamento					
	CC			CT/TT			CC			CT/TT		
	Média	DP	N	Média	DP	N	Média	DP	N	Média	DP	N
0	3,81	3,18	24	4,24	3,09	28	2,74	2,54	21	3,29	3,16	23
15	7,42	5,89	24	6,72	4,14	28	4,53	4,21	20	5,32	4,36	23
30	8,76	5,69	24	9,75	6,60	28	5,62	3,98	20	5,09	3,67	23
45	10,27	13,91	24	9,54	7,00	28	6,11	5,03	20	5,30	4,04	23
60	7,15	4,47	24	8,59	6,18	28	5,18	4,56	20	4,87	4,38	23
90	6,94	6,06	24	7,10	5,89	28	4,02	3,14	20	4,49	3,81	23
120	6,52	4,05	24	6,49	5,56	28	3,25	3,07	20	4,36	4,06	23
180	5,05	3,53	24	6,50	4,86	28	3,21	3,15	20	4,47	3,83	23
240	5,76	5,77	24	6,10	4,57	28	3,81	5,00	20	4,25	3,48	23

AGL (mEq/L) Tempo da curva (minutos)	Pré-tratamento						Pós-tratamento					
	CC			CT/TT			CC			CT/TT		
	Média	DP	N	Média	DP	N	Média	DP	N	Média	DP	N
0	0,68	0,27	26	0,74	0,28	29	0,68	0,27	21	0,79	0,26	25
60	0,42	0,14	26	0,37	0,14	29	0,46	0,22	21	0,53	0,18	25
120	0,28	0,13	26	0,22	0,09	29	0,41	0,33	20	0,44	0,30	25
180	0,27	0,17	26	0,19	0,10	29	0,45	0,25	20	0,49	0,40	25
240	0,33	0,20	26	0,28	0,14	29	0,45	0,31	20	0,43	0,27	25

Insulina(μU/dl) Tempo da curva (minutos)	Pré-tratamento						Pós-tratamento					
	CC			CT/TT			CC			CT/TT		
	Média	DP	N	Média	DP	N	Média	DP	N	Média	DP	N
0	27,37	11,90	26	26,26	11,48	30	29,75	14,23	21	26,39	15,12	25
15	41,96	21,07	26	51,27	31,07	30	42,61	15,94	21	45,72	26,29	25
30	53,29	26,05	26	82,04	47,95	30	50,05	23,62	21	54,31	34,53	25
45	67,91	47,83	26	97,64	50,33	30	63,76	46,10	21	68,99	49,00	25
60	71,79	51,08	26	106,79	51,85	30	71,62	59,40	21	70,47	47,55	25
90	80,85	56,77	26	122,10	62,96	30	73,16	85,30	21	67,15	45,85	25
120	89,18	59,81	26	120,30	52,98	30	64,75	83,25	21	62,19	46,39	25
180	74,47	46,73	26	85,80	47,72	30	63,31	50,65	21	57,26	38,24	25
240	55,24	37,33	26	46,68	26,88	30	70,05	70,98	21	56,10	37,63	25

Continua...

Conclusão Tabela 1 do Anexo A

Glucagon(pg/ml) Tempo da curva (minutos)	Pré-tratamento						Pós-tratamento					
	CC			CT/TT			CC			CT/TT		
	Média	DP	N	Média	DP	N	Média	DP	N	Média	DP	N
0	117,23	31,66	26	108,18	25,32	30	108,51	29,64	22	104,01	20,65	25
15	135,88	33,28	26	128,25	32,32	30	116,06	32,86	22	106,62	26,11	25
30	143,90	41,04	26	130,70	34,33	30	120,61	33,01	22	104,23	31,85	25
45	140,76	37,36	26	123,93	32,65	30	112,01	33,41	22	101,21	26,86	25
60	131,05	42,12	26	116,98	28,19	30	104,81	28,84	22	96,08	26,03	25
90	123,30	32,34	26	108,28	26,46	30	98,82	28,93	21	91,55	23,76	25
120	121,99	32,39	26	107,06	25,09	30	94,42	28,08	21	89,95	24,18	25
180	116,36	32,27	26	99,70	19,80	30	99,65	21,79	21	93,77	22,02	25
240	110,72	27,48	26	100,12	19,06	30	104,34	26,16	21	94,08	23,96	25

Pró-Insulina (pmol/L) Tempo da curva (minutos)	Pré-tratamento						Pós-tratamento					
	CC			CT/TT			CC			CT/TT		
	Média	DP	N	Média	DP	N	Média	DP	N	Média	DP	N
0	33,80	16,84	24	38,98	26,59	30	23,87	14,49	21	27,66	16,05	24
15	36,26	17,50	24	47,58	34,93	30	26,73	16,55	21	32,80	20,74	24
30	45,59	29,09	24	58,82	40,69	30	28,14	17,01	21	37,35	22,90	24
45	45,48	27,77	25	71,06	46,15	30	34,37	19,30	21	44,25	26,83	24
60	49,82	28,43	25	81,91	49,02	30	38,85	21,00	21	51,01	27,46	24
90	60,70	32,18	25	100,23	50,52	30	46,32	27,15	21	61,43	34,86	24
120	68,80	36,81	25	111,67	53,31	30	50,36	31,44	21	66,20	37,28	24
180	72,88	38,15	25	105,53	53,01	30	53,03	27,50	21	67,47	38,63	25
240	65,82	34,64	25	89,61	54,45	30	56,14	25,73	21	68,85	33,80	25

Peptídeo- C(ng/ml) Tempo da curva (minutos)	Pré-tratamento						Pós-tratamento					
	CC			CT/TT			CC			CT/TT		
	Média	DP	N	Média	DP	N	Média	DP	N	Média	DP	N
0	2,90	1,30	26	2,45	1,14	30	2,81	1,46	21	2,57	1,39	25
15	3,53	1,46	26	3,40	1,54	30	3,58	1,61	21	3,40	1,50	25
30	3,90	1,51	26	4,51	2,26	30	4,04	1,69	21	3,86	2,03	25
45	4,45	1,81	26	5,35	2,38	30	4,61	2,01	21	4,68	2,57	25
60	4,84	1,81	26	6,12	2,35	30	5,20	2,64	21	5,20	2,74	25
90	5,60	2,21	26	7,30	2,55	30	5,55	3,00	21	5,50	3,06	25
120	6,31	2,57	26	7,97	2,76	30	5,36	3,58	21	5,48	3,29	25
180	6,20	2,70	26	7,19	2,67	30	5,08	2,46	21	5,31	3,14	25
240	5,56	2,60	26	5,27	2,33	30	6,01	3,51	21	5,26	2,41	25

Tabela 2. Análises comparativas das curvas de resposta ao teste da refeição antes a após o tratamento avaliadas ponto a ponto por ANOVA

	Comparação	Diferença média	Erro Padrão	Valor t	p
Glicemia	(Tempo 0) pré VS pós	10,15	6,74	1,51	>0,999
	(Tempo 15) pré VS pós	18,81	6,74	2,79	0,846
	(Tempo 30) pré VS pós	42,34	6,74	6,28	<0,001
	(Tempo 45) pré VS pós	55,43	6,74	8,23	<0,001
	(Tempo 60) pré VS pós	70,18	6,74	10,42	<0,001
	(Tempo 90) pré VS pós	81,63	6,74	12,12	<0,001
	(Tempo 120) pré VS pós	89,23	6,74	13,24	<0,001
	(Tempo 180) pré VS pós	58,31	6,74	8,65	<0,001
	(Tempo 240) pré VS pós	18,53	6,74	2,75	0,958
	CC (pré) VS CC (pós)	56,63	3,46	16,39	<0,001
	CC (pré) VS CT/TT (pré)	5,31	14,46	0,37	>0,999
	CC (pós) VS CT/TT (pós)	-9,16	14,59	-0,63	>0,999
	CT/TT (pré) VS CT/TT (pós)	42,17	3,17	13,31	<0,001
GLP-1	Pré VS Pós	2,94	0,28	10,51	<0,001
	0 VS 15	-2,46	0,57	-4,34	<0,001
	0 VS 30	-3,87	0,57	-6,81	<0,001
	0 VS 45	-4,34	0,57	-7,65	<0,001
	0 VS 60	-2,97	0,57	-5,24	<0,001
	0 VS 90	-2,15	0,57	-3,78	0,006
	0 VS 120	-1,67	0,57	-2,94	0,127
	0 VS 180	-1,32	0,57	-2,32	0,753
	0 VS 240	-1,45	0,57	-2,56	0,395
	15 VS 30	-1,41	0,57	-2,47	0,500
	15 VS 45	-1,88	0,57	-3,30	0,038
	15 VS 60	-0,51	0,57	-0,90	>0,999
	15 VS 90	0,31	0,57	0,55	>0,999
	15 VS 120	0,80	0,57	1,40	>0,999
	15 VS 180	1,15	0,57	2,01	>0,999
	15 VS 240	1,01	0,57	1,78	>0,999
	30 VS 45	-0,47	0,57	-0,83	>0,999
	30 VS 60	0,89	0,57	1,57	>0,999
	30 VS 90	1,72	0,57	3,02	0,096
	30 VS 120	2,20	0,57	3,87	0,005
	30 VS 180	2,55	0,57	4,48	<0,001
	30 VS 240	2,42	0,57	4,25	0,001
	45 VS 60	1,37	0,57	2,40	0,603
	45 VS 90	2,19	0,57	3,85	0,005
	45 VS 120	2,67	0,57	4,70	<0,001
	45 VS 180	3,03	0,57	5,31	<0,001
	45 VS 240	2,89	0,57	5,08	<0,001
	60 VS 90	0,83	0,57	1,45	>0,999
	60 VS 120	1,31	0,57	2,30	0,797
	60 VS 180	1,66	0,57	2,91	0,136
	60 VS 240	1,52	0,57	2,68	0,279
	90 VS 120	0,48	0,57	0,85	>0,999
	90 VS 180	0,83	0,57	1,46	>0,999
	90 VS 240	0,70	0,57	1,22	>0,999
	120 VS 180	0,35	0,57	0,62	>0,999
	120 VS 240	0,22	0,57	0,38	>0,999
	180 VS 240	-0,13	0,57	-0,24	>0,999

Continua...

Continuação Tabela 2 do Anexo A

Comparação		Diferença média	Erro Padrão	Valor t	p
AGL	(Tempo 0) pré VS pós	-0,03	0,04	-0,84	>0,999
	(Tempo 60) pré VS pós	-0,11	0,04	-3,00	0,137
	(Tempo 120) pré VS pós	-0,18	0,04	-4,99	<0,001
	(Tempo 180) pré VS pós	-0,24	0,04	-6,64	<0,001
	(Tempo 240) pré VS pós	-0,14	0,04	-3,82	0,008
	CC (pré) VS CC (pós)	-0,10	0,03	-4,13	0,001
	CC (pré) VS CT/TT (pré)	0,04	0,04	0,88	>0,999
	CC (pós) VS CT/TT (pós)	0,14	0,04	3,17	0,017
	CT/TT (pré) VS CT/TT (pós)	-0,18	0,02	-7,92	<0,001
Tempo	Comparação	Diferença média	Erro Padrão	Valor t	p
Insulina	CC (pré) VS CT/TT (pré)	1,11	12,31	0,09	0,928
	CC (pós) VS CT/TT (pós)	4,99	13,07	0,38	0,703
	CC (pré) VS CC (pós)	-5,58	9,86	-0,57	0,571
	CT/TT (pré) VS CT/TT (pós)	-1,71	9,10	-0,19	0,851
	CC (pré) VS CT/TT (pré)	-9,32	12,31	-0,76	0,449
	CC (pós) VS CT/TT (pós)	-1,49	13,07	-0,11	0,909
	CC (pré) VS CC (pós)	-3,85	9,86	-0,39	0,696
	CT/TT (pré) VS CT/TT (pós)	3,97	9,10	0,44	0,663
	CC (pré) VS CT/TT (pré)	-28,75	12,31	-2,34	0,020
	CC (pós) VS CT/TT (pós)	-2,64	13,07	-0,20	0,840
	CC (pré) VS CC (pós)	0,04	9,86	0,00	0,997
	CT/TT (pré) VS CT/TT (pós)	26,15	9,10	2,87	0,004
	CC (pré) VS CT/TT (pré)	-29,73	12,31	-2,42	0,016
	CC (pós) VS CT/TT (pós)	-3,60	13,07	-0,28	0,783
	CC (pré) VS CC (pós)	0,94	9,86	0,10	0,924
	CT/TT (pré) VS CT/TT (pós)	27,07	9,10	2,98	0,003
	CC (pré) VS CT/TT (pré)	-35,01	12,31	-2,84	0,005
	CC (pós) VS CT/TT (pós)	2,78	13,07	0,21	0,832
	CC (pré) VS CC (pós)	-3,05	9,86	-0,31	0,758
	CT/TT (pré) VS CT/TT (pós)	34,74	9,10	3,82	0,000
	CC (pré) VS CT/TT (pré)	-41,25	12,31	-3,35	0,001
	CC (pós) VS CT/TT (pós)	7,63	13,07	0,58	0,559
	CC (pré) VS CC (pós)	4,49	9,86	0,46	0,649
	CT/TT (pré) VS CT/TT (pós)	53,37	9,10	5,87	<0,001
	CC (pré) VS CT/TT (pré)	-31,12	12,31	-2,53	0,012
	CC (pós) VS CT/TT (pós)	4,18	13,07	0,32	0,749
	CC (pré) VS CC (pós)	21,23	9,86	2,15	0,032
	CT/TT (pré) VS CT/TT (pós)	56,52	9,10	6,21	<0,001
	CC (pré) VS CT/TT (pré)	-11,33	12,31	-0,92	0,358
	CC (pós) VS CT/TT (pós)	7,67	13,07	0,59	0,558
	CC (pré) VS CC (pós)	7,96	9,86	0,81	0,420
	CT/TT (pré) VS CT/TT (pós)	26,96	9,10	2,96	0,003
	CC (pré) VS CT/TT (pré)	8,57	12,31	0,70	0,487
	CC (pós) VS CT/TT (pós)	15,58	13,07	1,19	0,234
	CC (pré) VS CC (pós)	-18,02	9,86	-1,83	0,068
	CT/TT (pré) VS CT/TT (pós)	-11,00	9,10	-1,21	0,227

Continua...

Continuação Tabela 2 do Anexo A

Comparação		Diferença média	Erro Padrão	Valor t	p
Glucagon	(Tempo 0) pré VS pós	6,47	3,41	1,90	>0,999
	(Tempo 15) pré VS pós	20,95	3,41	6,15	<0,001
	(Tempo 30) pré VS pós	25,13	3,41	7,37	<0,001
	(Tempo 45) pré VS pós	25,68	3,41	7,53	<0,001
	(Tempo 60) pré VS pós	23,54	3,41	6,91	<0,001
	(Tempo 90) pré VS pós	21,32	3,43	6,21	<0,001
	(Tempo 120) pré VS pós	22,93	3,43	6,68	<0,001
	(Tempo 180) pré VS pós	11,91	3,43	3,47	0,089
	(Tempo 240) pré VS pós	7,20	3,43	2,10	>0,999
	CC (pré) VS CC (pós)	21,31	1,73	12,31	<0,001
	CC (pré) VS CT/TT (pré)	13,11	6,53	2,01	0,304
	CC (pós) VS CT/TT (pós)	7,17	6,60	1,09	>0,999
	CT/TT (pré) VS CT/TT (pós)	15,38	1,61	9,54	<0,001
Tempo	Comparação	Diferença média	Erro Padrão	Valor t	p
Pró-insulina	0 CC (pré) VS CT/TT (pré)	-6,04	10,32	-0,59	0,559
	0 CC (pós) VS CT/TT (pós)	-7,50	10,57	-0,71	0,478
	0 CC (pré) VS CC (pós)	6,58	5,38	1,22	0,221
	0 CT/TT (pré) VS CT/TT (pós)	5,12	4,93	1,04	0,299
	15 CC (pré) VS CT/TT (pré)	-12,17	10,32	-1,18	0,239
	15 CC (pós) VS CT/TT (pós)	-9,77	10,57	-0,92	0,356
	15 CC (pré) VS CC (pós)	6,18	5,38	1,15	0,251
	15 CT/TT (pré) VS CT/TT (pós)	8,59	4,93	1,74	0,082
	30 CC (pré) VS CT/TT (pré)	-14,10	10,32	-1,37	0,173
	30 CC (pós) VS CT/TT (pós)	-12,92	10,57	-1,22	0,222
	30 CC (pré) VS CC (pós)	14,10	5,38	2,62	0,009
	30 CT/TT (pré) VS CT/TT (pós)	15,28	4,93	3,10	0,002
	45 CC (pré) VS CT/TT (pré)	-25,58	10,30	-2,48	0,013
	45 CC (pós) VS CT/TT (pós)	-13,59	10,57	-1,29	0,199
	45 CC (pré) VS CC (pós)	8,62	5,32	1,62	0,106
	45 CT/TT (pré) VS CT/TT (pós)	20,61	4,93	4,18	<0,001
	60 CC (pré) VS CT/TT (pré)	-32,09	10,30	-3,12	0,002
	60 CC (pós) VS CT/TT (pós)	-15,87	10,57	-1,50	0,134
	60 CC (pré) VS CC (pós)	8,48	5,32	1,59	0,112
	60 CT/TT (pré) VS CT/TT (pós)	24,71	4,93	5,01	<0,001
	90 CC (pré) VS CT/TT (pré)	-39,52	10,30	-3,84	<0,001
	90 CC (pós) VS CT/TT (pós)	-18,81	10,57	-1,78	0,075
	90 CC (pré) VS CC (pós)	11,90	5,32	2,23	0,026
	90 CT/TT (pré) VS CT/TT (pós)	32,61	4,93	6,61	<0,001
	120 CC (pré) VS CT/TT (pré)	-42,87	10,30	-4,16	<0,001
	120 CC (pós) VS CT/TT (pós)	-19,54	10,57	-1,85	0,065
	120 CC (pré) VS CC (pós)	15,95	5,32	3,00	0,003
	120 CT/TT (pré) VS CT/TT (pós)	39,28	4,93	7,97	<0,001
	180 CC (pré) VS CT/TT (pré)	-32,66	10,30	-3,17	0,002
	180 CC (pós) VS CT/TT (pós)	-19,34	10,54	-1,83	0,067
	180 CC (pré) VS CC (pós)	17,35	5,32	3,26	0,001
	180 CT/TT (pré) VS CT/TT (pós)	30,67	4,87	6,30	<0,001
	240 CC (pré) VS CT/TT (pré)	-23,79	10,30	-2,31	0,021
	240 CC (pós) VS CT/TT (pós)	-17,61	10,54	-1,67	0,095
	240 CC (pré) VS CC (pós)	7,19	5,32	1,35	0,177
	240 CT/TT (pré) VS CT/TT (pós)	13,37	4,87	2,74	0,006

Continua...

Conclusão Tabela 2 do Anexo A

Tempo		Comparação	Diferença média	Erro Padrão	Valor t	p
Peptídeo C	0	CC (pré) VS CT/TT (pré)	0,44	0,63	0,71	0,478
		CC (pós) VS CT/TT (pós)	0,54	0,65	0,82	0,410
		CC (pré) VS CC (pós)	-0,26	0,43	-0,61	0,541
		CT/TT (pré) VS CT/TT (pós)	-0,17	0,40	-0,42	0,674
	15	CC (pré) VS CT/TT (pré)	0,13	0,63	0,21	0,832
		CC (pós) VS CT/TT (pós)	0,47	0,65	0,72	0,471
		CC (pré) VS CC (pós)	-0,39	0,43	-0,90	0,366
		CT/TT (pré) VS CT/TT (pós)	-0,05	0,40	-0,12	0,901
	30	CC (pré) VS CT/TT (pré)	-0,60	0,63	-0,97	0,334
		CC (pós) VS CT/TT (pós)	0,47	0,65	0,72	0,469
		CC (pré) VS CC (pós)	-0,48	0,43	-1,12	0,263
		CT/TT (pré) VS CT/TT (pós)	0,60	0,40	1,50	0,134
	45	CC (pré) VS CT/TT (pré)	-0,90	0,63	-1,44	0,151
		CC (pós) VS CT/TT (pós)	0,23	0,65	0,36	0,720
		CC (pré) VS CC (pós)	-0,51	0,43	-1,19	0,233
		CT/TT (pré) VS CT/TT (pós)	0,62	0,40	1,56	0,120
	60	CC (pré) VS CT/TT (pré)	-1,28	0,63	-2,05	0,041
		CC (pós) VS CT/TT (pós)	0,29	0,65	0,44	0,661
		CC (pré) VS CC (pós)	-0,70	0,43	-1,63	0,103
		CT/TT (pré) VS CT/TT (pós)	0,87	0,40	2,18	0,030
	90	CC (pré) VS CT/TT (pré)	-1,70	0,63	-2,72	0,007
		CC (pós) VS CT/TT (pós)	0,35	0,65	0,53	0,595
		CC (pré) VS CC (pós)	-0,29	0,43	-0,68	0,496
		CT/TT (pré) VS CT/TT (pós)	1,76	0,40	4,42	<0,001
	120	CC (pré) VS CT/TT (pré)	-1,66	0,63	-2,65	0,008
		CC (pós) VS CT/TT (pós)	0,18	0,65	0,28	0,781
		CC (pré) VS CC (pós)	0,60	0,43	1,39	0,165
		CT/TT (pré) VS CT/TT (pós)	2,44	0,40	6,14	<0,001
180	CC (pré) VS CT/TT (pré)	-0,99	0,63	-1,58	0,115	
	CC (pós) VS CT/TT (pós)	0,06	0,65	0,09	0,926	
	CC (pré) VS CC (pós)	0,78	0,43	1,80	0,073	
	CT/TT (pré) VS CT/TT (pós)	1,82	0,40	4,59	<0,001	
240	CC (pré) VS CT/TT (pré)	0,29	0,63	0,46	0,645	
	CC (pós) VS CT/TT (pós)	1,05	0,65	1,60	0,110	
	CC (pré) VS CC (pós)	-0,80	0,43	-1,86	0,064	
	CT/TT (pré) VS CT/TT (pós)	-0,04	0,40	-0,11	0,915	

Tabela 3. Análises comparativas das AUC 0-180 min das curvas de resposta ao teste da refeição antes a após o tratamento

AUC 0-180 min	Comparação	Diferença média	Erro Padrão	Valor t	p
Glicose (mg/dl)	Pré VS Pós	11563,0	1398,7	8,27	<0,001
Glucagon (pg/ml)	Pré VS Pós	3509,8	630,0	5,57	<0,001
Insulina (μU/dl)	CC (pré) VS CT/TT (pré)	2177,3	1239,9	1,76	0,516
	CC (pós) VS CT/TT (pós)	-4078,2	1918,8	-2,13	0,235
	CC (pré) VS CC (pós)	461,4	2030,6	0,23	>0,999
	CT/TT (pré) VS CT/TT (pós)	6716,8	1138,8	5,9	<0,001
Peptídeo C (ng/dl)	CC (pré) VS CT/TT (pré)	20,6	65,8	0,31	>0,999
	CC (pós) VS CT/TT (pós)	-185,1	106,4	-1,74	0,533
	CC (pré) VS CC (pós)	54,0	112,1	0,48	>0,999
	CT/TT (pré) VS CT/TT (pós)	259,8	60,4	4,3	<0,001
Pró-insulina (pmol/L)	CC (pré) VS CT/TT (pré)	2382,0	981,4	2,43	0,116
	CC (pós) VS CT/TT (pós)	-5481,1	1751,3	-3,13	0,019
	CC (pré) VS CC (pós)	-2509,1	1831,7	-1,37	>0,999
	CT/TT (pré) VS CT/TT (pós)	5354,0	900,9	5,94	<0,001

Anexo B**HOSPITAL DAS CLÍNICAS****DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP****TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO****I - DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL**

1. NOME: .....

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : ..... SEXO : M ☐ F ☐

DATA NASCIMENTO: ...../...../.....

ENDEREÇO ..... Nº ..... APTO: .....

BAIRRO: .....

CIDADE .....

CEP: ..... TELEFONE: ..... DDD .....

2. RESPONSÁVEL LEGAL .....

NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.) .....

DOCUMENTO DE IDENTIDADE : ..... SEXO: M ☐ F ☐

DATA NASCIMENTO: ...../...../.....

ENDEREÇO: ..... Nº ..... APTO: .....

BAIRRO: .....

CIDADE: .....

CEP: ..... TELEFONE ..... DDD .....

II - DADOS SOBRE A PESQUISA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: “AVALIAÇÃO DA RESPOSTA AO USO DE ANÁLOGO DO GLP-1 EM FUNÇÃO DOS SNPs rs12255372 (G/T) e rs7903146 (C/T) DO GENE TCF7L2 EM INDIVÍDUOS COM DIABETE MELITO TIPO 2 ”

2. PESQUISADOR: Dra. Rosa Ferreira dos Santos

CARGO/ FUNÇÃO: Médica – Assistente do LIM-18 HCFMUSP ; Professora colaboradora da FMUSP

INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL DE MEDICINA - CREMESP - 15871

UNIDADE DO HCFMUSP: Endocrinologia e Metabologia – Depto. de Clínica Médica

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO ☒

RISCO MÉDIO ☐

RISCO BAIXO ☐

RISCO MAIOR ☐

4. DURAÇÃO DA PESQUISA: 04 anos

1- Desenho do estudo e Objetivos – Convidamos o(a) Sr(a) a participar VOLUNTARIAMENTE da presente pesquisa que tem por objetivo estudar a presença do gene *TCF7L2* em pacientes com Diabetes Mellito tipo 2 (DM2). A importância deste estudo está no fato de o DM2 ser uma doença muito frequente no mundo atual trazendo sérias complicações para os pacientes como: Cegueira, Insuficiência renal, Pressão alta, Infarto do Miocárdio, Derrame Cerebral, Amputações de membros inferiores, etc

O aparecimento do DM2 depende da presença de genes que predeterminam sua manifestação e de outros fatores relacionados ao estilo de vida do indivíduo como: Obesidade, Tabagismo, Sedentarismo, etc. Atualmente o conhecimento dos genes que predis põem às doenças tem ajudado muito tanto no tratamento como na prevenção das mesmas. A presente pesquisa visa estudar o gene *TCF7L2*, que tem sido considerado muito frequente nos pacientes com DM2, independente da raça do paciente.

O estudo que iremos desenvolver apresenta as seguintes etapas :

ETAPA 1 – TODOS OS PACIENTES CONVIDADOS PARTICIPARÃO –

Se o paciente portador de DM2 quiser participar, inicialmente ele responderá um questionário sobre sua doença e logo em seguida, serão colhidos 10 ml de sangue da veia do antebraço, para separação do DNA

(análise genética).

ETAPA 2 – SOMENTE ALGUNS PACIENTES QUE PASSARAM PELA ETAPA 1, SERÃO CONVIDADOS A PARTICIPAR DAS ETAPAS SEGUINTE DO ESTUDO -

Procedimentos seguintes :

2.1 - Exame físico, medidas de altura, peso, circunferência da cintura, pressão arterial.

2.2 - **Teste de Tolerância à Dieta de 500 cal**, que consiste no seguinte: O Sr (a) chegará à sala de testes do ambulatório de Endocrinologia, às 7 hs da manhã, em jejum de 12 hs, será acomodado(a) em cadeira confortável, com regulador de inclinação, estofada, onde será feito o teste. A sala de testes conta com ar condicionado, TV e várias auxiliares de enfermagem para atendê-lo(a). A veia do antebraço à altura do cotovelo será puncionada com cânula fina, sendo colhidos 5 ml de sangue para dosagens de alguns hormônios e glicose. A seguir o Sr(a) receberá uma refeição de 500 cal (café, leite, pão, manteiga, queijo branco, fruta, suco de frutas), que deverá ser ingerida em até 15 minutos. O Sr(a) permanecerá deitado ou recostado

descansando, pode ler ou ouvir música ou assistir TV. As amostras de sangue (em torno de 3 ml cada) serão colhidas nos tempos: 30, 60, 90, 120, 150, 180, 240, 300 minutos, para dosagens bioquímicas e hormonais. O teste da dieta é utilizado pois é a forma mais natural de se verificar a resposta da célula produtora de insulina ao estímulo do alimento.

2.3 - Tratamento com Exenatide - No dia seguinte ao teste, o Sr(a) iniciará o tratamento com a medicação, cujo nome é Exenatida (nome comercial BYETTA , produzida nos Estados Unidos pelo Laboratório Lilly), que é injetável via sub cutâneo , com agulha muito fina, a mesma utilizada para aplicação de insulina. A aplicação se dará uma hora antes do almoço e do jantar durante 60 dias seguidos. Durante o tratamento o Sr(a), será visto pela médica Dra Mari Cassol Ferreira de 15 em 15 dias , no ambulatório de Diabetes. O medicamento Exenatida, nome comercial BYETTA , apresenta-se nas posologias de 5mcg e 10 mcg por dose, a dose do primeiro mês é 5mcg e a do segundo é 10 mcg. O medicamento será fornecido pela Dra Mari Cassol que acompanhará seu tratamento.

Para seu esclarecimento, a Exenatida é vendida atualmente em farmácias de grandes redes, como Drogaria São Paulo, Droga Raia, Drogasil, e ARP MED e SAR que são importadoras. Foi aprovado pela ANVISA aqui no Brasil sob registro: MS - 1.1260.0182 e, desde 2007 é regularmente prescrito por médicos no mundo todo e no Brasil, não sendo entretanto conhecido pela grande maioria dos pacientes diabéticos devido ao seu alto custo, que dificulta sua prescrição, atualmente o tratamento para um mês custa em torno de R\$ 400,00 (quatrocentos reais) e, a maioria dos pacientes não pode arcar com essa despesa.

Trata-se de uma inovação no tratamento do DM2, pois ajuda a emagrecer e proteger as células do pâncreas que fabricam a insulina e, que com o transcorrer do Diabetes vão normalmente morrendo, fazendo com que após vários anos da doença o paciente necessite tomar insulina.

Sintomas que **podem ou não ocorrer** durante o tratamento com a EXENATIDA : diminuição do apetite e às vezes um pouco de enjôo e sensação de empachamento gástrico (estar satisfeito após comer). Não há perigo de queda de açúcar (hipoglicemias) pois se a glicemia estiver baixa ele não atua (secretagogo glicose-dependente). Os pacientes que são mais alérgicos á medicamentos podem apresentar vermelhidão no local da injeção.

3 - Benefícios para o participante – Aos participantes da primeira fase serão entregues os resultados dos exames laboratoriais realizados. E os participantes da segunda fase terão acesso a uma avaliação laboratorial ampla, bem como o potencial benefício direto no controle do DM2 e redução do peso com o uso da medicação, e a conseqüente redução das complicações do DM2.

4 – Relação de procedimentos alternativos que possam ser vantajosos, pelos quais o paciente pode optar-

Não existem procedimentos alternativos neste estudo

5 – Garantia de acesso- Em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. Os principais investigadores são

Dra Rosa Ferreira dos Santos que pode ser encontrada no endereço : **Av Dr Arnaldo, 455 - 3º andar- sala 3324 – fones- 3061 7259 e 7258 . Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar – tel: 3069-6442 ramais 16, 17, 18 ou 20, FAX: 3069-6442 ramal 26 – E-mail: cappesq@hcnet.usp.br**

6 – É garantida a liberdade da retirada do consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na instituição;

7 – Direito de confidencialidade – As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgado a identificação de nenhum paciente;

8 – Direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais das pesquisas, quando em estudos abertos, ou de resultados que sejam do conhecimento dos pesquisadores;

9 – Despesas e compensações: não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa

10- Compromisso do pesquisador de utilizar os dados e o material coletado somente para esta pesquisa. Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo: **“Avaliação da resposta ao uso do análogo do GLP-1 em função dos SNPs rs12255372 (G/T) e rs7903146 (C/T) do gene TCF7L2 em pacientes com diabetes melito tipo 2”**. Eu discuti com a Dra. Rosa Ferreira Santos, sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que

minha participação é isenta de despesas. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

Assinatura do paciente/representante legal   Data ____ / ____ / ____

Assinatura da testemunha   Data ____ / ____ / ____

Para casos de analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.

Somente para o responsável do projeto-

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

Assinatura do responsável pelo estudo   Data ____ / ____ / ____

9 REFERÊNCIAS

---

1. Grant SF, Thorleifsson G, Reynisdottir I, Benediktsson R, Manolescu A, Sainz J, Helgason A, Stefansson H, Emilsson V, Helgadóttir A, Styrkarsdóttir U, Magnusson KP, Walters GB, Palsdóttir E, Jonsdóttir T, Gudmundsdóttir T, Gylfason A, Saemundsdóttir J, Wilensky RL, Reilly MP, Rader DJ, Bagger Y, Christiansen C, Gudnason V, Sigurdsson G, Thorsteinsdóttir U, Gulcher JR, Kong A, Stefansson K. Variant of transcription factor 7-like 2 (*TCF7L2*) gene confers risk of type 2 diabetes. Variant of transcription factor 7-like 2 (*TCF7L2*) gene confers risk of type 2 diabetes. *Nat Genet.* 2006; 38:380-323.
2. Reynisdottir I, Thorleifsson G, Benediktsson R, Struan F. A. Grant, Stefansson K, Gulcher JR. Localization of a susceptibility gene for type 2 diabetes to chromosome 5q34-q35.2. *Am J Hum Genet.* 2003; 73:323–335.
3. Florez JC, Jablonski KA, Bayley N, Pollin TI, de Bakker PI, Shuldiner AR, Knowler WC, Nathan DM, Altshuler D; Diabetes Prevention Program Research Gr. 2006. *TCF7L2* polymorphisms and progression to diabetes in the Diabetes Prevention Program. *N Engl J Med.* 2006;355(3):241-50.
4. Cauchi S, El Achhab Y, Choquet H, Dina C, Krempler F, Weitgasser R, Nejari C, Patsch W, Chikri M, Meyre D, Froguel P. *TCF7L2* is reproducibly associated with type 2 diabetes in various ethnic groups: a global meta-analysis. *J Mol Med.* 2007; 85:777–782.
5. Kimber CH, Doney AS, Pearson ER, McCarthy MI, Hattersley AT, Leese GP, et al. *TCF7L2* in the Go-DARTS study: evidence for a gene dose effect on both diabetes susceptibility and control of glucose levels. *Diabetologia.* 2007;50(6):1186-1191.

6. Sladek R, Rocheleau G, Rung J, Dina C, Shen L, Serre D, Boutin P, Vincent D, Belisle A, Hadjadj S, Balkau B, Heude B, Charpentier G, Hudson TJ, Montpetit A, Pshezhetsky AV, Prentki M, Posner BI, Balding DJ, Meyre D, Polychronakos C, Froguel P. A genome-wide association study identifies novel risk loci for type 2 diabetes. *Nature*. 2007;445(7130):881.
7. Turner RC, Holman RR, Matthews D, Hockaday TD, Peto J. Insulin deficiency and insulin resistance interaction in diabetes: estimation of their relative contribution by feedback analysis from basal plasma insulin and glucose concentrations. *Metabolism*. 1979; 28:1086-96.
8. Shu L, Sauter NS, Schulthess FT, Matveyenko AV, Oberholzer J, Maedler K. *TCF7L2* regulates – cell survival and function in human pancreatic islets. *Diabetes*. 2008; 57(3):645-53.
9. Zeggini E, McCarthy MI. *TCF7L2*: the biggest story in diabetes genetics since HLA? *Diabetologia*. 2007; 50 (1):1-4.
10. Chandak GR, Janipalli CS, Bhaskar S, Kulkarni SR, Mohankrishna P, Hattersley AT, Frayling TM, Yajnik CS. Common variants in the *TCF7L2* gene are strongly associated with type 2 diabetes mellitus in the Indian population. *Diabetologia*. 2007; 50(1):63-67.
11. Horikoshi M, Hara K, Ito C, Nagai R, Froguel P, Kadowaki T. A genetic variation of the transcription factor 7-like 2 gene is associated with risk of type 2 diabetes in the Japanese population. *Diabetologia*. 2007; 50(4):747-751.
12. Lehman DM, Hunt KJ, Leach RJ, Hamlington J, Arya R, Abboud HE, Duggirala R, Blangero J, Göring HH, Stern MP. Haplotypes of transcription factor 7-like 2 (*TCF7L2*) gene and its upstream region are associated with type 2 diabetes and age of onset in Mexican Americans. *Diabetes*. 2007; 56(2):389-393.

13. Helgason A, Pálsson S, Thorleifsson G, Grant SF, Emilsson V, Gunnarsdottir S, Adeyemo A, Chen Y, Chen G, Reynisdottir I, Benediktsson R, Hinney A, Hansen T, Andersen G, Borch-Johnsen K, Jorgensen T, Schäfer H, Faruque M, Doumatey A, Zhou J, Wilensky RL, Reilly MP, Rader DJ, Bagger Y, Christiansen C, Sigurdsson G, Hebebrand J, Pedersen O, Thorsteinsdottir U, Gulcher JR, Kong A, Rotimi C, Stefánsson K. Refining the impact of *TCF7L2* gene variants on type 2 diabetes and adaptive evolution. *Nat Genet.* 2007; 39(2):218-225.
14. Hattersley AT. Prime suspect: the *TCF7L2* gene and type 2 diabetes risk. *J.Clin.Invest.* 2007; 117:2077-2079.
15. Lyssenko V, Lupi R, Marchetti P, Del Guerra S, Orho-Melander M, Almgren P, Sjögren M, Ling C, Eriksson KF, Lethagen L, Mancarella R, Berglund G, Tuomi T, Nilsson P, Del Prato S, Groop L. Mechanisms by which common variants in the *TCF7L2* gene increase risk ou type 2 diabetes. *J Clin Invest.* 2007; 117(8):2155-2163.
16. Schäfer SA, Tschritter O, Machicao F, Thamer C, Stefan N, Gallwitz B, Holst JJ, Dekker JM, 't Hart LM, Nijpels G, van Haeften TW, Häring HU, Fritsche A. Impaired glucagons-like peptide-1-induced insulin secretion in carriers of transcription factor 7-like 2 (*TCF7L2*) gene polymorphisms. *Diabetologia.* 2007; 50(12):2443-2450.
17. Kieffer TJ, McIntosh CH, Pederson RA. Degradation of glucose-dependent insulintropic polypeptide and truncated glucagon-like peptide 1 in vitro and in vivo by dipeptidyl peptidase IV. *Endocrinology.* 1995; 136(8):3585–3596.
18. Florez JC. Newly identified highlight beta cell dysfunction as a key cause of type 2 diabetes: Where are the insulin resistance genes. *Diabetologia.* 2008; 51(7):1100-10.

19. Cauchi S, Choquet H, Gutiérrez-Aguilar R, Capel F, Grau K, Proença C, Dina C, Duval A, Balkau B, Marre M, Potoczna N, Langin D, Horber F, Sørensen TI, Charpentier G, Meyre D, Froguel P. Effects of *TCF7L2* polymorphisms on obesity in european populations. *Obesity*. 2008; 16(2):476-482.
20. Combettes MM. GLP-1 and type 2 diabetes: physiology and new clinical advances. *Current Opinion in Pharmacology*. 2006; 6(6):598–605.
21. Yi F, Brubaker PL, Jin T. TCF-4 mediates cell Type-specific regulation of proglucagon gene expression by b-catenin and glycogen syntetase kinase-3b. *J Biol Chem*. 2005; 280(2):1457-1464.
22. Dahlgren A, Zethelius B, Jensevik K, Syvänen AC, Berne C. Variants of the *TCF7L2* gene are associated with beta cell dysfunction and confer an increased risk of type 2 diabetes mellitus in the ULSAM cohort of Swedish elderly men. *Diabetologia*. 2007; 50(9):1852-7.
23. DeFronzo RA. Pathogenesis of type 2 (non-insulin dependent) diabetes mellitus: a balanced overview. *Diabetologia*. 1992; 35(4):389-397.
24. Anna L. Gloyn, Matthias Braun, and Patrik Rorsman. Type 2 Diabetes Susceptibility Gene *TCF7L2* and Its Role in Beta Cell Function. *Diabetes*. 2009; 58: 800-802
25. Maiese K, Li F, Chong ZZ, Shang YC. The Wnt signaling pathway: aging gracefully as a protectionist? *Pharmacology e Therapeutics*. 2004; 118(1):58-81.
26. Meugnier E, Rome S, Vidal H. Regulation of gene expression by glucose. *Curr Opin Nutr Metab Care*. 2007; 10 (4):518-522.

-
27. Strawbridge RJ, Dupuis J, Prokopenko I, Barker A, Ahlqvist E, Rybin D, Petrie JR, Travers ME, Bouatia-Naji N, Dimas AS, Nica A, Wheeler E, Chen H, Taneera J, Kanoni S, Peden JF, Turrini F, Gustafsson S, Zabena C, Almgren P, Barker DJ, Barnes D, Dennison EM, Eriksson JG, Eriksson P, Eury E, Folkersen L, Fox CS, Frayling TM, Goel A, Gu HF, Isomaa B, Jackson AU, Kerr-Conte J, Loos RJ, Luan J, Makrilakis K, Manning AK, Chambers J, Parish S, Danesh J, Kooner J, Ostenson CG, Lind L, Cooper CC, Franzosi MG, Seedorf U, Watkins H, Froguel P, Johnson P, Deloukas P, Collins FS, Laakso M, Dermitzakis ET, Boehnke M, McCarthy MI, Wareham NJ, Groop L, Pattou F, Gloyn AL, Dedoussis GV, Lyssenko V, Meigs JB, Barroso I, Watanabe M, Ingelsson E, Langenberg C, Hamsten A, Florez JC. Genome-wide association identifies nine common variants associated with fasting proinsulin levels and provides new insights into the pathophysiology of type 2 diabetes. *Diabetes*. 2011; 60(10):2624-34.
28. Fehmann HC, Göke R, Göke B. Cell and molecular biology of the incretin hormones glucagon-like peptide-I and glucose-dependent insulin releasing polypeptide. *Endocrine Reviews*. 1995; 16:390-410.
29. Eng J, Kleinman WA, Singh L, Singh G, Raufman JP. Isolation and characterization of exendin-4, an exendin-3 analogue, from *Heloderma suspectum* venom. Further evidence for an exendin receptor on dispersed acini from guinea pig pancreas. *J Biol Chem*. 1992; 267(11):7402–7405.
30. Ionut V, Zheng D, Stefanovski D, Bergman RN. Exenatide can reduce glucose independent of islet hormones or gastric emptying. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2008; 295:269-277.
31. Dardevet D, Moore MC, Neal D, DiCostanzo CA, Snead W, Cherrington AD. Insulin-independent effects of glucagon-like peptide 1 (GLP1) on canine liver glucose metabolism: duration of infusion and involvement of hepatoportal region. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2004; 287:75-81.

32. Nauck MA, Vardarli I, Deacon CF, Holst JJ, Meier JJ. Secretion of glucagon-like peptide-1 (GLP-1) in type 2 diabetes: what is up, what is down? *Diabetologia*. 2011; 54(1):10–18.
33. Anini Y, Brubaker PL. Muscarinic receptors control glucagon-like peptide 1 secretion by human endocrine L cells. *Endocrinology*. 2003; 144(7):3244–3250.
34. Roberge JN, Brubaker PL. Regulation of intestinal proglucagon-derived peptide secretion by glucose-dependent insulinotropic peptide in a novel enteroendocrine loop. *Endocrinology*. 1993; 133(1):233–240.
35. Drucker DJ, Nauck MA. The incretin system: glucagon-like peptide-1 agonists and dipeptidyl peptidase-4 inhibitors in type 2 diabetes. *Lancet*. 2006; 368:1696-1705.
36. Wegner L, Hussain MS, Pilgaard K, Hansen T, Pedersen O, Vaag A, Poulsen P. Impact of *TCF7L2* rs7903146 on Insulin Secretion and Action in Young and Elderly Danish Twins. *J Clin Endocrinol Metab*. 2008; 93(10): 4013– 4019.
37. Knauf C, Cani PD, Perrin C, Iglesias MA, Maury JF, Bernard E, Benhamed F, Grémeaux T, Drucker DJ, Kahn CR, Girard J, Tanti JF, Delzenne NM, Postic C, Burcelin R. Brain glucagon-like peptide-1 increases insulin secretion and muscle insulin resistance to favor hepatic glycogen storage. *J Clin Invest*. 2005; 115(12):3554 –3563.
38. Damcott CM, Pollin TI, Reinhart LJ, Ott SH, Shen H, Silver KD, Mitchell BD, Shuldiner AR. Polymorphisms in the Transcription Factor 7-Like 2 (*TCF7L2*) Gene Are Associated With Type 2 Diabetes in the Amish. *Diabetes*. 2006; 55(9):2654-2659.

-
39. Yu Tong, Ying Lin, Yuan Zhang, Jiyun Yang, Yawei Zhang, Hengchuan Liu5 and Ben Zhang. Association between *TCF7L2* gene polymorphisms and susceptibility to Type 2 Diabetes Mellitus: a large Human Genome Epidemiology (HuGE) review and meta-analysis. *BMC Medical Genetics* 2009; 10: 15
  40. Li L, El-Kholy W, Rhodes CJ, Brubaker PL. Glucagon-like peptide-1 protects beta cells from cytokine-induced apoptosis and necrosis: role of protein kinase B. *Diabetologia*. 2005; 48(7):1339-1349.
  41. Lee SH, Demeterco C, Geron I, Abrahamsson A, Levine F, Itkin-Ansari P. Islet specific Wnt activation in human type II diabetes. *Experimental Diabetes Research*. 2008; 1-13.
  42. Heller RS, Dichmann DS, Jensen J, Miller C, Wong G, Madsen OD, Serup P. Expression patterns of Wnts, Frizzleds, sFRPs, and misexpression in transgenic mice suggesting a role for Wnts in pâncreas and foregut pattern formation. *Developmental Dynamics*. 2002; 225(3):260–270.
  43. Rulifson IC, Karnik SK, Heiser PW, ten Berge D, Chen H, Gu X, Taketo MM, Nusse R, Hebrok M, Kim SK. Wnt signaling regulates pancreatic beta cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2007; 104(15):6247–6252.
  44. Shu L, Matveyenko AV, Kerr-Conte J, Cho JH, McIntosh CH, Maedler K. Decreased *TCF7L2* protein levels in type 2 diabetes mellitus correlate with down regulation of GIP- and GLP-1 receptors and impaired beta-cell function. *Human Molecular Genetics*. 2009; 18(13):2388-2399.
  45. Savic D, Ye H, Aneas I, Park SY, Bell GI, Nobrega MA. Alterations in *TCF7L2* expression define its role as a key regulator of glucose metabolism. *Genome Research*. 2011; 21(9):1417-1425.

46. Zheng D, Ionut V, Mooradian V, Stefanovski D, Bergman RN. Exenatide sensitizes insulin-mediated whole-body glucose disposal and promotes uptake of exogenous glucose by the liver. *Diabetes*. 2009 Feb;58:352-361..
47. Young AA. Glucagon-like peptide-1, exendin and insulin sensitivity. Insulin resistance and insulin resistance syndrome. Taylor and Francis Hansen B, Shafir E. 2002; Chapter 14:235-262.
48. Prigeon RL, Quddusi S, Paty B, D'Alessio DA. Suppression of glucose production by GLP-1 independent of islet hormones: a novel extrapancreatic effect. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2003; 285:701–707.
49. Gupta NA, Mells J, Dunham RM, Grakoui A, Handy J, Saxena NK, Anania FA. Glucagon-like Peptide-1 Receptor (GLP-1R) is present on human hepatocytes and has a direct role in decreasing hepatic steatosis in vitro by modulating elements of the insulin signaling pathway. *Hepatology*. 2010; 51(5):1584–1592.
50. Sandoval D . CNS GLP-1 Regulation of Peripheral Glucose Homeostasis. *Physiol Behav*. 2008; 94(5):670–674.
51. Gedulin BR, Nikoulina SE, Smith PA, Gedulin G, Nielsen LL, Baron AD, Parkes DG, Young AA. Exenatide (exendin-4) improves insulin sensitivity and beta-cell mass in insulin-resistant obese fa/fa Zucker rats independent of glycemia and body weight. *Endocrinology*. 2005; 146(4):2069-2076.
52. Malone J, Trautmann M, Wilhelm K, Taylor K, Kendall DM. Exenatide once weekly for the treatment of type 2 diabetes. *Expert Opin Investig Drugs*. 2009; 18(3):359-367.
53. Moon RT, Kohn AD, De Ferrari GV, Kaykas A. WNT and beta-catenin signalling: diseases and therapies. *Nat Rev Genet*. 2004; 5(9):691-701.

-
54. Zander M, Madsbad S, Madsen JL, Holst JJ. Effect of 6-week course of glucagon-like peptide 1 on glycaemic control, insulin sensitivity, and β -cell function in type 2 diabetes: a parallel-group study. *Lancet*. 2002; 359:824-830.
55. Baggio LL, Drucker DJ. Biology of incretins: GLP-1 and GIP. *Gastroenterology*. 2007; 132(6):2131–2157.
56. Meneilly GS, McIntosh CH, Pederson RA, Habener JF, Gingerich R, Egan JM, Finegood DT, Elahi D. Effect of glucagon-like peptide 1 on non-insulin-mediated glucose uptake in the elderly patient with diabetes. *Diabetes Care*. 2001; 24(11):1951-6.
57. Villareal DT, Robertson H, Bell GI, Patterson BW, Tran H, Wice B, Polonsky KS. *TCF7L2* Variant rs7903146 Affects the Risk of Type 2 Diabetes by Modulating Incretin Action. *Diabetes*. 2010; 59(2):479–485.
58. Kawamori D, Kurpad AJ, Hu J, Liew CW, Shih JL, Ford EL, Herrera PL, Polonsky KS, McGuinness OP, Kulkarni RN. Insulin signaling in α -cells modulates glucagon secretion in vivo. *Cell Metab*. 2009; 9(4):350–361.
59. Parlevliet ET, de Leeuw van Weenen JE, Romijn JA, Pijl H. GLP-1 treatment reduces endogenous insulin resistance via activation of central GLP-1 receptors in mice fed a high-fat diet. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2010; 299(2):318–324.
60. Pfützner A, Kunt T, Hohberg C, Mondok A, Pehler S, Konrad T, Lübken G, Forst T. Fasting Intact Proinsulin Is a Highly Specific Predictor of Insulin Resistance in Type 2 Diabetes. *Diabetes Care*. 2004; 27(3):682–687.
61. Ahren B. insulintropic polypeptide secretion in response to nutrient: Incretins and islet function. *Cur Mol Med*. 2006; 13:154-161

-
62. Reya T, Clevers H. Wnt signalling in stem cells and cancer. *Nature*. 2005; 434:843–850.
63. Trayhurn P, Wood IS. Signalling role of adipose tissue: adipokines and inflammation in obesity. *Biochem Soc Trans*. 2005; 33(5):1078 –1081
64. Staiger H, Machicao F, Fritsche A, Haring HU. Pathomechanisms of type 2 diabetes genes. *Endocr Rev*. 2009; 30(6):557-85.
65. Owen KR, McCarthy MI. Genetics of type 2 Diabetes. *Current Opinion in Genetics & Development*. 2007;17:239–244.
66. Gloyn AL, Weedon MN, Owen KR, Turner MJ, Knight BA, Hitman G, Walker M, Levy JC, Sampson M, Halford S, McCarthy MI, Hattersley AT, Frayling TM. Large-scale association studies of variants in genes encoding the pancreatic beta-cell KATP channel subunits Kir6.2 (KCNJ11) and SUR1 (ABCC8) confirm that the KCNJ11 E23K variant is associated with type 2 diabetes. *Diabetes*. 2003; 52:568-572.
67. Altshuler D, Hirschhorn JN, Klannemark M, Lindgren CM, Vohl MC, Nemesh J, Lane CR, Schaffner SF, Bolk S, Brewer C, Tuomi T, Gaudet D, Hudson TJ, Daly M, Groop L, Lander ES. The common PPAR γ Pro12Ala polymorphism is associated with decreased risk of type 2 diabetes. *Nat Genet*. 2000; 26(1):76-80.
68. Grant SFA. Understanding the Elusive Mechanism of Action of *TCF7L2* in Metabolism. *Diabetes*. 2012; 61(11):2657-2658.
69. Williams DL. Minireview: Finding the Sweet Spot: Peripheral Versus Central Glucagon-Like Peptide 1 Action in Feeding and Glucose Homeostasis. *Endocrinology*. 2009; 150(7):2997–3001.

-
70. Shigeto M, Katsura M, Matsuda M, Ohkuma S, Kaku K. Low, but physiological, concentration of GLP-1 stimulates insulin secretion independent of the cAMP-dependent protein kinase pathway. *J Pharmacol Sci.* 2008;108(3):274–279.
71. Vahl TP, Tauchi M, Durler TS, Elfers EE, Fernandes TM, Bitner RD, Ellis KS, Woods SC, Seeley RJ, Herman JP, D'Alessio DA. Glucagon-like peptide-1 (GLP-1) receptors expressed on nerve terminals in the portal vein mediate the effects of endogenous GLP-1 on glucose tolerance in rats. *Endocrinology.* 2007; 148(10):4965–4973.
72. Knauf C, Cani PD, Kim DH, Iglesias MA, Chabo C, Waget A, Colom A, Rastrelli S, Delzenne NM, Drucker DJ, Seeley RJ, Burcelin R. Role of central nervous system glucagon-like peptide-1 receptors in enteric glucose sensing. *Diabetes.* 2008; 57(10):2603–2612.
73. Shao W, Wang D, Chiang YT, Ip W, Zhu L, Xu F, Columbus J, Belsham DD, Irwin DM, Zhang H, Wen X, Wang Q, Jin T. The Wnt signaling pathway effector *TCF7L2* controls gut and brain proglucagon gene expression and glucose homeostasis. *Diabetes.* 2013; 62(3):789–800.
74. Nobrega MA. *TCF7L2* and Glucose Metabolism: Time to Look Beyond the Pancreas. *Diabetes.* 2013; 62(3):706-708.
75. Oh KJ, Park J, Kim SS, Oh H, Choi CS, Koo SH. *TCF7L2* Modulates Glucose Homeostasis by Regulating CREB- and FoxO1-Dependent Transcriptional Pathway in the Liver. *Plos Genetics.* 2012; 8(9).
76. Schinner S, Willenberg HS, Schott M, Scherbaum WA. Pathophysiological Aspects of Wnt-Signalling in Endocrine Disease. *Eur J Endocrinol.* 2009;160(5):731–737.

-
77. Liu Z, Habener JF. Glucagon-like peptide-1 activation of *TCF7L2*-dependent Wnt signaling enhances pancreatic beta cell proliferation. *J Biol Chem*. 2008; 283(13):8723-8735.
78. González N, Sancho V, Martín-Duce A, Tornero-Esteban P, Valverde I, Malaisse WJ, Villanueva-Peñacarrillo ML. GLP-1 signalling and effects on glucose metabolism in myocytes from type 2 diabetic patients. *Int J Mol Med*. 2005 ;16(4):747-52.
79. Arnés L, Moreno P, Nuche-Berenguer B, Valverde I, Villanueva-Peñacarrillo ML.; Effect of exendin-4 treatment upon glucose uptake parameters in rat liver and muscle, in normal and type 2 diabetic state. *Regulatory Peptides*. 2009;153: 88–92.
80. Xavier GS , Mondragon A, Sun LG, McGinty JA, French PM, Rutter GA. Abnormal glucose tolerance and insulin secretion in pancreas-specific *TCF7L2*-null mice. *Diabetologia*. 2012; 55:2667–2676.
81. Moreno P, Nuche-Berenguer B, Gutierrez-Rojas I, Acitores A, Sancho V, Valverde I, González N, Villanueva-Peñacarrillo ML. Normalizing action of exendin-4 and GLP-1 in the glucose metabolism of extrapancreatic tissues in insulin-resistant and type 2 diabetic states. *Journal of Molecular Endocrinology*. 2012; 48: 37–47.
82. Varanasi A, Chaudhuri A, Dhindsa S, Arora A, Lohano T, Vora MR, Dandona P. Durability of effects of exenatide treatment on glycemic control, body weight, systolic blood pressure, C-reactive protein and triglyceride concentrations. *Endocr Pract*. 2010; 17:192–200.
83. Chaudhuri A, Ghanim H, Vora M, Sia CL, Korzeniewski K, Dhindsa S, Makdissi A, and Dandona P. Exenatide exerts a potent antiinflammatory effect. *J Clin Endocrinol Metab*. 2012;97:

-
84. Saxena R, Gianniny L, Burt NP, Lyssenko V, Giuducci C, Sjogren M. Common single nucleotide polymorphisms in *TCF7L2* are reproducibly associated with type 2 diabetes and reduce the insulin response to glucose in nondiabetic individuals. *Diabetes*. 2006; 55: 2890-2895.

  85. Smushkin G, Sathananthan M, Dalla Man C, Micheletto F, Zinsmeister AR, Cobelli C, Vella A. Diabetes-associated common genetic variation and its association with GLP-1 concentrations and response to exogenous GLP-1. *Diabetes*, 2012; 61:1082 -1089.

  86. Marquezine GF, Pereira AC, Sousa AGP, Mill JG, Hueb WA, Krieger JE. *TCF7L2* variant genotypes and type 2 diabetes risk in Brazil: significant association, but not a significant tool for risk stratification in the general population. *BMC Medical Genetics*, 2008; 9:106