

UNIVERSIDADE NOVE DE JULHO

UNINOVE

Mestrado em Medicina

José Antônio Januário Neves

**As Concentrações Plasmáticas Da Proteína FAM3D
Estão Mais Elevadas Em Portadores De Diabetes
Mellitus De Tipo 2 Tratados Com Sulfoniluréia.**

São Paulo, 2015

UNIVERSIDADE NOVE DE JULHO

UNINOVE

Mestrado em Medicina

José Antônio Januário Neves

**As Concentrações Plasmáticas Da Proteína FAM3D
Estão Mais Elevadas Em Portadores De Diabetes
Mellitus De Tipo 2 Tratados Com Sulfoniluréia.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Medicina da Universidade Nove de Julho – UNINOVE, como requisito para obtenção do título de Mestre em Medicina.

Orientador: Prof. Dr. Daniel Giannella Neto.

São Paulo, 2015

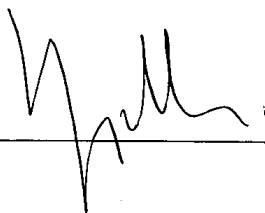
São Paulo, 24 de setembro de 2015.

TERMO DE APROVAÇÃO

Aluno: José Antônio Januário Neves

Título da Dissertação: **“Determinação quantitativa da proteína FAM3D plasmática de indivíduos portadores de diabetes mellitus de tipo 2”**

Presidente: Prof. Dr. Daniel Giannella Neto



Membro: Profa. Dra. Maria Lucia C.C. Giannella



Membro: Prof. Dr. Cléber Pinto Camacho



Dedicatória

Ao meu maior incentivador, Oziel Mendes de Paiva Júnior, pelo companheirismo e dedicação para que eu tivesse condições de desenvolver este trabalho.

Agradecimentos

- ✓ Ao meu orientador, Prof. Dr. Daniel Giannella Neto, Livre Docente, que me apresentou e incentivou a pesquisa em um campo do conhecimento novo para mim.
- ✓ Ao Prof. Dr. Cléber Pinto Camacho, chefe do ambulatório de Endocrinologia, onde fui recebido com um trabalho de excelência e me entusiasmei com o seu prazer em ensinar, tanto os alunos da graduação quanto os alunos da pós-graduação.
- ✓ Ao Prof. Dr. José Antônio Silva Júnior, por mostrar que a docência deve ser um campo de aprendizado constante e prazeroso.
- ✓ À minha amiga de curso, MSc. Regiane Feliciano, Bióloga, Especialista em Biologia Molecular e Bioinformática e Doutoranda em Biofotônica, pela realização das análises das amostras para a determinação quantitativa do FAM3D e pelo conhecimento que nos transmite incondicionalmente. É um prazer estar ao seu lado.
- ✓ Ao Farmacêutico e Bioquímico José Eustáquio Ambrósio da Costa, graduado pela Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP) e Ana Carolina Nascentes Lage Werner, Biomédica, especialista em Análises Clínicas pela Escola Superior de Ciências da Santa Casa de Misericórdia de Vitória (EMESCAM), por todo o trabalho de coleta, análise, armazenamento e logística de transporte das amostras colhidas na cidade de Manhuaçu, MG. Sem vocês parte deste trabalho não teria como ter sido realizado em outra cidade fora de São Paulo.
- ✓ Aos amigos de curso, principalmente a toda a equipe do Anexo C, onde muitas ideias foram formadas em clima de família. Meu carinho aos novos Mestres: Adilson, Adriano, Fábio, Gaby, Lucas, Mozânia, Otávio e Regiane.

- ✓ À Universidade Nove de Julho (UNINOVE), representada pelo seu Corpo Docente de excelência e Funcionários eficientes e atenciosos, por nos oferecer um curso de alta qualidade.
- ✓ À minha família e amigos, que souberam entender a minha ausência e continuar sendo meu suporte de amor e carinho.
- ✓ Aos amigos de trabalho da Fundação Espírita Rodolfo Henriques, que entenderam a minha ausência parcial. Uma verdadeira família espiritual.
- ✓ Aos pacientes, por doar e contribuir com a produção de conhecimento em prol de futuros pacientes.
- ✓ A Deus, “inteligência suprema, causa primária de todas as coisas”.

“Existem muitas hipóteses em ciência que estão erradas. Isso é perfeitamente aceitável, elas são a abertura para achar as que estão certas.”

Carl Sagan.

Sumário

Dedicatória	ii
Agradecimentos.....	iv
LISTA DE SIGLAS	ix
LISTA DE FIGURAS	x
LISTA DE QUADRO.....	xi
LISTA DE TABELA.....	xi
LISTA DE APÊNDICES.....	xii
LISTA DE ANEXOS	xiii
RESUMO.....	xiv
SUMMARY	xvi
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Diabetes Mellitus tipo 2	2
1.2. Pré-Diabetes Mellitus tipo 2 (PDM2)	4
1.3. Citocinas.....	5
1.4. FAM3D	8
2. OBJETIVO.....	12
3. CASUÍSTICA E MÉTODO.....	13
3.1. Casuística.....	13
3.2. Critérios de inclusão.....	13
3.3. Critérios de exclusão.....	13
3.4. Método.....	13
3.5. Análise do FAM3D em amostras de plasma humano.....	14
3.5.1. Coleta de material biológico - Plasma humano.....	14
3.5.2. ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)	15
3.6. Análise estatística.....	16
4. RESULTADOS	17
5. DISCUSSÃO	22
6. CONCLUSÕES	24
7. CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	25
8. BIBLIOGRAFIA.....	26
9. APÊNDICE	28
10. ANEXOS.....	33

LISTA DE SÍMBOLOS

μg	Micrograma
μL	Microlitro
μM	Micromolar
\pm	Mais ou menos
$<$	Menor
$=$	Igual a
$>$	Maior
$^{\circ}\text{C}$	Graus Celsius
cm	Centímetro
dL	Decilitro
H	Hora
kg	Quilograma
kg/m^2	Quilograma por metro quadrado
L	Litro
M	Metro
mm	Milímetro
Mmol	Milimol
M	Molar
mg	Miligramma
mL	Mililitro
mM	Milimolar
ng	Nanograma
rpm	Rotações por minuto
S	Segundo (s)
μU	Micro-unidade
U	Unidade
HbA1c	Hemoglobina glicada

LISTA DE SIGLAS

DM	Diabetes mellitus
DM2	Diabetes mellitus de tipo 2
PDM2	Pré - Diabetes mellitus de tipo 2
HOMA-IR	<i>Homeostatic Model Assessment</i> – Insulin Resistance
FAM3	Family with Sequence Similarity 3
FAM3D	Family with Sequence Similarity 3D
CA 19-9	Antígeno carboidrato 19-9
CA 15-3	Antígeno de câncer 15-3
CA 125	Antígeno de câncer 125
CEA	Antígeno Carcinoembrionário
Alfa-feto proteína	Alfa-feto proteína
β-HCG	Gonadotropina Coriônica Humana
USG	Ultrassonografia

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Classificação estrutural das Citocinas e seus receptores.....	6
Figura 2	Característica estrutural da maioria das citocinas.....	7
Figura 3	Expressão de mRNA do FAM3A, FAM3B, FAM3C, e FAM3D em múltiplos tecidos humanos por Northern blots...	8
Figura 4	Expressão normalizada do mRNA do gene FAM3D em pacientes com adenocarcinoma ductal de pâncreas de acordo com a tolerância à glicose.....	9
Figura 5	Concentrações plasmáticas do FAM3D humano 0, 2 e 4 horas após o consumo de uma dieta rica em lipídeos ou pobre em lipídeos.....	11
Figura 6	Comparação da relação da Insulina ($\mu\text{UI/mL}$) dos pacientes de acordo com o grupo.....	18
Figura 7	Comparação da relação do HOMA-IR dos pacientes de acordo com o grupo.....	19
Figura 8	Comparação da concentração do FAM3D (ng/mL) dos pacientes de acordo com o grupo.....	19
Figura 9	Comparação do Log do FAM3D (ng/mL) em relação aos pacientes com DM2 que estão em uso ou não de Sulfonilureias.....	20

LISTA DE QUADRO

Quadro I	Valores de glicose plasmática (em mg/dl) para diagnóstico de DM e seus estágios pré-clínicos.....	4
----------	---	---

LISTA DE TABELA

Tabela I	Características clínicas dos pacientes.....	17
----------	---	----

LISTA DE APÊNDICES

Apêndice I	Termo de consentimento livre e esclarecido	32
Apêndice II	Tabela mestra dos dados da pesquisa, na planilha do Excel	35

LISTA DE ANEXOS

Anexo I	Parecer consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP).	37
---------	---	----

RESUMO

Na pesquisa por novas citocinas foi descoberta uma subfamília de proteínas semelhantes às citocinas conhecidas como *Family with Sequence Similarity 3 (FAM3)*, do qual faz parte o *FAM3D*, que é predominantemente expresso no trato gastrointestinal de indivíduos saudáveis. As concentrações plasmáticas de *FAM3D* variam de acordo com o estado nutricional apresentando uma elevação pós-prandial e uma redução no período pós-absortivo tardio. Aventa-se a hipótese de que o *FAM3D* seria um inibidor da secreção insulínica, já que foi observada sua elevação expressiva em tumores de pacientes com adenocarcinoma de pâncreas associado ao Diabetes Mellitus (DM).

Nosso objetivo foi o de determinar quantitativamente a concentração plasmática do *FAM3D*, pelo método de ELISA, em grupo de indivíduos portadores de DM2 e compará-las com as de indivíduos com Pré-DM2 (PDM2) e Controle (CTRL) não portadores de DM. Foram pareados de acordo com gênero, idade e índice de massa corpórea a fim de elucidar melhor a ação do *FAM3D* bem como sua relação fisiopatológica com o DM2.

Selecionamos 90 pacientes, que, após a realização dos exames, 17 foram excluídos de acordo com os critérios de inclusão e exclusão. A distribuição entre os grupos por gênero ficou desta forma: DM2 com mais de 5 anos do diagnóstico, sem uso de Insulina e sem complicações ou outras doenças grave – 15 masculinos e 14 femininos; PDM2 – 13 masculinos e 15 femininos e grupo controle – 7 masculinos e 9 femininos, totalizando 73 pacientes.

Todos foram submetidos à mensuração das medidas antropométricas e exames bioquímicos mais o cálculo do HOMA-IR e a determinação da concentração plasmática do *FAM3D* pelo método de ELISA. Foram utilizadas as provas de Kruskal-Wallis, na comparação dos grupos de estudo, e o coeficiente de regressão ρ de Spearman foi calculado nas análises de correlação entre as concentrações plasmáticas de *FAM3D* e outras variáveis antropométricas ou bioquímicas. Os cálculos estatísticos foram realizados pelo programa JMP (SAS Campus Drive. Building T. Cary, USA). O nível de significância estatística foi fixado em $p < 0,05$.

Entres os grupos não houve diferença significativa da concentração do *FAM3D*, sendo a Mediana \pm Q para o grupo CTRL (24,92 ng/mL \pm 9,11); PDM2 (14,65 ng/mL \pm 6,02) e DM2 (19,87 ng/mL \pm 5,39).

A concentração plasmática do *FAM3D* foi mais alta nos pacientes com DM2 em uso de Sulfoniluréia ($p=0,0001$). O grupo de pacientes DM2 sob sulfoniluréia (23,42 ng/mL \pm 6,1) apresentou valores maiores em comparação ao grupo tratado com outros Antidiabéticos orais (ADOS) (14,9 ng/mL \pm 7,30), $p<0,05$.

Descritores: Diabetes mellitus; *FAM3D*; Expressão gênica.

SUMMARY

Among the new cytokine Family with Sequence Similarity 3 (FAM3), a subfamily of proteins similar to cytokines known as FAM3D was identified. FAM3D is predominantly expressed in the gastrointestinal tract of healthy individuals. Plasma concentrations of FAM3D range according to the nutritional status presenting a postprandial increase and a reduction in the later post-absorptive period. It might be speculated that FAM3D is an inhibitor of insulin secretion, as it has been observed a significant increase in patients with pancreatic adenocarcinoma associated with T2D.

Our aim was to quantitatively determine the plasma concentration of FAM3D, in a group of patients with T2D and comparing with patients with pre-Type 2 Diabetes Mellitus (pT2D) and Control (CTRL) individuals paired according to gender, age and body mass index in order to better elucidate the action of FAM3D as well as its pathophysiological role in T2D.

We selected 90 patients comprising 15 male and 14 females diagnosed with T2D; 12 male and 15 female diagnosed pT2D; and 7 male and 9 female CTRL. Seventeen patients were excluded according to the inclusion and exclusion criteria. In total, 73 patients were included.

All were submitted to measurement of anthropometric and biochemical tests, including HOMA-IR calculation and the determination of plasma concentrations of FAM3D by ELISA. The Kruskal-Wallis tests were used in the comparison of study groups, and the regression coefficient ρ of Spearman was calculated on correlation between plasma concentrations of FAM3D and other anthropometric and biochemical variables. The level of statistical significance was set at $p < 0.05$.

Among the groups there were no significant difference in the concentration of FAM3D, and the median \pm Q for the CTRL group (24.92ng/mL \pm 9.11); pT2D (14.65ng/mL \pm 6.02) and T2D (19.87ng/mL \pm 5.39).

The group of DM2 patients on sulfonylurea (23.42ng/mL \pm 6.1) had higher values compared to the group treated with other oral antidiabetic drugs (14.9 ng/mL \pm 7.30), $p < 0.05$.

There was no correlation of FAM3D between groups. Patients with T2D on sulfonylurea presented a higher concentration of FAM3D when compared with T2D patients treated with other oral antidiabetic drugs.

Descriptors: Diabetes mellitus; FAM3D; Gene expression.

1. INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas o mundo passou por uma transição demográfica, que foi mais recente nos países em desenvolvimento, como o Brasil, onde houve um envelhecimento da população trazendo, com isso, o aumento da incidência e prevalência das doenças crônico-degenerativas¹. Estes países, contudo, ainda convivem com indicadores de doenças infecto-contagiosas e agravos em níveis preocupantes, o que faz com que a necessidade com os custos com saúde pública alcance uma carga crítica.

Hoje, o Diabetes Mellitus (DM) é considerado uma das grandes epidemias mundiais, principalmente o Diabetes Mellitus tipo 2 (DM2), que representa de 85% a 95% de todos os casos de DM em países de alta renda e pode ser responsável por um percentual ainda maior em países de baixa e média renda. Estima-se, de acordo com estudos da Federação Internacional de Diabetes (IDF), que havia 381,8 milhões de pessoas com DM até o final de 2013, e uma projeção de aumento de 55% para o ano de 2035, alcançando o número de 591,9 milhões de pessoas com DM^{2;3}. A abordagem utilizada pelo IDF leva em conta apenas as mudanças na população e urbanização para o cálculo das projeções de 2035 e apresenta uma estimativa conservadora da prevalência do DM. Contudo, as rápidas mudanças culturais e sociais que ocorrem atualmente podem levar a uma prevalência ainda maior do DM nos próximos 20 anos. As principais mudanças são: o envelhecimento da população; a urbanização crescente; mudanças na dieta para uma alimentação pobre em nutrientes e fibras e de alto valor calórico; redução da atividade física; comportamentos pouco saudáveis e o aumento da obesidade^{1; 2; 4; 5}.

O Brasil ocupa o quarto lugar no *ranking* mundial dos países com o maior número de pessoas com DM, um total de 11,9 milhões de pessoas. Os três primeiros lugares são: China (98.4 milhões), Índia (65.1 milhões) e Estados Unidos da América (24.4 milhões). Na região que abrange a América do Sul e América Central, o Brasil ocupa o primeiro lugar no *ranking* dos países com o maior número de pessoas com DM, seguido pela Colômbia (2.1 milhões), Argentina (1.6 milhão), e Chile (1.3 milhão)^{2;3}.

O DM2 pode permanecer sem ser detectado por muitos anos, levando a complicações graves e aumento dos custos com a saúde. Estima-se que, no mundo, há 45,8% de todos os casos de DM em adultos, em torno de 174,8 milhões de pessoas, ainda sem diagnóstico, variando de 24,1% a 75,1% entre as regiões estudadas. Cerca de 83,8% de todos os casos de DM não diagnosticado estão em países de baixa e média renda ^{2; 3; 5; 6; 7}.

Com os avanços terapêuticos e o aumento da expectativa de vida, inclusive para os portadores de DM2, aumenta o tempo de exposição à hiperglicemia, e a glicose em níveis supra fisiológicos é tóxica (glicotoxicidade). Isso favorece o aparecimento das complicações crônicas do DM2, como o desenvolvimento irreversível de complicações micro e macrovasculares, incluindo a neuropatia, nefropatia, retinopatia, doença arterial coronariana, acidente vascular cerebral e doença vascular periférica. Com isso, há um aumento expressivo no custo do tratamento, tanto para os portadores quanto para o Estado ^{1; 2; 4; 6}.

Em 2013, segundo o IDF, cerca de 5,1 milhões de pessoas com idade entre 20 e 79 anos morreram em decorrência do DM, o que representa 8,4% do total de mortalidade no mundo por todas as causas nesta faixa etária. Quase a metade (48%) das mortes por diabetes são em pessoas com idade inferior a 60 anos ^{2; 3}.

Muitos estudos buscam identificar meios de diagnóstico precoce ou, o que seria ideal, identificar os pacientes com grande probabilidade de desenvolver DM2 antes da doença clínica, com o intuito de orientar o potencial paciente para uma mudança de hábitos e estilo de vida que evitaria, ou retardaria, o advento da doença. Há ainda a possibilidade de um tratamento muito precoce como possibilidade de se preservar o *pool* das células beta pancreáticas ^{4; 5; 6; 8}.

1.1. Diabetes Mellitus tipo 2

O DM2 é uma doença metabólica crônica, progressiva e ainda não totalmente compreendida. Não é uma doença única, mas um grupo heterogêneo

de distúrbios metabólicos em que a hiperglicemia é o ponto comum. Embora a resistência a algumas ações e a secreção inadequada da insulina sejam as anormalidades críticas para o estado metabólico no DM2, diversos outros fatores contribuem para o estado hiperglicêmico ^{3; 4; 7; 9}.

A resistência à insulina está presente alguns anos antes do diagnóstico. Após a ingestão de hidratos de carbono, a glicose é depositada principalmente no músculo esquelético e no fígado como glicogênio, e alterações na capacidade de resposta à insulina nesses órgãos resultam em hiperglicemia de jejum e pós-prandial. No entanto, a normoglicemia é mantida enquanto as células beta secretam maiores quantidades de insulina. Ao longo do tempo, as concentrações séricas de insulina caem devido à diminuição do número de células beta e a sua capacidade de secreção diminuída ^{2; 9}. Estudos longitudinais envolvendo os índios Pima, originários do estado do Arizona dos EUA, e outras populações mostraram uma redução de 50% ou mais na função das células beta no momento do diagnóstico do DM2. A supressão pós-prandial anormal da secreção de glucagon também ocorre. A falência das células beta é mediada por fatores genéticos e a exposição a níveis cronicamente elevados de glicose (glicotoxicidade) e de ácidos graxos livres (lipotoxicidade) no sangue. A idade avançada, fibrilas amilóides nas ilhotas, e taxas de secreção de insulina cronicamente altas também desempenham papéis importantes. A maioria das anomalias genéticas que foram identificadas em pacientes com DM2 está relacionada com a função das células beta ^{2; 4}.

Os critérios diagnósticos para o DM são:

QUADRO 1 – Valores de glicose plasmática (em mg/dL) e HbA1c (em %) para diagnóstico de DM e seus estágios pré-clínicos.

Categoria	Glicemia (mg/dL)			HbA1c
	Jejum*	2 horas após 75g de glicose	Casual**	
Normal	<100	<140		≤ 5,6%
Pré-Diabetes	100 a 125	140 a <200		de 5,7% a 6,4%
Diabetes Mellitus	≥126	≥200	≥200 (com sintomas clássicos)***	≥ 6,5%

*O jejum é definido como a não ingestão calórica por no mínimo 8 horas; **Glicemia plasmática casual é aquela realizada a qualquer hora do dia, sem se observar o intervalo desde a última refeição;

***Os sintomas clássicos de DM incluem poliúria, polidipsia e perda não explicada de peso.

Nota: O diagnóstico de DM deve sempre ser confirmado pela repetição do teste em outro dia, a menos que haja hiperglicemia inequívoca com descompensação metabólica aguda ou sintomas óbvios de DM (Adaptado das Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes 2014-2015) ^{3; 4}.

A *American Diabetes Association* (ADA) ⁴ também usa a Hemoglobina Glicada (HbA1c) como critério diagnóstico para o DM e para o Pré-Diabetes (PDM), com exclusão de imperfeições na padronização, como ocorre nas hemoglobinopatias, anemias hemolítica e ferropriva. Já é adotado, recentemente, pela Sociedade Brasileira de Diabetes (SBD), usando os seguintes valores de corte do Quadro 1 acima.

1.2. Pré-Diabetes Mellitus tipo 2 (PDM2)

Atualmente, esta categoria, que não é uma entidade clínica, engloba as condições que têm risco aumentado para DM e doenças cardiovasculares (DCVs), que são: “glicemia de jejum alterada” e “tolerância diminuída à glicose”, como mostradas no Quadro 1. Estas situações podem evoluir para o DM2, permanecer neste estado, ou voltar a valores normais, caso os portadores optem por mudança do estilo de vida, principalmente com a mudança para hábitos alimentares mais saudáveis e iniciem atividade física regular. O uso de medicamento nesta fase já é formalmente indicado, com vista à redução da resistência à insulina e preservação do *pool* de células beta pancreáticas ^{3; 4; 9}.

Os critérios diagnósticos usados pela ADA ⁴ e pela SBD ³ são:

a) Glicemia de jejum alterada:

Glicemia de jejum ≥ 100 mg/dL e < 126 mg/dL.

b) Tolerância à glicose diminuída:

Ocorre quando, após uma sobrecarga de 75 g de glicose, o valor da glicemia de 2 horas situa-se entre 140 e 199 mg/dL.

c) HbA1c de 5,7% a 6,4%.

1.3. Citocinas

As citocinas têm um papel importante na medicina como agentes de diagnóstico, prognóstico e terapêutico em diversas doenças. Atualmente, elas são estudadas em praticamente todas as disciplinas biológicas, devido aos efeitos mediados pelas citocinas dominarem os campos da inflamação, imunologia, aterosclerose e câncer. Exercem efeitos profundos sobre diversas funções biológicas, tais como a migração e função dos leucócitos, diferenciação hematopoiética, regulação da temperatura, as respostas da fase aguda, a remodelação dos tecidos, e sobrevivência celular ^{10; 11; 12}.

A utilização de citocinas na clínica já foi realizada com sucesso, tanto como agonistas ou para o bloqueio da produção ou ação das citocinas, atuando para regular a imunidade, nos processos inflamatórios, na hematopoese, entre outros ^{10; 13}.

Muitos estudos têm sido feitos para pesquisar novos genes de citocinas. A inferência por homologia é o método computacional mais poderoso para identificar genes relacionados. O método mais utilizado para identificar homologia, ou de um antecessor comum, é de homologia de sequência. No entanto, as sequências das citocinas frequentemente divergem de tal modo que elas não podem ser reconhecidas como homólogas. Em contraste, a estrutura secundária das citocinas é altamente conservada ao longo da evolução. Por este motivo, foi desenvolvido um algoritmo computacional de reconhecimento

ostensivo de dobras (*Ostensible Recognition of Folds* - ORF), que utiliza a estrutura secundária prevista para procurar homólogos^{10; 11}.

Receptor	Tipo-Ig	Tipo-TNFR	R Citocina tipo I	R Citocina tipo II	R quimiocina
b-trefoil	IL1a, ILB, IL18				
TNF-like (jelly roll)		TNFa, TNFb, CD40L, OX40L, TRAIL, RANKL			
Feixe de quatro hélices (cadeias longa/curta)			IL6, G-CSF, GH, LIF, IL12p35, GM-CSF, M-CSF, IL3, IL4, IL5, IL2, IL7, IL9, IL11, IL13, IL15, IL21, IL23p19, IL27p28		
Feixe de quatro hélices (IFN/IL10)				IL10, IL9, IL20, IL22, IL24, IL28A, IL28B, IFNa, IFNb, IFNg, IFNI	
IL8I, quimiocinas					Todas as quimiocinas conhecidas

Figura 1 Classificação estrutural das Citocinas e seus receptores. A maioria das citocinas, no interior da área sombreada de cinza, possuem um feixe de quatro hélices ligadas por pontes dissulfeto.

Adaptado de: The immune network - Università degli Studi di Pavia¹¹
http://nfs.unipv.it/nfs/minf/dispense/immunology/lectures/files/immune_network.htm

↓

Diversidade das dobras das citocinas		
IL1 (β trefoil)	IL4 (4 hélices)	IL10 (4 hélices)

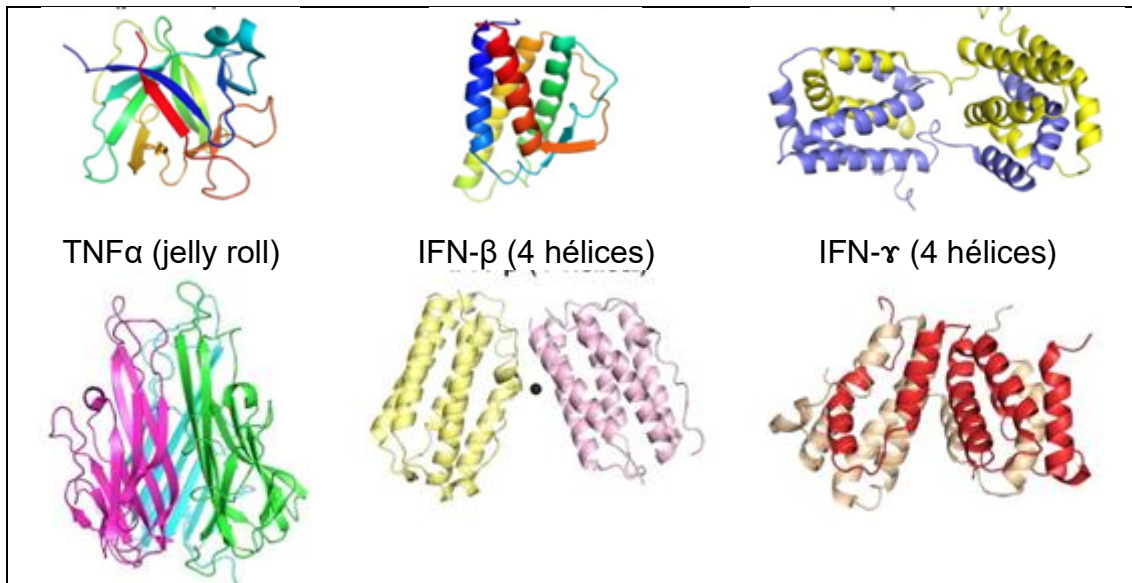


Figura 2 Característica estrutural da maioria das citocinas, que possuem um feixe de quatro hélices ligadas por pontes dissulfeto.
 Adaptado de: The immune network - Università degli Studi di Pavia ¹¹
http://nfs.unipv.it/nfs/minf/dispense/immunology/lectures/files/immune_network.htm
 !

Zhu Y, *et al* (2002) ¹⁰, em sua pesquisa por novas citocinas, devido a sua importância, utilizou este método de pesquisa baseado na estrutura da maioria das citocinas, que possui um feixe de quatro hélices ligadas por pontes dissulfeto, como mostrado na figura 1 e 2. Portanto, esta estrutura secundária incomum torna as citocinas um bom candidato para métodos de pesquisa baseados na estrutura. Como resultado, identificou-se um gene desconhecido, *Family with Sequence Similarity 3* (FAM3), na qual cada membro contém 224-235 aminoácidos com um peptídeo-sinal. A comparação da sequência de aminoácidos entre os 4 membros dessa subfamília, FAM3A, FAM3B, FAM3C e FAM3D revela uma identidade variando entre 31,6 a 53,3% entre elas, sem homologia com quaisquer outras citocinas conhecidas. FAM3A e FAM3C são expressos em quase todos os tecidos. Enquanto que FAM3B é fortemente expresso em células beta e alfa das ilhotas pancreáticas, o FAM3D é altamente expresso em placenta. Estes resultados revelaram uma nova família de citocinas.

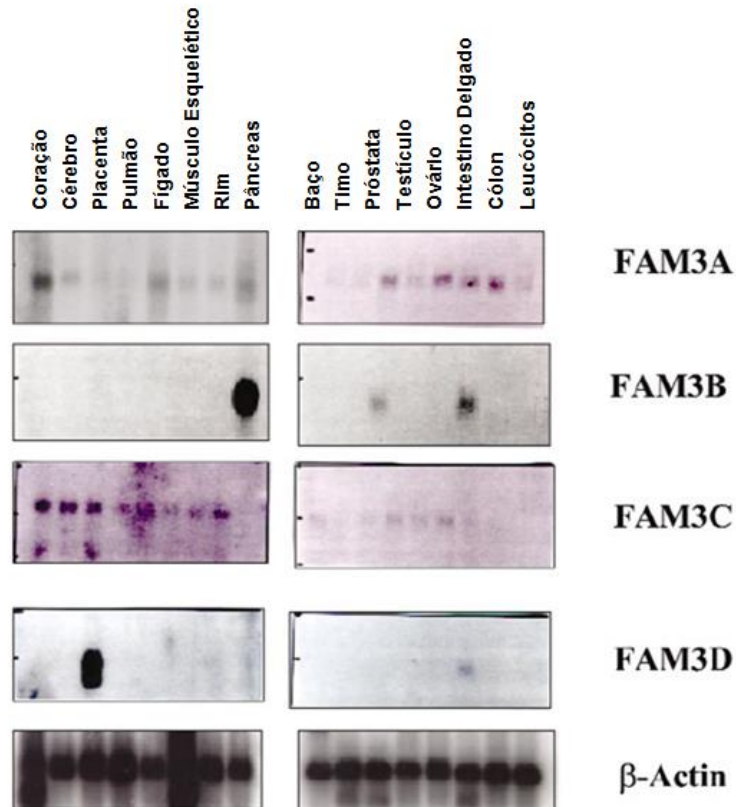


Figura 3 Expressão de mRNA do FAM3A, FAM3B, FAM3C, e FAM3D em múltiplos tecidos humanos por Northern blots. A β -Actina é o controle. Adaptado de: Zhu Y *et al.*, Genomics. 2002 ¹⁰.

1.4. FAM3D

O FAM3D faz parte de uma subfamília de proteínas semelhantes às citocinas conhecidas como *Family with Sequence Similarity 3* (FAM3), na qual cada membro contém 224-235 aminoácidos com um peptídeo-sinal. Apesar da alta expressão do FAM3D em um tecido hiperproliferativo, como a placenta, sugerir um papel na proliferação celular, seu papel nos processos fisiopatológico nos quais estaria envolvido ainda não é conhecido ¹⁰. É interessante o dado de que a exposição prolongada de células beta ao FAM3B (*PANcreatic DERived factor*, PANDER) causa uma inibição dose-dependente da secreção basal de insulina, porém, sem efeitos sobre a secreção de insulina induzida por glicose. Sugere-se, portanto, que o FAM3B seria um regulador negativo da função das células beta e poderia estar relacionado à apoptose de células beta ^{12; 14}.

Existe associação entre citocinas inflamatórias e DM como observado no estudo *European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC) - Potsdam Study*¹⁵, que revelou associação entre a elevação combinada de IL-1 β e de IL-6 e maior risco de DM2. Kim *et al.*¹⁶ demonstraram que a IL-6 provoca diminuição da ação da insulina no fígado e no músculo esquelético. As citocinas estão envolvidas na homeostase glicêmica e, por sua semelhança estrutural com a família das citocinas, o papel do FAM3D na secreção de insulina e na resistência à insulina deve ser investigado^{10; 12; 14}.

Em sua pesquisa para Tese de Doutorado, Souza, JJS (2006)¹⁷ buscou identificar fatores diabetogênicos cujos genes se expressam diferencialmente em tumores pancreáticos do tipo adenocarcinoma ductal. Foi observado que tumores de portadores de DM expressaram genes que não foram expressos nos tumores de indivíduos que não eram portadores de DM, entre os quais o gene do FAM3D, que está localizado no cromossomo 3, posição 3p14.2.

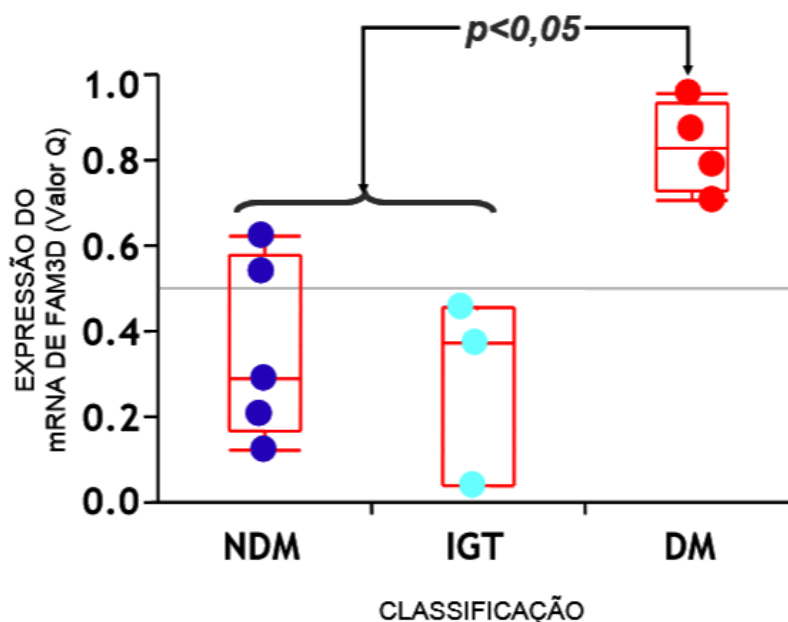


Figura 4 Expressão normalizada do mRNA do gene FAM3D em pacientes com adenocarcinoma ductal de pâncreas de acordo com a tolerância à glicose. NDM: Normotolerantes à glicose, IGT: Intolerantes à glicose, e DM: Portadores de DM. Souza JJS. Tese Doutorado USP, 2006¹⁷.

Na análise por imunohistoquímica, deste mesmo trabalho, foi observado que o pâncreas humano, tanto o normal quanto o com adenocarcinoma de pâncreas, apresenta imunorreatividade para a proteína FAM3D. Foram utilizados como controle positivo tecidos de cólon normal e placenta normal. A lâmina de cólon normal caracterizou-se por um padrão granular citoplasmático e na placenta um padrão nuclear difuso nos vilos. No pâncreas normal houve marcação nas ilhotas com um padrão citoplasmático difuso, e nas células ductais um padrão citoplasmático granuloso. Nas lâminas de adenocarcinoma de pâncreas o padrão de marcação para o FAM3D foi heterogêneo, com um padrão nuclear na maioria dos tumores associado à positividade citoplasmática¹⁷.

O papel do FAM3D necessita ser melhor investigado para elucidar sua função no controle da homeostase glicêmica, na secreção de insulina e na resistência à insulina. Há ainda a possibilidade de se utilizar o FAM3D como marcador de adenocarcinoma ductal de pâncreas, o que permitiria o seu diagnóstico precoce, em um estágio em que ainda houvesse possibilidade de cura¹⁷.

Em um estudo com ratos C57BL/6J, de Wit NJ *et al* (2012)¹⁸, identificaram uma oncoproteína, *Oncoprotein-induced transcript 1* (*Oit1*), no intestino delgado destes ratos estimulado por uma dieta rica em gorduras. Neste estudo, foi caracterizado o *Oit1* e sua família ortóloga humana com similaridade de sequência no cromossomo 3, um membro da família D (*FAM3D*). *Oit1* e *FAM3D* mostraram ser predominantemente expressos no trato gastrointestinal de ratos e humanos, respectivamente. Neste estudo, em amostras de plasma humano, foi observada a influência do estado nutricional sobre as concentrações plasmáticas do *FAM3D*, com uma elevação pós-prandial, e uma redução em jejum, o que mostra que estas proteínas são expressas e secretadas de um modo dependente do estado nutricional.

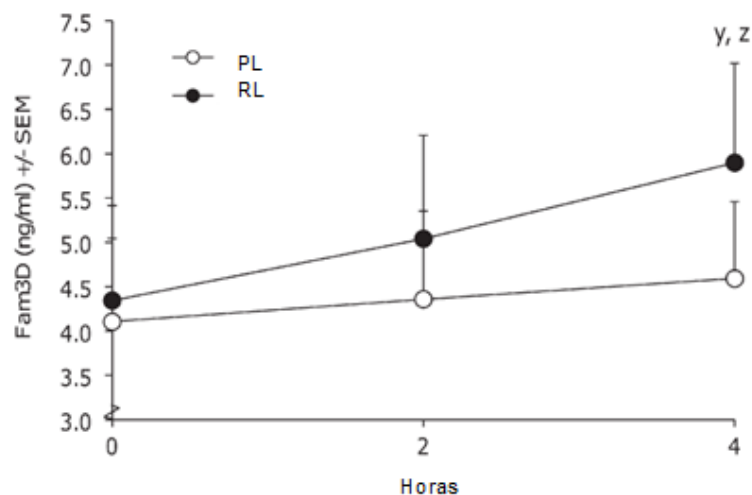


Figura 5 Concentrações plasmáticas do FAM3D humano 0, 2 e 4 horas após o consumo de uma dieta rica em lipídeos (RL) ou pobre em lipídeos (PL). Adaptado de: De Wit N J W et al. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 2012 ¹⁸.

A figura 5 mostra o aumento da concentração plasmática do FAM3D humano, induzido por uma dieta rica em lipídeos, em 2 e 4 horas. Isso reproduz os mesmos resultados obtidos com o experimento em ratos, confirmando sua família ortóloga em humanos.

À luz desses dados da literatura, em especial a ação do FAM3B sobre a célula Beta com inibição da secreção de insulina, aventa-se que as concentrações plasmáticas de FAM3D, em condições basais, estão aumentadas no paciente com DM2 quando comparadas com as de indivíduos saudáveis.

2. OBJETIVO

O objetivo dessa pesquisa foi determinar quantitativamente a concentração plasmática do FAM3D em grupo de indivíduos portadores de DM2 e compará-las com as de indivíduos com PDM2 e saudáveis, pareados de acordo com gênero, idade e índice de massa corpórea.

3. CASUÍSTICA E MÉTODO

3.1. Casuística

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da Universidade Nove de Julho – UNINOVE. Parecer nº 665.289, Data da Relatoria: 28/05/2014 (ANEXO 1).

Foram selecionados pacientes no ambulatório de endocrinologia da UNINOVE - Campus Vergueiro, e do ambulatório de endocrinologia da cidade de Manhuaçu – MG, e alocados em três grupos de análise: pacientes com DM2 há cinco anos ou mais, sob antidiabéticos orais; pacientes com PDM2 e o grupo controle (não diabéticos).

3.2. Critérios de inclusão

Pacientes adultos, com DM2 há cinco anos ou mais, sob antidiabéticos orais; pacientes que preencheram os critérios para PDM2 e pacientes que não eram portadores nem de DM2 e nem de PDM2 para o grupo controle.

3.3. Critérios de exclusão

Uso de Insulina; pacientes com complicações crônicas graves do DM2; cardiopatia, nefropatia e neuropatia, moderadas ou graves e pacientes com hepatopatias crônicas ou tireoidopatias. Pacientes com DM2 com tempo menor que 5 anos desde o seu diagnóstico.

3.4. Método

Selecionamos 90 pacientes, que, após a realização dos exames bioquímicos, 17 foram excluídos de acordo com os critérios de inclusão e exclusão. A distribuição entre os grupos por gênero ficou desta forma: DM2 – 15 masculinos e 14 femininos; PDM2 – 13 masculinos e 15 femininos e grupo controle – 7 masculinos e 9 femininos, totalizando 73 pacientes.

Todos foram submetidos à mensuração das medidas antropométricas: Peso (kg) e altura (m) aferidos em balança e estadiômetro da marca Welmy; cálculo do Índice de Massa Corpórea (IMC, em kg/m²); circunferências, aferidas com fita métrica flexível e inelástica (cm): cervical, cintura e quadril; cálculo da relação cintura/quadril (RCQ), utilizando a razão $RCQ=CC(cm)/CQ(cm)$. Também foi aferida a Pressão Arterial (PA, em mmHg). Na avaliação foram consideradas, distintamente, a Pressão Arterial Sistólica (PAS) e a Pressão Arterial Diastólica (PAD).

Foram realizados os Exames Bioquímicos em 3 laboratórios, sendo eles: o laboratório Afip (São Paulo – SP), que realizava, na época, os exames para a UNINOVE; o laboratório Fleury (São Paulo – SP), que realizou as análises de Insulina e Peptídeo C das amostras colhidas na UNINOVE, por meio de contrato com o grupo de pesquisa; e o Laboratório São Lourenço (Manhuaçu – MG), também por meio de contrato. Os Exames Bioquímicos realizados foram: glicemia de jejum (mg/dL), hemoglobina Glicada, (pelo método de Cromatografia Líquida De Alta Performance – HPLC, em %), colesterol total (mg/dL), HDL-colesterol (mg/dL), LDL- colesterol (mg/dL), triglicerídeos (mg/dL), insulina (μUI/mL), cálculo do HOMA-IR, do inglês *Homeostatic Model Assessment – Insulin Resistance* (glicemia de jejum [mmol/L] x insulina [μU/ml] ÷ 22,5), peptídeo C (ng/mL), e determinação da concentração plasmática do FAM3D (ng/mL). A amostra de plasma para a determinação da concentração do FAM3D foi parte da amostra colhida para todos os exames, porém, foi armazenada para a realização futura, quando todas as amostras já tivessem sido colhidas. Isto foi necessário em virtude da metodologia da análise ser feita em placas com capacidade para um grande número de amostras (96 poços por placa).

3.5. Análise do FAM3D em amostras de plasma humano

3.5.1. Coleta de material biológico - Plasma humano

Foram coletados 5 ml de sangue de todos os 90 voluntários em tubos contendo EDTA (1 mg/mL), os quais foram centrifugados a 2.500 RPM por 10 minutos, a 4°C. O plasma foi separado e armazenado, em temperatura de 20°C negativo, para futuras análises. As concentrações plasmáticas do FMA3D das

amostras foram analisadas no Laboratório de Pós Graduação da Universidade Nove de Julho. Essas amostras de plasma foram utilizadas na validação dos ensaios imunológicos e bioquímicos. Foram selecionadas, de forma aleatória, 12 amostras, sendo 4 de cada grupo, para serem analisadas em duplicata.

3.5.2. ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)

As concentrações do FAM3D foram quantitativamente determinadas em amostras de plasma humano pelo método de ELISA. Os Kits de ELISA para detecção do FAM3D foram adquiridos da MBL International, utilizando os conjuntos de reagentes *Ab-Match Assembly Human FAM3D* e *Ab-Match Universal Kit* (Cat. Nº 5321 e 5310, respectivamente. *MBL International Corp. Woburn, MA. USA*)¹⁹. De acordo com o fabricante, a dose mínima detectável é de 7,0 pg/mL, a variabilidade intraensaio é de 3,75% na concentração de 1,25 ng/mL e os limites da normalidade variam de 2,0 a 16 ng/mL. As medições foram realizadas de acordo com o protocolo do fabricante, descrito a seguir.

Placas de 96 poços foram sensibilizadas com anticorpos de captura e incubadas overnight a 4°C. Após a incubação, as placas foram lavadas 2 vezes com solução salina (NaCl 9,0g/1.000ml). Em seguida, a placa foi bloqueada com 200 µL/poço com agente bloqueador, permanecendo por 1h00 em temperatura ambiente. Após esse período, foram adicionadas as amostras de plasma diluídas 1:10 e incubadas por 1 hora em temperatura ambiente. As placas foram lavadas com solução de lavagem por 4 vezes. Foram acrescentados 100 ul do anticorpo de detecção e incubou-se a placa por 1h00 em temperatura ambiente. Posteriormente, as placas foram lavadas com solução de lavagem como descrito anteriormente. Foi adicionado em cada poço 100 ul de solução de streptoavidina conjugada com peroxidase e incubada por 1h00 em temperatura ambiente. A seguir, as placas foram lavadas com solução de lavagem como descrito anteriormente. Adicionou-se 100 ul de solução de substrato em cada poço e incubou-se a placa por 30 minutos. Para revelação, adicionou-se 100 ul de solução de parada em cada poço e a absorvância foi medida em um comprimento de onda de 450 nm com um M2 SpectraMax (Molecular Devices) e os resultados foram calculados com Excel 2013.

3.6. Análise estatística

O tamanho da amostra foi calculado, resultando um $n = 66$, que corresponde ao número total de indivíduos que deveria de ser analisado para ter uma estimativa confiável da proporção populacional. Finalizamos a pesquisa com um $n = 73$.

As variáveis: gênero, idade, medidas antropométricas, PA, e os exames bioquímicos de rotina foram expressos por Mediana e Intervalo Interquartilico (Mediana \pm Q) com o objetivo de caracterizar a amostra.

Os dados gerados na pesquisa foram agregados em tabelas segundo os critérios de análise. Como as concentrações plasmáticas de FAM3D não se ajustam à distribuição normal foram utilizadas as provas de Kruskal-Wallis, na comparação dos três grupos de estudo, e, para verificar quais grupos diferiram significativamente.

O coeficiente de regressão ρ de Spearman foi calculado nas análises de correlação entre as concentrações plasmáticas de FAM3D e outras variáveis antropométricas e bioquímicas. Os cálculos estatísticos foram realizados pelo programa JMP (SAS Campus Drive. Building T. Cary, USA).

O nível de significância estatística foi fixado em $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

Foram selecionados 90 pacientes, de junho a dezembro de 2014, sendo 31 com DM2; 34 com PDM2 e 25 CTRL. Todos os dados individuais, de cada paciente, estão registrados em uma planilha do Excel 2013, no Apêndice II, que é a Tabela mestra dos dados da pesquisa.

Desses pacientes, 9 foram excluídos devido aos exames não estarem completos (a maioria por material insuficiente). Os demais foram por itens dos critérios de exclusão, sendo o principal por apresentarem DM2 com menos de 5 anos desde o diagnóstico. Alguns pacientes com PDM2, classificados numa primeira avaliação, ao realizar os exames para a pesquisa, tiveram resultados compatíveis com DM2, porém, devido ao tempo do diagnóstico, não puderam ser realocados para o grupo de DM2. No entanto, os pacientes do grupo CTRL que tiveram os exames compatíveis com PDM2 puderam ser realocados para este grupo por preencher todos os critérios de inclusão e exclusão.

Tabela I – Características clínicas dos pacientes

Variável		DADOS DEMOGRÁFICOS				Significância		
		Total	Controle	PDM2	DM2	CTRLxPDM2	CTRLxDM2	PDM2xDM2
Sexo	Mas	35	7	13	15	-	-	-
	Fem	38	9	15	14	-	-	-
Idade (anos) (Mediana ± Q)		51,0 ± 9,00	47,0±0,21	45,5±0,48	63,0±4,00	NS	p<0,05	p<0,05
Peso (kg)		77,22 ± 17,33	70,25±14,62	84,48±19,98	74,05±13,51	p<0,05	NS	p<0,05
Altura (m)		1,64 ± 0,10	1,67±0,11	1,65±0,09	1,61±0,10	NS	NS	NS
IMC (kg/m ²)		28,67 ± 5,26	25,16±3,68	31,04±6,06	28,31±3,96	p<0,05	NS	NS
Circunferência cervical (cm)		38,71 ± 4,18	36,56±3,62	39,52±4,54	39,1±3,82	p<0,05	p<0,05	NS
Circunferência da cintura (cm)		92,82 ± 13,13	82,84±10,80	96,88±14,69	94,4±9,83	p<0,05	p<0,05	NS
Circunferência do quadril (cm)		105,22 ± 9,88	100,97±8,66	109,91±11,19	103,03±7,26	p<0,05	NS	p<0,05
Relação Cintura:Quadril		0,88 ± 0,09	0,82±0,08	0,88±0,09	0,92±0,07	p<0,05	p<0,05	NS
Pressão arterial (mmHg)	Sistólica	119,74 ± 15,80	105,94±12,28	119,14±13,65	127,93±14,24	p<0,05	p<0,05	p<0,05
	Diastólica	74,99 ± 8,17	70,0±9,66	76,04±8,35	76,72±6,02	p<0,05	p<0,05	NS

Os pacientes com DM2 apresentaram diferença de idade (DM2: 63,0 anos \pm 4,00) significativa ($p < 0,05$), em relação aos outros grupos (CTRL: 47,0 anos \pm 0,21 e PDM: 45,5 anos \pm 0,48), em virtude da sua maior prevalência com o aumento da idade.

Em relação ao IMC, os pacientes com PDM2 (31,04 Kg/m² \pm 6,06) têm resultados mais elevados que os outros grupos, porém, houve diferença significativa ($p < 0,05$) com o grupo CTRL (25,16 Kg/m² \pm 3,68). Esse dado se refletiu também na Relação Cintura/Quadril, onde o grupo CTRL apresentou valores menores em relação aos dois outros grupos ($p < 0,05$).

A relação das concentrações sérica da insulina dos pacientes com PDM2 com o grupo CTRL reflete o grau de resistência periférica à insulina desses pacientes, com níveis mais elevados ($p < 0,0008$), e que está de acordo com a literatura especializada. Este dado é confirmado pela diferença, também significativa, dos valores do HOMA-IR do grupo CTRL com os demais. Vemos uma diferença significativa quando o HOMA-IR do grupo CTRL é comparado com o do DM2 ($p < 0,0017$), e do grupo CTRL com o PDM2 ($p < 0,0018$).

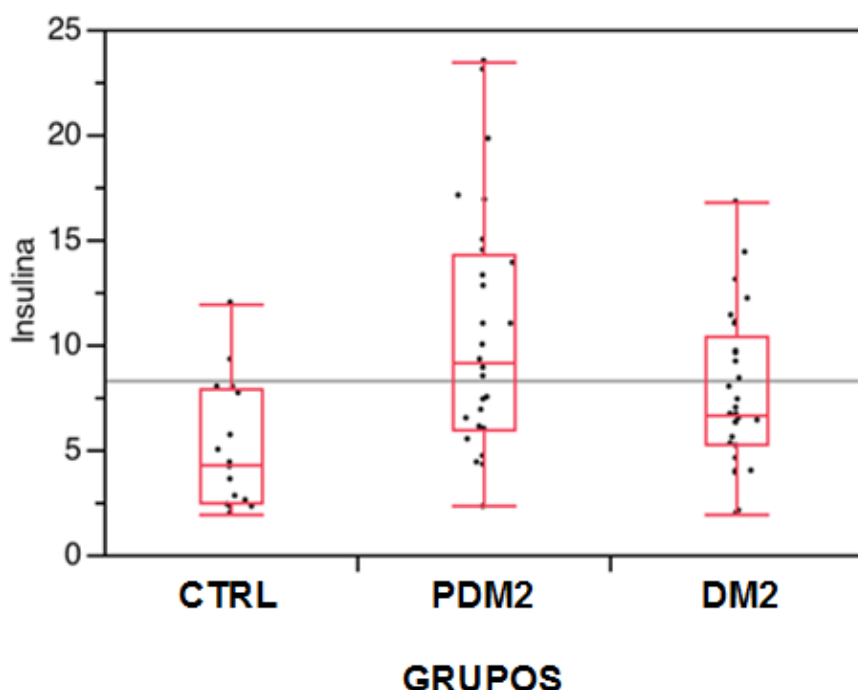


Figura 6 Comparação da relação da Insulina (μ UI/mL) dos pacientes de acordo com o grupo. CTRL: Controle; PDM2: Pré Diabetes Mellitus Tipo 2; DM2: Diabetes Mellitus Tipo 2. $p < 0,0008$ para PDM2xCTRL.

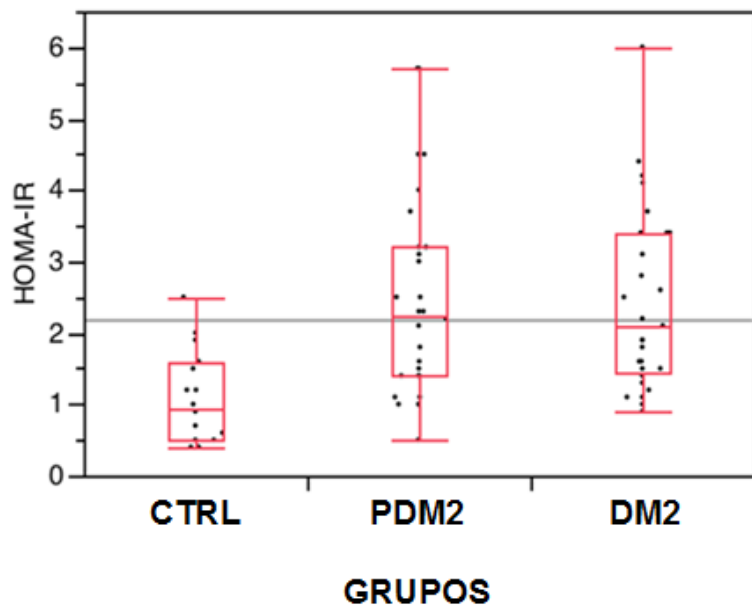


Figura 7 Comparação da relação do HOMA-IR (glicemia de jejum [mmol/L] x insulina [μ U/ml] \div 22,5) dos pacientes de acordo com o grupo. CTRL: Controle; PDM2: Pré Diabetes Mellitus Tipo 2; DM2: Diabetes Mellitus Tipo 2. $p < 0,0018$ para CTRLxPDM2 e $p < 0,0017$ para CTRLxDM2

Entres os grupos não houve diferença significativa da concentração do FAM3D, sendo a Mediana \pm Q para o grupo CTRL (24,92 ng/mL \pm 9,11); PDM2 (14,65 ng/mL \pm 6,02) e DM2 (19,87 ng/mL \pm 5,39).

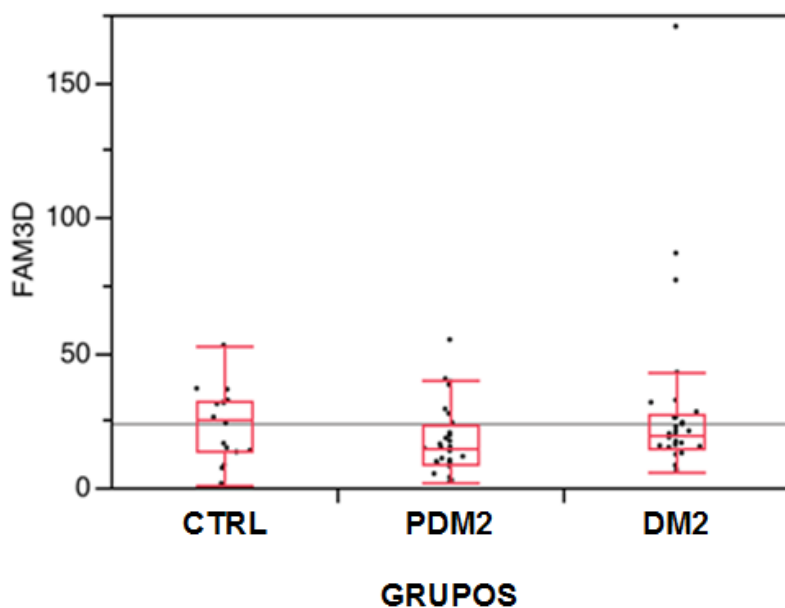


Figura 8 Comparação da concentração do FAM3D (ng/mL) dos pacientes de acordo com o grupo. CTRL: Controle; PDM2: Pré Diabetes Mellitus Tipo 2; DM2: Diabetes Mellitus Tipo 2. Não houve diferença significativa entre os grupos.

O FAM3D foi mais elevado no grupo dos pacientes com DM2 em uso de Sulfoniluréia ($p=0,0001$). O grupo de pacientes com DM2 sob sulfoniluréia ($23,42 \text{ ng/mL} \pm 6,1$) apresentou valores maiores em comparação ao grupo tratado com outros anti-diabéticos orais ($14,9 \text{ ng/mL} \pm 7,30$), $p<0,05$.

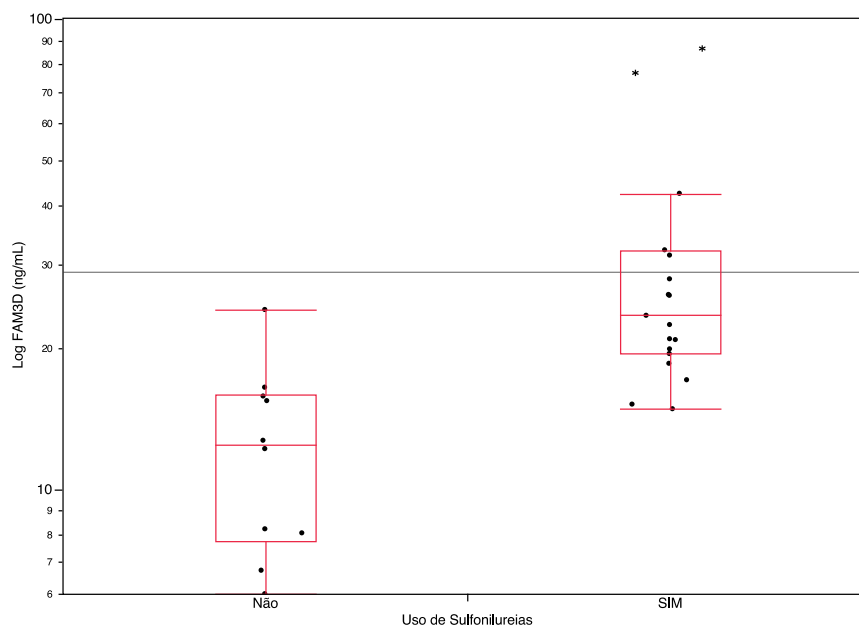


Figura 9 Comparação do Log do FAM3D (ng/mL) em relação aos pacientes com DM2 que estão em uso ou não de Sulfonilureias. O grupo de pacientes DM2 em uso de sulfonilureia (SIM) ($23,42 \text{ ng/mL} \pm 6,1$) em comparação ao grupo tratado com outros anti-diabéticos orais (NÃO) ($14,9 \text{ ng/mL} \pm 7,30$), $p<0,05$.

Três pacientes do grupo DM2 apresentaram valores do FAM3D muito elevados, sendo um homem, de 64 anos, com FAM3D de $170,6 \text{ ng/mL}$ e 15 anos desde o diagnóstico do DM2. Este paciente apresenta Esteatose Hepática diagnosticada em USG abdominal de maio de 2014. O segundo é homem, de 57 anos, com FAM3D de $86,7 \text{ ng/mL}$ e 11 anos desde o diagnóstico do DM2. E, por último, uma mulher, de 81 anos, com FAM3D de $76,7 \text{ ng/mL}$ e 5 anos desde o diagnóstico do DM2. Todos estes três pacientes foram submetidos à novos exames. Foi feito a dosagem sérica dos marcadores tumorais: CA 19-9; CA 15-3; CA 125; CEA; Alfa-feto proteína e β -HCG, que foram todos normais, e Ultrassonografia (USG) abdominal, que não mostrou nenhuma imagem compatível com massas, tumorações ou coleções líquidas.

Todos os pacientes da pesquisa permanecem em acompanhamento nos ambulatórios. Esses três pacientes com valores muito aumentados do FAM3D, além de seus exames de rotina, farão novas dosagens dos marcadores tumorais e da USG abdominal a cada 6 meses. Exames de imagem mais sensíveis, para o rastreamento de tumores, serão solicitados no acompanhamento destes pacientes (Ressonância Magnética de abdômen e Pelve e Colonoscopia).

O FAM3D não mostrou relação com nenhum outro medicamento utilizado para o tratamento do DM2, tais como: Metformina; Glitazonas e Gliptinas e nenhum outro medicamento utilizado para outras doenças, tais como: Estatinas; Fibratos; Anti-Hipertensivos; AAS e Psicofármacos. Também não mostrou relação com as concentrações da glicemia, insulina, peptideo-C, lípidos, cálculo do HOMA-IR e nem com as medidas antropométricas.

5. DISCUSSÃO

A população estudada mostrou características e exames que tiveram relação com a idade; Peso; IMC e RCQ, compatíveis com os dados da literatura ^{2; 6; 7}. Isso sugere que a amostra foi representativa.

A distribuição da amostra total, com relação ao gênero, foi uniforme e a idade dos pacientes com DM2 foi mais elevada, em relação aos outros grupos, em virtude da maior prevalência do DM2 com o aumento da idade.

Os dados encontrados refletem a relação da resistência insulínica com a obesidade, IMC, Relação C/Q e HOMA-IR, já bem estabelecidos na literatura e na nossa prática clínica ⁴. Ela está presente alguns anos antes do diagnóstico do DM2. Por isso, o tratamento do DM2, bem como sua prevenção primária, é baseado em orientações dietéticas e incentivo a prática de atividade física, visando a reduzir a massa de gordura e o ganho de massa magra, que irá contribuir para a redução da resistência periférica à ação da insulina. Quando já estabelecido o PDM2 ou o DM2, além deste tratamento, iniciam-se fármacos que irão atuar, especificamente, na redução da resistência tecidual (principalmente hepática e muscular) à ação da insulina.

O PDM2, que ainda não é considerado uma “entidade clínica”, deve ser tratado segundo as diretrizes das entidades relacionadas ao DM. Isso pode evitar que uma parcela considerável da população evolua para o DM2, já que o PDM2 pode permanecer neste estado, ou voltar a valores normais ou evoluir para o DM2 ^{3; 9}.

O conhecimento da ação de novas substâncias, como as citocinas que compõe a família FAM3, poderá nos auxiliar na intervenção sobre a evolução do DM e outras doenças. Sabe-se que a exposição prolongada de células beta pancreáticas ao FAM3B (PANDER) causa uma inibição dose-dependente da secreção basal de insulina. Aventa-se a hipótese que o FAM3B seria um regulador negativo da função das células beta e poderia estar relacionado à apoptose destas células ¹⁰.

Entres os grupos estudados não houve diferença significativa da concentração do FAM3D basal. Houve um aumento significativo nos pacientes com DM2 em uso de Sulfonilurías em relação aos pacientes com DM2 em uso de outros medicamentos Hipoglicemiantes Oraís. Isso pode ser devido a um efeito desses medicamentos sobre o estímulo da secreção da Insulina, lembrando que os receptores para alguns medicamentos desta classe não se encontram exclusivamente nas células Beta-Pancreáticas. Podemos, também, aventar a hipótese destes medicamentos exercerem um efeito direto sobre as demais células pancreáticas, e não só a célula Beta, à parte do seu efeito sobre a secreção de Insulina.

Os estudos mostram um aumento das concentrações plasmáticas do FAM3D relacionado com uma dieta rica em lipídeos, e nossa pesquisa foi realizada com valores basais para que possamos elucidar o seu papel sobre o funcionamento normal do organismo. Isso vai suscitar novos estudos, com parâmetros e estímulos diversos ¹⁸.

A melhor compreensão da ação do FAM3D, bem como a sua relação com câncer, precisam de mais estudos que devem investigar a correlação do FAM3D como possível marcador do Adenocarcinoma de Pâncreas. Essa possibilidade é de grande importância, devido à rápida evolução e a alta taxa de mortalidade desta doença.

6. CONCLUSÕES

O FAM3D, em amostras de jejum, não apresentou diferença entre os grupos estudados, porém, houve um aumento significativo nos pacientes com DM2 em uso de Sulfonilurías em relação aos pacientes com DM2 em uso de outros medicamentos Hipoglicemiantes Orais. Essa relação precisa ser melhor esclarecida, já que o FAM3D está aumentado em pacientes com Adenocarcinoma de Pâncreas que tem DM ele pode ser um possível marcador. Também é descrita a sua relação com o Câncer de Cólon.

A busca por conhecimentos que nos auxiliem a prevenir o DM ou, ao menos, ter um diagnóstico precoce, quando o paciente ainda não apresenta nenhuma complicação, se faz cada dia mais urgente. O comprometimento em gastos com a saúde, e em especial o DM, cresce a cada dia, comprometendo o desenvolvimento de países que ainda precisam investir em ações básicas de saúde, como o tratamento da água e dos esgotos, educação e transporte público de qualidade.

7. CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Os indivíduos elegíveis para a pesquisa, baseado nos critérios de inclusão, foram convidados a participar da pesquisa pelo pesquisador principal. Naquele momento, foram apresentadas as informações sobre a pesquisa (objetivos, riscos, benefícios, e procedimentos aos quais foram submetidos). Confirmado o desejo de participar voluntariamente da pesquisa, foi entregue uma cópia do termo de consentimento livre e esclarecido, para que lesse seu conteúdo, entendesse e pudessem ser esclarecidas suas dúvidas, caso houvesse alguma. Só então, com a assinatura do termo é que foi formalizada a participação do indivíduo na pesquisa (Anexo I).

8. BIBLIOGRAFIA

1. Schmidt MI, Duncan BB, Silva GA, Menezes AM, Monteiro CA, Barreto SM, Chor D, Menezes PR. *Chronic non-communicable diseases in Brazil: burden and current challenges*. 9781, June de 2011, The Lancet, Vol. 377, pp. 1949-1961.
2. International Diabetes Federation (IDF). *IDF Diabetes Atlas, 6th ed*. Brussels, Belgium : s.n., 2013.
3. SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. *DIRETRIZES DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES*. São Paulo, Brasil : GEN, 2014-2015.
4. *Standards of Medical Care in Diabetes 2014*. American Diabetes Association. Suplemento 1, Janeiro 2014, Diabetes Care, Vol. 37, pp. S14-S80.
5. Ezzati M, Riboli E. *Behavioral and Dietary Risk Factors for Noncommunicable Diseases*. 2013, N Engl J Med, Vol. 369, pp. 954-64.
6. Danaei G, Finucane MM, Lu Y, Singh GM, Cowan MJ, Paciorek CJ, Lin JK, Farzadfar F, Khang YH, Stevens GA, Rao M, Ali MK, Riley LM, Robinson CA, Ezzati M. *National, regional, and global trends in fasting plasma glucose and diabetes prevalence since 1980: systematic analysis of health examination surveys and epidemiological studies with 370 country-years and 2.7 million participants*. 2011, Lancet, Vol. 378, pp. 31–40.
7. Zimmet PZ, Magliano DJ, Herman WH, Shaw JE. *Diabetes: a 21st century challenge*. 2014, Lancet Diabetes Endocrinol, Vol. 2, pp. 56–64.
8. Ng CS, Lee JYC, Toh MPHS, Ko Y. *Cost-of-illness studies of diabetes mellitus: A systematic review*. s.l. : ELSEVIER, 2014, Diabetes Research and Clinical Practice, Vol. 105, pp. 151-163.
9. Perreault L, Færch K. *Approaching Pre-diabetes*. s.l. : ELSEVIER, 2014, Journal of Diabetes and Its Complications, Vol. 28, pp. 226–233.
10. Zhu Y, Xu G, Patel A, McLaughlin MM, Silverman C, Knecht K, Sweitzer S, Li X, McDonnell P, Mirabile R, Zimmerman D, Boyce R, Tierney LA, Hu E, Livi GP, Wolf B, Abdel-Meguid SS, Rose GD, Aurora R, Hensley P, Briggs M, Young PR. *Cloning, Expression, and Initial Characterization of a Novel Cytokine-like Gene Family*. Vol. 80, Number 2, August 2002, GENOMICS, pp. 144 - 150.
11. Università degli Studi di Pavia. The immune network. *The immune network*. [Online] 23 de Novembro de 2014. [Citado em: 23 de Novembro de 2014.]
Facoltà di Medicina e Chirurgia.

http://nfs.unipv.it/nfs/minf/dispense/immunology/lectures/files/immune_network.html.

12. Cao X, Gao Z, Robert CE, Greene S, Xu G, Xu W, Bell E, Campbell D, Zhu Y, Young R, Trucco M, Markmann JF, Najj A, Wolf BA. *Pancreatic-derived factor (FAM3B), a novel islet cytokine, induces apoptosis of insulin-secreting beta cells.* 2003, *Diabetes*, Vol. 52, pp. 2296-303.

13. CA, Dinarello. *Historical Review of Cytokines.* November de 2007, *Eur J Immunol.*, Vol. 37(Suppl 1), pp. S34–S45.

14. Cao X, Yang J, Burkhardt B, Gao Z, Wong RK, Greene S, Wu J, Wolf BA. *Effects of over-expression of Pancreatic-Derived Factor (FAM3B) in isolated mouse islets and insulin secreting β TC3 cells.* 2005, *Am J Physiol Endocrinol Metab.*, Vol. 4, pp. E543-50.

15. Spranger J, Kroke A, Mohlig M, Hoffmann K, Bergmann MM, Ristow M, Boeing H, Pfeiffer AF. *Inflammatory cytokines and the risk to develop type 2 diabetes: results of the prospective population-based European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC)-Potsdam Study.* 2003, *Diabetes*, Vol. 52, pp. 812-7.

16. Kim JH, Bachmann RA, Chen J. Interleukin-6 and Insulin Resistance. [A. do livro] Gerald Litwack. *Insulin and IGFs.* s.l. : Elsevier Inc., 2009, pp. 613–633.

17. Souza, J J S. *Identificação de fatores diabetogênicos associados ao adenocarcinoma de pâncreas.* São Paulo : Tese de Doutorado - Universidade de São Paulo, 2006.

18. de Wit NJW, IJssennagger N, Oosterink E, Keshtkar S, Hooiveld GJEJ, Mensink RP, Hammer S, Smit JWA, Müller M, der Meer RV. *Oit1/Fam3D, a gut-secreted protein displaying nutritional status-dependent regulation.* s.l. : ELSEVIER, 2012, *Journal of Nutritional Biochemistry*, Vol. 23 (2012), pp. 1425–1433.

19. R&D Systems, Inc. Ab-Match ASSEMBLY Human FAM3D kit. *Ab-Match ASSEMBLY Human FAM3D kit.* [Online] [Citado em: 03 de Abril de 2014.] <http://www.mblintl.com/product/5321>.

20. WO, Bussab e PA, Morettin. *Etatística Básica.* 8ª Edição. São Paulo : Saraiva, 2013. pp. 291-293.

21. RA, Medronho. *Epidemiologia.* 2ª Edição. São Paulo : Atheneu, 2009. pp. 415-427.

9. APÊNDICE

Apêndice I - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

UNIVERSIDADE NOVE DE JULHO (UNINOVE)

MESTRADO EM MEDICINA

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL.

NOME:

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº: SEXO: M F

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

ENDEREÇO Nº..... APTO:

BAIRRO: CIDADE

CEP: TELEFONE: DDD (.....)

DADOS SOBRE A PESQUISA

1. Título da pesquisa:

Determinação Quantitativa da Proteína FAM3D plasmática de Indivíduos Portadores de Diabetes Mellitus de Tipo 2.

2. Pesquisadores:

José Antônio Januário Neves e Daniel Giannella Neto. A quem os participantes da pesquisa poderão contatar e consultar a qualquer momento que julgar necessário através do telefone 11 94303-0099 ou e-mails: joseajneves@gmail.com ou dgiannellaneto@terra.com.

3. Objetivo da pesquisa:

O objetivo desse projeto será o de determinar quantitativamente a concentração (a quantidade) no sangue do FAM3D em indivíduos normais e com diabetes mellitus do tipo 2.

4. Local da pesquisa:

Será desenvolvida na Universidade Nove de Julho - UNINOVE. A coleta de dados será realizada, voluntariamente, com os pacientes do Ambulatório de Endocrinologia desta instituição.

5. Avaliação do risco da pesquisa:

Risco: Há o risco de hematoma (mancha roxa) no local da punção (picada da agulha) para a coleta de sangue.

Benefícios: Aumentar o conhecimento do FAM3D no controle da glicose dos pacientes com diabetes mellitus tipo 2.

6. Duração da pesquisa: 1,5 ano.

7. Coleta de dados antropométricos, clínicos e laboratoriais:

Os dados serão coletados uma vez, no momento da primeira consulta, no Ambulatório de Endocrinologia da UNINOVE, no momento da consulta médica com o Mestrando em Medicina José Antônio Januário Neves, médico, especialista em Endocrinologia, sob a supervisão do médico Cléber Camacho, também Endocrinologista, responsável pelas atividades deste ambulatório.

Os dados antropométricos são: Peso e altura aferidos em balança e estadiômetro da marca Welmy; circunferências cervical (pescoço), cintura e quadril com fita métrica.

Os dados clínicos da anamnese (consulta): se é portador ou não de Diabetes Mellitus tipo 2, se sim, há quanto tempo; quais os medicamentos em uso; quantos e quais familiares que são portadores de Diabetes Mellitus tipo 2 e outros dados da história clínica, mais o valor da Pressão Arterial, medida durante a consulta. O tempo gasto para a coleta dos dados antropométricos e clínicos será durante o tempo da consulta médica.

Os dados laboratoriais: todos os pacientes farão exames de sangue, que será coletado (tirar sangue para exames) no Laboratório de Análises Clínicas da UNINOVE. Uma parte da amostra de sangue será usada para os exames que são feitos de rotina neste laboratório (glicemia de jejum, hemoglobina glicada, colesterol total e frações, triglicerídeos, e outros que se fizerem necessários a cada paciente). Outra parte da amostra será reservada para as dosagens do FAM3D, Insulina e Peptídeo C. O FAM3D será dosado no Laboratório de Pesquisas da UNINOVE. A Insulina e o Peptídeo C serão dosados em um laboratório externo, após pesquisa de custo e qualidade. O tempo gasto para a coleta de sangue será entre 5 e 10 minutos, em média. Os pacientes serão atendidos por ordem de chegada.

8. Garantia de acesso e sigilo:

Em qualquer etapa do estudo, eu terei acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O principal investigador é o Dr. Daniel Giannella Neto, que poderá ser encontrado no endereço: Rua Vergueiro, 235/249, Liberdade – São Paulo. Se eu tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, poderei entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Vergueiro, 235, Liberdade –

São Paulo – tel: (11) 3385-9241 – E-mail: comitedeetica@uninove.com.br. É garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e eu posso deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de meu tratamento na Instituição. As informações obtidas serão analisadas em conjunto com as de outros pacientes, não sendo divulgada a identificação de nenhum paciente. Eu tenho o direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais das pesquisas, ou de resultados que sejam do conhecimento dos pesquisadores. Não há despesas pessoais para mim em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não receberei nenhuma compensação financeira relacionada à minha participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa.

Fui suficientemente esclarecido(a) a respeito das informações que li, ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo: “Determinação Quantitativa da Proteína FAM3D plasmática de Indivíduos Portadores de Diabetes Mellitus de Tipo 2”.

Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de sigilo e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro, também, que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso ao tratamento ambulatorial, nos ambulatórios da UNINOVE. Concordo, voluntariamente, em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades, sem prejuízos ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

Este documento é emitido em duas vias que serão ambas assinadas por mim e pelo pesquisador, ficando uma via com cada um de nós.

_____ São Paulo, Data __/__/__

Assinatura do paciente/representante legal.

_____ São Paulo, Data __/__/__

Assinatura da testemunha.

Representante legal para os casos de pacientes analfabetos, semianalfabetos 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.

_____ São Paulo, Data __/__/__

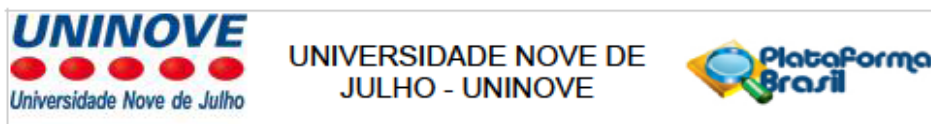
Assinatura do responsável pelo estudo.

Apêndice II (Parte 2) – Tabela mestra dos dados da pesquisa, na planilha do Exel (em tamanho reduzido).

Z	AA	AB	AC	AD	AE	AF	AG	AH	AI	AJ
FAMSD	Húndria Familiar do DM	Ura de Biquanida (Metformina)	Ura de Sulfanilureia	Ura de Glitazenas	Ura de Glicitinas	Ura de Estatinas	Ura de Fibratos	Ura de Anti-hipertensivos	Ura de AAS	Ura de Psicofármacos
19,27	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0
20,79	0	1	1	0	1	0	0	1	0	0
15,42	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0
170,63	1	1	1	0	1	0	1	1	0	0
31,45	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1
86,69	1	1	1	0	1	0	0	1	0	0
12,19	1	1	0	0	0	1	0	0	1	0
32,27	0	1	1	0	1	0	0	1	0	0
5,07	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0
5,99	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
25,93	1	1	1	0	1	1	0	1	0	0
15,16	1	1	1	0	0	1	0	1	0	1
23,42	1	1	1	0	0	0	1	1	0	0
17,08	1	1	1	0	0	1	0	1	0	0
12,70	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0
24,09	0	1	0	0	0	1	1	1	0	0
20,38	1	1	1	0	1	0	0	1	0	0
23,00	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0
19,42	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0
18,51	1	1	1	0	1	0	1	0	0	0
76,74	1	1	1	0	0	1	0	1	0	0
22,38	1	1	1	0	0	0	1	1	0	0
14,82	1	1	1	0	0	1	0	1	0	0
16,47	1	1	1	0	1	1	1	0	0	0
15,77	1	1	0	0	1	1	0	1	0	0
25,03	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0
3,23	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
42,55	1	1	1	0	1	0	1	1	0	0
14,82	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
39,21	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10,18	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3,34	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2,00	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0
9,23	1	1	1	0	1	0	1	0	1	0
23,99	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0
16,03	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0
13,54	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
18,24	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0
15,07	1	1	0	0	0	0	0	1	0	1
5,06	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
29,00	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1
17,17	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
9,63	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
11,47	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
6,72	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0
10,74	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
8,30	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
27,31	1	1	0	0	0	0	1	0	0	1
32,27	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
31,24	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
31,55	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
3,75	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1
14,47	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0
40,20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
20,24	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
13,63	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0
26,60	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0
54,67	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
38,01	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1
2,70	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
8,30	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
52,59	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1,40	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
13,12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
19,23	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
23,00	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
39,83	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
7,17	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
16,29	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
7,85	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
26,03	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
36,28	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
14,65	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0

10. ANEXOS

Anexo 1 – Parecer consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP).



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Determinação Quantitativa da Proteína FAM3D plasmática de Indivíduos Portadores de Diabetes Mellitus de Tipo 2

Pesquisador: Daniel Glannella Neto

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 30355914.1.0000.5511

Instituição Proponente: ASSOCIACAO EDUCACIONAL NOVE DE JULHO

Patrocinador Principal: ASSOCIACAO EDUCACIONAL NOVE DE JULHO

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 665.289

Data da Relatoria: 28/05/2014

Apresentação do Projeto:

Determinação Quantitativa da Proteína FAM3D plasmática de Indivíduos Portadores de Diabetes Mellitus de Tipo 2.

Objetivo da Pesquisa:

O objetivo dessa pesquisa será o de medir quanto da proteína FAM3D tem no sangue de pessoas normais e com diabetes mellitus do tipo 2.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Risco: Há o risco de ficar uma mancha roxa (hematoma) no local da picada da agulha (punção) para tirar o sangue.

Benefícios: Aumentar o conhecimento do FAM3D nos pacientes com diabetes mellitus tipo 2.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa e o TCLE estão adequados ao estudo e desenho proposto.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

O TCLE apresenta uma linguagem adequada. Deve ser acrescentado ao TCLE o item de Garantia do Sigilo.

Endereço: VERGUEIRO nº 235/249
Bairro: LIBERDADE
UF: SP
Telefone: (11)3385-9197
Município: SAO PAULO
CEP: 01.504-001
E-mail: comiteetica@uninove.br

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O TCLE apresenta uma linguagem adequada.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Projeto aprovado.

SAO PAULO, 28 de Maio de 2014

Assinado por:
Stella Regina Zamuner
(Coordenador)

Endereço: VERGUEIRO n° 235/249

Bairro: LIBERDADE

CEP: 01.504-001

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)3385-9197

E-mail: comitedeetica@uninove.br