



Universidade de Aveiro Departamento de Química
2014

Tiago Manuel Marcadores de resposta a fármacos em doentes
Ferreira de Almeida de Diabetes tipo 2



Universidade de Aveiro Departamento de Química
2014

**Tiago Manuel
Ferreira de Almeida**

**Marcadores de resposta a fármacos em doentes
de Diabetes tipo 2**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia Industrial e Ambiental, realizada sob a orientação científica da Doutora Conceição Egas, Investigadora Auxiliar do Biocant e sob a orientação científica do Doutor Jorge Saraiva, Investigador Auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Este trabalho foi efetuado no âmbito do programa COMPETE através do projeto DoIT- Desenvolvimento e Operacionalização da Investigação de Translação, ref: FCOMP-01-0202-FEDER-013853.

Dedico este trabalho...

A Deus por iluminar a minha vida.

Aos meus pais Belmiro Manuel Fernandes de Almeida e Teresa Rodrigues Ferreira e ao meu irmão Luís Carlos Ferreira de Almeida pelo apoio incondicional, compreensão e incentivo ao longo da minha trajetória.

Aos meus orientadores Dra. Conceição Egas e Dr. Jorge Saraiva pela sua dedicação, conselhos enriquecedores e disponibilidade.

Aos meus professores, colegas de curso, Biocant e rugby, amigos e familiares quero agradecer por todos os grandiosos ensinamentos que fizeram de mim o que sou hoje.

A todos vós a minha gratidão.

o júri
presidente

Prof. José António Teixeira Lopes da Silva
Professor auxiliar do Departamento de química da Universidade do de Aveiro

Doutora Maria do Rosário Almeida
Investigadora do Centro de Neurociências e Biologia Celular da Universidade de Coimbra

Doutora Maria da Conceição Venâncio Egas
Investigadora do Biocant Coimbra

agradecimentos

Quero agradecer aos meus orientadores Dra. Conceição Egas e Dr. Jorge Saraiva pela exigência e profissionalismo com que orientaram esta tese. Aos meus colegas do Biocant pela ajuda e disponibilidade que sempre demonstraram e por fim á minha família e amigos por todo o incentivo.

palavras-chave Polimorfismo de nucleótido único (SNP), diabetes mellitus tipo 2 (DM2), sequenciação de última geração, análise de exoma, farmacogenética, medicina personalizada, bioinformática.

resumo A diabetes mellitus tipo 2 é atualmente uma das doenças com maior prevalência a nível mundial. No mercado existem vários tratamentos que englobam desde antidiabéticos orais a vários tipos de insulina. A variabilidade genética individual constitui um dos principais entraves à eficácia destes antidiabéticos, na medida em que pode afetar resposta ao tratamento.

O objetivo do presente trabalho consistiu na caracterização de uma amostra de indivíduos diabéticos portugueses, através do levantamento de um conjunto polimorfismos de nucleótido único identificadas na literatura e bases dados (relacionados com a farmacogenética da DM2, em região codificante e referentes à população europeia (EUR)), seguido de uma correlação destes resultados com os fármacos administrados aos indivíduos da amostra. Além disso, também se pretendeu propor um conjunto de SNPs candidatos para farmacogenética da DM2.

Neste trabalho foi utilizado como amostra o exoma de 51 indivíduos portugueses portadores da DM2, sequenciados na plataforma *Ion Proton*.

O trabalho consistiu numa primeira fase de identificação e seleção dos SNPs associados à farmacogenética da DM2 em artigos científicos e bases dados, sendo que no total foram identificados 98 SNPs. Deste conjunto de SNPs e de forma a caracterizar a amostra, procedeu-se ao levantamento de todos os SNPs que se encontravam em região codificante e associados à população EUR, num total de 19. Dezas seis SNPs foram encontrados em 10 genes nos doentes em estudo. Da correlação dos fármacos administrados na amostra em estudo com os resultados decorrentes do levantamento destes SNPs apurou-se que os indivíduos portadores dos SNPs rs12208357, rs34130495 e rs3405950 (SLC22A1) necessitavam de uma maior dose de metformina, os portadores do SNP rs1801282 (PPAR γ) necessitavam de um controlo mais apertado do tratamento metformina (dado o aumento de risco de falha para este tratamento) e os portadores do SNP rs5219 (KCNJ11) necessitavam de uma dose maior de gliclazida.

Numa segunda fase e com o objetivo de identificar e propor um conjunto de potenciais SNPs candidatos para futuros estudos relativos à farmacogenética da DM2 na população portuguesa foram selecionados do conjunto de 98 SNPs, 32 SNPs localizados na região codificante e não referenciados na população EUR. Além destes, também foram identificados 15 SNPs ainda não relacionados com a DM2.

Em suma, este trabalho permitiu-nos caracterizar a nível farmacogenético a população portuguesa relativamente à DM2 e propor um conjunto de potenciais SNPs candidatos para futuros estudos de farmacogenética da DM2 na população portuguesa.

keywords

Single nucleotide polymorphism (SNP), diabetes mellitus type 2 (DM2), next-generation sequencing, exome analysis, pharmacogenetics, personalized medicine, bioinformatics

abstract

Diabetes mellitus type 2 is currently one of the diseases with the highest prevalence worldwide. On the market there are several treatments, namely oral antidiabetics and various types of insulin. The individual genetic variability is one of the main obstacles to the effectiveness of these antidiabetics, since it can affect treatment response. The aim of this study was to characterize a sample of Portuguese diabetic individuals, through survey of a single nucleotide polymorphisms set identified in the literature and databases (related to pharmacogenetics of DM2 in coding region and for the European population (EUR)), followed by a correlation of these results with the drugs administered to individuals in the sample. Moreover, also it was intended to propose a set of SNPs candidates for pharmacogenetics of DM2.

The population in study consisted of 51 DM2 portuguese patients with the exomes sequenced in the Ion Proton platform.

The work started with the identification and selection of SNPs associated with pharmacogenetics of DM2 in scientific articles and databases, where a total of 98 SNPs were identified. These SNPs were filtered for those in the coding region and associated with the EUR population. Sixteen SNPs were observed in 10 genes in the 51 patients. Correlation of drugs administered in the sample in study with the results from the survey of these SNPs, indicated that individuals carrying the SNPs rs12208357, rs34130495 and rs3405950 (SLC22A1) needed a higher dose of metformin, the carriers of SNP rs1801282 (PPAR) needed tighter control treatment metformin (given the increased risk of failure for this treatment) and carriers of SNP rs5219 (KCNJ11) needed a higher dose of gliclazide. In a second phase, with the objective to identify and propose a set of potential SNPs candidates for future studies concerning the pharmacogenetics of DM2 in the Portuguese population 32 SNPs located in the coding region and not yet referenced in the EUR population were selected from the set of 98 SNPs. In addition to these, 15 SNPs not yet related to the DM2 were also identified in the 51 patients.

In summary, this study has enabled us to characterise the pharmacogenetics level the Portuguese population relatively to the DM2 and to propose a set of SNPs potential candidates for future pharmacogenetic studies of DM2 in the Portuguese population.

Símbolos e Abreviaturas

ABCA1	<i>ATP-binding cassette, sub-family A (ABC1), member 1</i>
ABCB1	<i>ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 1</i>
ABCC8	<i>ATP-Binding Cassette, Sub-Family C (CFTR/MRP), Member 8</i>
ADIPOQ	Adiponectina
ADRB3	<i>Adrenoceptor beta 3</i>
AFR	População africana
AMPK	<i>Adenosine monophosphate activated protein kinase</i>
AMR	População americana
ASN	População asiática
ATM	<i>Ataxia telangiectasia mutated</i>
ATP	Adenosina trifosfato
ADP	Adenosina difosfato
AVC	Acidente vascular cerebral
AUC	<i>Area under the curve</i>
BAM	<i>Binary Alignment Map</i>
Ca²⁺	Ião cálcio
CDKAL1	<i>CDK5 regulatory subunit associated protein 1-like 1</i>
CCDS	<i>Consensus Coding Sequences</i>
CML	<i>Candidate Mapping Locations</i>
CEU	População de residentes no Utah com ascendência no norte ou no ocidente da europa
Cmax	Concentração máxima
CYP	Citocromo
CYP1A1	Citocromo P450, família 1, subfamília A, polipeptídeo 1
CYP2C8	Citocromo P450, família 2, subfamília C, polipeptídeo 8
CYP2C9	Citocromo P450, família 2, subfamília C, polipeptídeo 9
CYP2C19	Citocromo P450, família 2, subfamília C, polipeptídeo 19
CYP2D6	Citocromo P450, família 2, subfamília D, polipeptídeo 6
CYP3A4	Citocromo P450, família 3, subfamília A, polipeptídeo 4
CYP3A5	Citocromo P450, família 3, subfamília A, polipeptídeo 5
DCCT	<i>Diabetes complications and control trial</i>
dNTP	Desoxirribonucleótidos
DG	Diabetes Gestacional
DM	Diabetes Mellitus
DM1	Diabetes Mellitus tipo1
DM2	Diabetes Mellitus tipo2
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DPP-4	Dipeptidil peptidase-4
FIN	População finlandesa
EMA	Agência Europeia do Medicamento

EUA	Estados Unidos da América
EUR	População europeia
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FINS	<i>Fasting serum insulin</i>
FPG	Glicose plasmática em jejum
G6PC2	<i>Glucose-6-phosphatase, catalytic, 2</i>
GBR	População britânica - Inglaterra e Escócia
GCKR	<i>Glucokinase (hexokinase 4) regulator</i>
Gemini	<i>GENome MINing</i>
GIP	Peptídeo insulínico glicose-dependente
GLP-1	<i>Glucagon-like peptide-1</i>
GLP1R	Recetor GLP-1
GLUT	Transportador de glucose
GWAS	Estudo de Associação ao genoma completo
HbA1c	Hemoglobina glicosilada
HDL	Lipoproteína de alta densidade
HGNC	<i>Hugo gene nomenclature committee</i>
Homa-IR	Modelo homeostático de resistência à insulina
HR	<i>Hazard ratio</i>
IBS	População ibérica espanhola
IDF	Federação Internacional da Diabetes
IGF2BP2	<i>Insulin-like growth factor 2 mRNA binding protein 2</i>
IGV	<i>Integrative Genomics Viewer</i>
IRS1	<i>Insulin receptor substrate 1</i>
IMC	Índice de massa corporal
K⁺	Ião potássio
KATP	Canais de potássio sensíveis ao ATP
KCNJ11	<i>Potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 11</i>
KCNQ1	<i>Potassium voltage-gated channel, KQT-like subfamily, member 1</i>
Kir6.2	Subunidade interior retificada do canal iónico de potássio
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LEP	Leptina
LPIN1	<i>Lipin 1</i>
LPL	Lipoproteína lipase
MADD	<i>MAP-kinase activating death domain</i>
Mg²⁺	Ião magnésio
MTNR1B	<i>Melatonin receptor 1B</i>
Na⁺	Ião sódio
NAMPT	<i>Nicotinamide phosphoribosyltransferase</i>
NEUROD1	<i>Neuronal differentiation 1</i>
NGS	Sequenciação de última geração (do inglês <i>Next-Generation Sequencing</i>)

NIH	<i>National Institutes of Health</i>
NOS1AP	<i>Nitric oxide synthase 1 (Neuronal) adaptor protein</i>
OMS	Organização mundial de saúde
OR	<i>Odds ratio</i>
PAX4	<i>Paired box 4</i>
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PINS	<i>Postprandial serum insulin</i>
PPG	Glicose pós-prandial
PPARα	<i>Peroxisome proliferator-activated receptor alfa</i>
PPARγ	<i>Peroxisome proliferator-activated receptor gamma</i>
PGC-1α	<i>Peroxisome proliferator-activated receptor gamma, coactivator 1 alpha</i>
PTPRD	<i>Protein tyrosine phosphatase, receptor type, D</i>
RAMP	<i>Receptor activity modifying protein</i>
RNA	Ácido ribonucleico
RETN	Resistina
RBP4	<i>Retinol binding protein 4</i>
SMRT	<i>Single Molecule Real Time</i>
SLC	Família transportadora de solutos
SLC22A1	<i>Solute carrier family 22 (organic cation transporter), member 1</i>
SLC22A2	<i>Solute carrier family 22 (organic cation transporter), member 2</i>
SLC29A4	<i>Solute carrier family 29 (equilibrative nucleoside transporter), member 4</i>
SLC30A8	<i>Solute carrier family 30 (zinc transporter), member 8</i>
SLC47A1	<i>Solute carrier family 47 (multidrug and toxin extrusion), member 1</i>
SLC47A2	<i>Solute carrier family 47 (multidrug and toxin extrusion), member 2</i>
SLCO1B1	<i>Solute carrier organic anion transporter family, member 1B1</i>
SNP	Polimorfismo de nucleótido único
SRR	<i>Serine racemase</i>
STK1/ LKB1	Serina - treonina cinase 11
SUR	Subunidade do recetor das sulfoniluréias
TCF7L2	<i>Transcription factor 7-like 2 (T cell specific, HMG-box)</i>
THADA	<i>Thyroid adenoma associated</i>
TMAP	<i>Torrent Mapping Alignment Program</i>
TSI	População Toscani – Itália
TVC	<i>Torrent Variant Caller</i>
TNF-α	<i>Tumor Necrosis Factor 1 alpha</i>
UCP2	<i>Uncoupling protein 2 (mitochondrial, proton carrier)</i>
UKPDS	<i>United Kingdom Prospective Diabetes Survey</i>
UTRs	<i>Untranslated region</i>
VCF	<i>Variant Calling File</i>
WFS1	<i>Wolfram syndrome 1 (wolframin)</i>
WHO	<i>Organização Mundial de Saúde (do inglês World Health Organization)</i>

Índice

Símbolos e Abreviaturas.....	vii
Índice	x
Índice de Figuras	xii
Índice de tabelas	xiii
Introdução.....	1
1. Diabetes Mellitus.....	1
1.1 Tipos de Diabetes	3
1.1.1 Diabetes Mellitus tipo 1.....	3
1.1.2 Diabetes Mellitus tipo 2.....	4
1.1.3 Diabetes Gestacional	5
2. Bioquímica da glicose	6
2.1 Pâncreas	6
2.2 Regulação bioquímica da glicose	6
3. Fisiopatologia da Diabetes.....	10
3.1 Complicações da diabetes.....	11
3.1.1 Complicações microvasculares.....	11
3.1.2 Complicações macrovasculares	13
4 Terapias para a DM2	14
4.1 Classes de antidiabéticos	15
5 Farmacogenética e farmacogenómica	21
5.1 Farmacogenética e diabetes mellitus tipo 2.....	23
6 Técnicas de Sequenciação de DNA.....	28
6.1 O projeto genoma humano	29
6.2 Next Generation Sequencing	30
6.2.1 Ion Torrent.....	30
6.3 <i>Whole exome sequencing</i>	33
6.4 SNPs	33
Objetivos.....	35
Material e métodos	37
1 Caracterização do grupo de doentes	37
2 Levantamento de genes e SNPs relacionados com farmacogenética	37
3 Sequenciação de exomas	38
3.1 Extração e avaliação da quantidade e qualidade do DNA.....	38
3.2 Sequenciação de exomas por NGS	39
3.3 Mapeamento	40

3.4 Identificação das Variantes (Variant calling)	41
4 Análise de SNPs	41
4.1 Pesquisa de SNPs já conhecidos.....	41
4.2 Pesquisa de SNPs candidatos em genes alvo	43
Resultados.....	45
1 Caracterização dos indivíduos em estudo.....	45
2 Caracterização terapêutica dos indivíduos em estudo	45
3 Sequenciação de exomas	46
4 Identificação de SNPs associados à farmacogenética da DM2	49
5 SNPs na região codificante do DNA referentes a populações EUR.....	51
6 SNPs na região codificante do DNA referentes a outras populações.....	56
7 Identificação de SNPs candidatos em genes alvo.....	62
8 Análise e correlação dos SNPs dos indivíduos da amostra em estudo com os fármacos antidiabéticos que lhes são administrados	66
Discussão.....	71
1 Levantamento e análise dos 98 SNPs identificados	71
2 SNPs referenciados em populações EUR e em região codificante	72
3 SNPs referenciados em populações não EUR e em região codificante na amostra em estudo.....	79
4 Análise dos potenciais SNPs identificados nos 6 genes alvo	80
5 Correlação dos SNPs dos indivíduos da amostra em estudo com os fármacos antidiabéticos que lhes são administrados	81
Conclusões.....	85
Perspectivas futuras	87
Bibliografia.....	89
Lista de anexos	109

Índice de Figuras

Figura 1- Previsão IDF para o ano 2035	2
Figura 2- Mecanismo de secreção da glicose	8
Figura 3- O recetor da insulina é um recetor tirosina - cinase.....	9
Figura 4- Complicações da diabetes	11
Figura 5- Terapias, locais e classes dos fármacos usados na terapia da Diabetes Mellitus tipo 2.....	21
Figura 6- Evolução ao longo do tempo do preço do genoma.....	29
Figura 7- Imagem esquemática da técnica sequenciação do aparelho da <i>Ion Torrent</i> , onde está representado a etapa de deteção	31
Figura 8- Metodologia utilizada no levantamento dos SNPs/genes associados à resposta aos fármacos da DM2.	38
Figura 9- Interface gráfica do <i>software</i> GEMINI.....	42
Figura 10- Interface gráfica do <i>software</i> IGV	43
Figura 11 - Distribuição terapêutica dos doentes em estudo.....	45
Figura 12- Distribuição dos 98 SNPs por tipo e localização.....	49
Figura 13- Distribuição dos 98 SNPs por população em estudo.....	50
Figura 14- Distribuição dos 143 SNPs identificados por tipo de SNP.....	62
Figura 15- Distribuição terapêutica para os 32 indivíduos no qual eram administrados antidiabéticos orais	67
Figura 16- Diagrama indicativo dos exomas onde foram observados os 4 SNPs associados às biguanidas.	68
Figura 17- Diagrama indicativo dos exomas onde foi relatado os 6 SNPs associados às sulfonilureias.	69

Índice de tabelas

Tabela 1- Fatores que podem alterar a resposta a um fármaco.	22
Tabela 2- Comparação das principais plataformas de sequenciação (NGS).	32
Tabela 3- Métricas da sequenciação individuais para cada exoma.	46
Tabela 4- Métricas da sequenciação individuais para cada exoma. (Continuação)	47
Tabela 5 - Caracterização dos SNPs identificados associados á farmacogenética da DM2 em populações EUR e em região exônica, relativamente ao fármaco.....	53
Tabela 6 - Distribuição genotípica e frequências alélicas na amostra em estudo e na população EUR, para os 16 SNPs relatados	54
Tabela 7- Número de SNPs por individuo da amostra em estudo, relativamente à classe de fármaco.	56
Tabela 8- SNPs associados à farmacogenética das sulfonilureias na região codificante do DNA e referentes a populações não caucasianas.....	58
Tabela 9- SNPs associados à farmacogenética das meglitinidas na região codificante do DNA e referentes a populações não EUR.	58
Tabela 10- SNPs associados à farmacogenética das biguanidas na região codificante do DNA e referentes a populações não EUR.	59
Tabela 11- SNPs associados á farmacogenética das tiazolidinedionas na região codificante do DNA e referentes a populações não EUR.....	60
Tabela 12- SNPs associados á farmacogenética dos inibidores da α -glicosidase na região codificante do DNA e referentes a populações não EUR.....	61
Tabela 13- SNPs associados á farmacogenética do GLP-1e análogos na região codificante do DNA e referentes a populações não EUR	61
Tabela 14- Distribuição dos diferentes tipos de SNP nos 6 genes selecionados.....	63
Tabela 15- SNPs não referenciados.....	64
Tabela 16- SNPs referenciados mas não associadas à farmacogenética da DM2.	65
Tabela 17- SNPs candidatos agrupados por classe de fármaco.....	66

Introdução

Atualmente a diabetes mellitus (DM) é uma das doenças com maior prevalência a nível mundial afetando milhões de pessoas. No futuro e segundo dados da federação internacional da diabetes (IDF) prevê-se um aumento significativo na incidência desta doença, o que levará a potenciais impacto negativos na economia, na saúde e na esperança média de vida (1, 2).

No decorrer das últimas décadas foram desenvolvidos tratamentos e terapias que proporcionam aos pacientes de DM uma melhor qualidade de vida. Todavia estes tratamentos são padronizados fazendo com que muitos pacientes tenham reações adversas ou não atinjam os objetivos do tratamento (2).

Reconhecendo a variabilidade genética e os diferentes estilos de vida entre indivíduos da mesma população e entre populações, verificou-se a necessidade de considerar estes fatores para que no futuro caminhemos em direção à medicina personalizada (2).

Face ao aumento significativo do número de casos de diabetes é urgente diminuir a lacuna entre o conhecimento derivado da pesquisa científica e a sua implementação a nível clínico, de modo a desenvolver ferramentas e novas estratégias de tratamento. O desenvolvimento verificado na atualidade nas plataformas de sequenciação (NGS), na bioinformática e nas áreas da farmacogenética, genómica, proteómica e metabolómica, constituem as premissas para a implementação da medicina personalizada (2, 3).

1. Diabetes Mellitus

A DM é uma doença crónica e não transmissível, que cada vez mais está presente na sociedade. A sua prevalência aumenta com a idade, afeta ambos os sexos e todas as idades (4). Esta doença ocorre tanto quando o pâncreas não produz insulina, ou produz em quantidade insuficiente, ou quando o organismo não utiliza a insulina produzida de forma eficiente (5).

Os níveis de glicose no sangue não são constantes, variam consoante as necessidades do organismo, normalmente entre valores de 70 a 110 mg/dl em jejum (6). A DM é caracterizada por níveis anormalmente elevados de glicose (hiperglicémia), sendo considerada a partir de concentrações de glicose (glicémia) em jejum ≥ 126 mg/dl, contudo indivíduos que tenham valores de glicémia em jejum ≥ 110 mg/dl e <126 mg/dl já são considerados pré-diabéticos (4). Com base na associação americana de diabetes a

doença pode ser identificada de três maneiras: níveis de glicémia em jejum (FPG), teste de tolerância à glicose e quantificação da hemoglobina glicada (HbA1c) (2).

As pessoas com DM correm o risco de desenvolver um conjunto de problemas de saúde que podem provocar incapacidade e morte. Os altos níveis de glicose no sangue (≥ 126 mg/dl em jejum) podem conduzir a complicações graves que atingem prevalentemente os olhos, nervos, rins, coração e vasos sanguíneos (1). Contudo é possível minimizar os danos e a manifestação destas complicações com um controlo rigoroso da hiperglicémia, da hipertensão arterial (elevados níveis de pressão sanguínea nas artérias), da dislipidémia (descontrolo nos níveis de lípidos no sangue), entre outros, bem como um controlo periódico dos órgãos mais sensíveis (olhos, nervos, rins, coração e vasos sanguíneos) e através da realização de atividade física regular (4).

Segundo um estudo de 2013 da organização IDF existem 382 milhões de pessoas com DM em todo o mundo, todavia 46% destes casos ainda não foram diagnosticados. A maioria das pessoas com DM tem idades compreendidas entre os 40 e os 59 anos, sendo esta faixa etária representada por 184 milhões de todos os casos da DM (1). Em 2013, esta doença provocou 5,1 milhões de mortes e representou um gasto total na saúde de 11% em todo o mundo. Nos próximos anos segundo dados da IDF e da organização mundial de saúde (OMS) os casos da DM terão um aumento significativo, conforme se pode verificar pelas previsões da IDF para 2035, que preveem um número de pessoas com DM a rondar 592 milhões (figura 1) (4, 7).

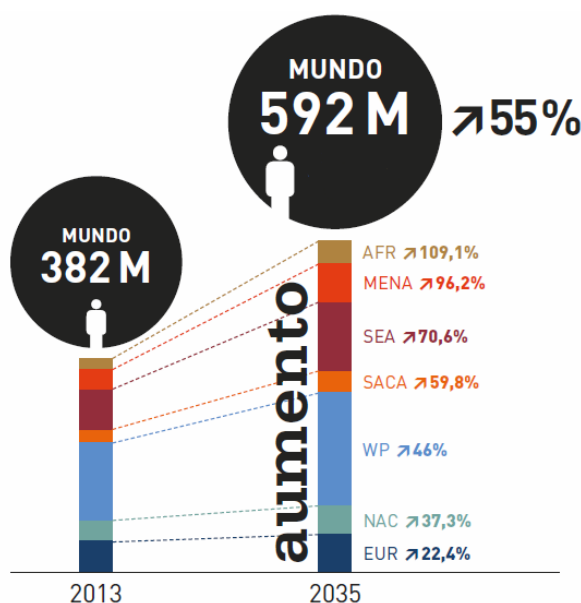


Figura 1- Previsão IDF para o ano 2035. Legenda: AFR-Africa; MENA- médio oriente e norte de África; SEA-Sudoeste Asiático; SACA- América central e do sul; WP- Pacífico ocidental; NAC- América do norte e Caraíbas; EUR- Europa. Figura adaptada de (1).

Em Portugal, a DM teve uma prevalência de 12,9% no ano de 2012, o que se traduziu em 4867 mortes e um gasto de 1963 € por doente (que corresponde em 2012, ao preço corrente por indivíduo segundo a IDF), representando cerca de 0,8 a 0,9 % do produto interno bruto e 8 a 9 % dos gastos anuais com a saúde (1, 4). A manifestação desta doença complexa que envolve elementos de origem genética, ambiental e fisiológica, deve-se a numerosos fatores, nomeadamente, a alimentação, exercício físico realizado, idade, número de casos familiares com DM entre outros. O aumento da prevalência da DM no futuro tem a ver com alterações no estilo de vida da sociedade, das quais se destaca o sedentarismo, o que resulta em obesidade, uma das principais causas da DM (5).

1.1 Tipos de Diabetes

A DM tem vários tipos, porém apenas três têm uma incidência significativa, sendo que os restantes são muito raros. Por este motivo serão apenas caracterizados os três tipos mais comuns, na medida em que representam quase a totalidade dos casos da diabetes. Contudo será dado mais ênfase à diabetes mellitus tipo 2, devido a ser a doença em estudo no trabalho.

1.1.1 Diabetes Mellitus tipo 1

A diabetes mellitus tipo 1 (DM1) representa 5 a 10% de todos os casos de DM, é uma doença causada por uma reação autoimune, no qual o sistema de defesa do organismo ataca as células produtoras da insulina (células β nos ilhéus pancreáticas de Langerhans), levando a uma condição chamada insulinitis (inflamação das células β pancreáticas). Esta condição leva a uma degradação gradual das células β pancreáticas ao longo dos anos. Os sintomas aparecem abruptamente quando 80-90% das células β pancreáticas foram destruídas. Neste ponto é necessário administrar insulina endógena para controlar os níveis de glicémia (8).

A hiperglicémia e os níveis elevados de corpos cetónicos são as marcas da DM1 quando não tratada. A hiperglicémia é causada pela síntese hepática descontrolada de glicose, em conjunto com a utilização periférica diminuta da glicose, que é provocada pela não produção ou pela produção diminuta da insulina. Os níveis elevados de corpos cetónicos característicos da DM1 são o resultado de uma maior mobilização dos ácidos gordos a partir do tecido adiposo, combinado com um aumento hepático nas oxidações dos ácidos gordos e com a síntese de 3-hidroxiacetato e acetoacetato (8).

Os sintomas da DM1 compreendem um aumento da produção de urina (poliúria), sede, fome constante, perda de peso, alterações na visão e fadiga (9).

As causas que levam à DM1 ainda não são conhecidas, sendo que atualmente o conhecimento existente não permite que a doença seja evitada. Atinge pessoas de qualquer idade, todavia é mais comum em crianças (este grupo etário refere-se a pessoas com idades compreendidas entre 0 e 14 anos) (1).

Segundo a organização IDF a prevalência da DM1 está a aumentar, embora as causas ainda não estejam bem claras, todavia pode dever-se às alterações ambientais, à alimentação nos primeiros tempos de vida e a infeções virais. A DM1 afeta cerca de 5-10% da população mundial. Em Portugal a sua incidência é de 13,2 em cada 100 mil habitantes na faixa etária dos 0 aos 14 anos (1, 10).

1.1.2 Diabetes Mellitus tipo 2

A DM2 (ou também conhecida como diabetes não insulino dependente) constitui a variante mais comum da diabetes, sendo a sua prevalência de 85% a 95% de todos os casos de DM (1). Esta doença ocorre mais frequentemente em indivíduos com idades superiores a 40 anos, é caracterizada por uma utilização ineficaz da insulina por parte do organismo (resistência à insulina) e por uma redução na produção da insulina, ou frequentemente pela combinação destes dois parâmetros (4, 5).

A resistência à insulina é a diminuição na capacidade de resposta dos tecidos alvo, nomeadamente, fígado, tecido adiposo e muscular, e é caracterizada pela produção descontrolada de glicose hepática e pela diminuição na absorção de glicose nos tecidos adiposo e muscular. Estas alterações fazem com que organismo não responda de forma adequada às concentrações da insulina circulantes (8). A obesidade é a causa mais comum de resistência à insulina, porém a maioria das pessoas obesas com resistência à insulina não se tornam diabéticos (8). Na ausência de defeito nas células β pancreáticas a resistência à insulina é compensada com maiores níveis de síntese da insulina. Isto sugere que acumulação de gordura é importante no desenvolvimento da resistência à insulina. O tecido adiposo não é apenas um órgão onde é armazenada energia sob forma de ácidos gordos, também constitui um órgão secretor onde são secretados várias substâncias importantes no desenvolvimento desta resistência (8). Além disso, os altos níveis de ácidos gordos livres, fruto da obesidade também constituem um fator para o desenvolvimento da resistência à insulina (8).

A DM2 resulta da incapacidade das células β pancreáticas de darem resposta aos níveis elevados de glicose no sangue. Embora inicialmente as células β pancreáticas consigam manter os níveis de glicose face à resistência à insulina, com o tempo estas células vão-se tornando disfuncionais, não secretando insulina suficiente para controlar os níveis de hiperglicémia (8).

As principais alterações metabólicas verificadas em indivíduos com DM2 são a hiperglicémia provocada pela síntese hepática descontrolada da glicose, combinada com utilização periférica diminuta de glicose, e também dislipidémia, causada por uma redução na catálise da lipoproteína lípase no tecido adiposo e muscular dos quilomicra e das lipoproteínas de muito baixa densidade, o que conseqüentemente leva a níveis plasmáticos elevados de ambos compostos. Além disso, verifica-se uma redução nos níveis de lipoproteínas de baixa densidade (8).

O tratamento da DM2, ao contrário da DM1, não depende necessariamente da insulina exógena podendo apenas necessitar da insulina no caso de não se conseguir controlar a hiperglicémia com uma alimentação adequada, exercício físico e antidiabéticos orais (11).

Os sintomas da DM2 podem ser semelhantes aos da DM1, mas geralmente são menos acentuadas, o resultado disso é que a doença pode progredir lentamente e passar despercebida durante inúmeros anos, sendo apenas diagnosticada devido à manifestação de algum tipo de complicação associada ou através de um diagnóstico de rotina (sangue e urina) que quantifique a glicose (9, 11).

Esta doença multifatorial associa uma componente ambiental a uma forte componente genética (6). Os fatores que mais contribuem para o aparecimento desta anomalia são a obesidade (como referido anteriormente), a má alimentação, o sedentarismo, a idade, o grupo étnico e o histórico familiar da doença (4).

O aumento da prevalência da DM2 é associado no presente a rápidas mudanças socioculturais, ao envelhecimento da população, ao crescente urbanismo, ao sedentarismo, às alterações alimentares e outros comportamentos de risco (4).

1.1.3 Diabetes Gestacional

A diabetes gestacional (DG) ocorre durante a gravidez, e habitualmente, desaparece após a gravidez (5). A DG refere-se a qualquer grau de anomalia documentada no metabolismo da glicose que ocorra pela primeira vez no decorrer da gravidez (5).

Os sintomas da DG são semelhantes aos da DM2. A DG geralmente é diagnosticada através de exames realizados durante a gravidez, e raramente por relato de alguns dos sintomas da DM (9).

A sua incidência é de 1 em cada 20 grávidas, sendo que a ocorrência de DG durante a gravidez constitui um fator de risco para as mães pois terão uma maior preponderância para desenvolver DM2 no futuro, e para os recém-nascidos que poderão sofrer de algum tipo de complicação (4, 5).

2. Bioquímica da glicose

2.1 Pâncreas

O pâncreas é um órgão glandular, que desempenha uma função secretora exócrina e uma função secretora endócrina, sendo que a massa da porção exócrina representa 99% da massa do pâncreas (12, 13). A função secretora exócrina do pâncreas desempenha um papel importante na digestão alimentar, que consiste na produção e liberação do suco pancreático (contem várias enzimas produzidas no pâncreas que intervêm no processo digestivo) para o intestino delgado (região do duodeno). A função secretora endócrina do pâncreas tem um papel fundamental no controle da glicemia, envolve a produção de um conjunto de hormonas nos ilhéus de Langerhans (pequenas glândulas endócrinas do pâncreas que comportam vários tipos de células), tais como a glicagina, produzidos nas células α , a insulina e amilina, produzidas nas células β , somatostatina e gastrina, produzidas nas células δ e os polipeptídeos pancreáticos, produzidos nas células PP (12, 13).

2.2 Regulação bioquímica da glicose

O armazenamento e a posterior liberação de nutrientes constituem um mecanismo homeostático que sustem nutricionalmente as células na ausência de alimentação, evitando assim a ingestão de alimentos continuamente (12). Este equilíbrio mantém-se normalmente entre uma concentração de glicose de 70 a 110 mg/dl mesmo após uma refeição. O aumento da concentração de glicose ocorre de três maneiras, através da ingestão de alimentos, através da degradação de glicogénio e através da síntese hepática de glicose (6).

Numa refeição, ingerimos quantidades de nutrientes variáveis, parte dos quais são hidratos de carbono. Os hidratos de carbono podem ser monómeros simples (glicose) ou moléculas mais complexas que necessitam de hidrólise por enzimas específicas (α -

glicosidase) para serem absorvidos (5, 14). A absorção destes monómeros não ocorre diretamente pela membrana, devido ao facto de serem compostos polares e a parede do intestino ser apolar, sendo assim necessitam de proteínas transportadoras especializadas para atravessar a parede do intestino, nomeadamente, a família de proteínas transportadores de glicose (GLUT) (6, 14). Desta família de proteínas as GLUT2 e GLUT5 são as mais abundantes no intestino (6).

A glicose é transportada para a corrente sanguínea pelas proteínas transportadoras da família GLUT e conduzida por difusão facilitada para o interior das células β pancreáticas, pela proteína transportadora da família GLUT1, levando ao aumento da concentração de glicose no interior da célula (15). A glicose é utilizada pela célula como precursor na produção de adenosina trifosfato (ATP), nomeadamente, durante a respiração celular (glicólise, ciclo de Krebs e cadeia respiratória) (6, 15).

O ATP produzido desencadeia o fecho dos canais de potássio sensíveis ao ATP (KATP) impedindo a saída dos iões de potássio (K^+) do interior das células β pancreáticas. Os canais KATP são constituídos por hétero-octámeros compostos por 4 subunidades de recetores de sulfoniluréias (SUR1) codificadas pelo gene *ATP-Binding Cassette, Sub-Family C (CFTR/MRP), Member 8* (ABCC8) e 4 subunidades interiores retificadas do canal iónico de potássio (Kir6.2) codificadas por o gene *potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 11* (KCNJ11) (16). O entrave à saída dos iões potássio (K^+) promove a entrada dos iões sódio (Na^+), e estas duas ações em conjunto provocam a despolarização da membrana celular e conseqüentemente a abertura dos canais de cálcio (Ca^{2+}), permitindo a afluência de iões Ca^{2+} para o interior das células β pancreáticas. O aumento dos iões Ca^{2+} no interior da célula provoca a libertação da insulina por exocitose (figura 2) (6, 15). Durante a libertação da insulina é libertada uma outra hormona, a amilina, que tem como função suprimir a produção endógena de glicose no fígado (12).

Embora a glicose seja a molécula mais influente no estímulo da secreção da insulina, existem outras moléculas, neste caso duas hormonas: o *Glucagon-like peptide-1* (GLP-1) e o peptídeo insulínico dependente glicose (GIP) que também são importantes no estímulo à secreção da insulina (15).

O GLP-1 é libertado após uma refeição pelas células intestinais, e flui rapidamente para a corrente sanguínea estimulando as células β pancreáticas a produzir insulina, através da indução da produção do ATP, que inibe os canais KATP num processo análogo ao explicado anteriormente (15). O GIP também é libertado nos intestinos e tem um efeito

semelhante ao GLP-1, sendo estes compostos denominados incretinas (GIP e GLP-1) (15).

As células β pancreáticas apresentam duas fases distintas de secreção da insulina (figura 2), na primeira fase a insulina libertada tem origem nos grânulos da insulina armazenados no citoplasma da célula (permite uma rápida resposta) e na segunda fase a insulina libertada tem origem na síntese celular de insulina (6).

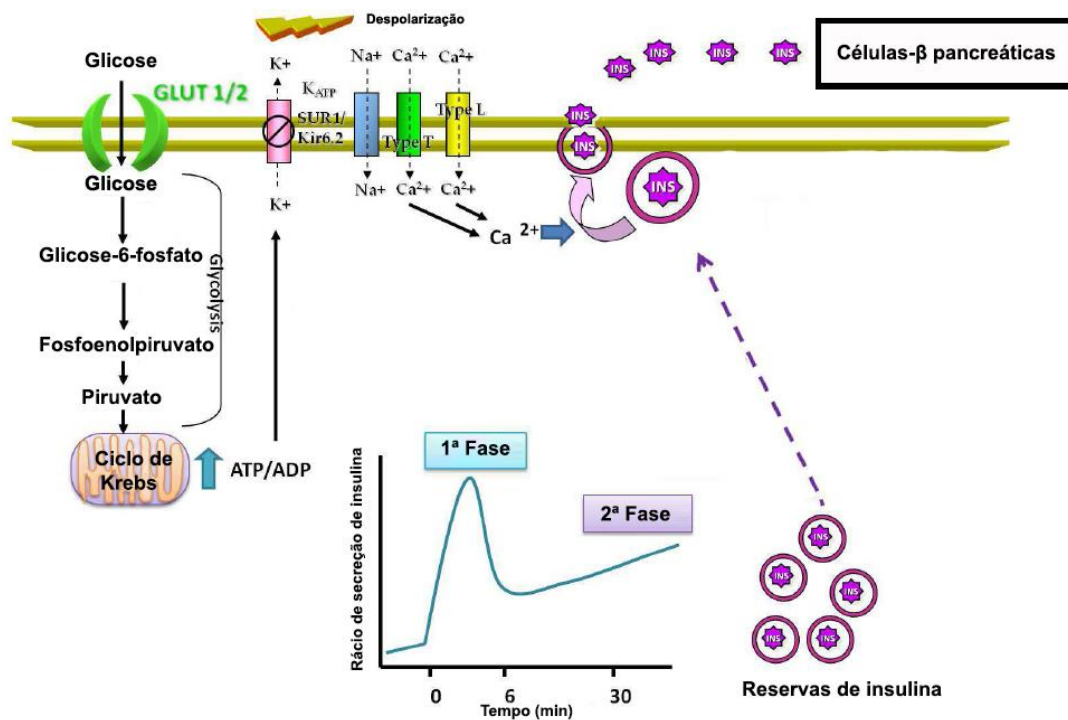


Figura 2- Mecanismo de secreção da insulina. A glicose entra na célula utilizando transportadores de glicose (GLUT 1/2), e através do processo de respiração celular é convertida em parte em ATP. Esta produção de ATP inibe os canais K_{ATP} que impedem a saída de K⁺. Esta ação induz a entrada de Na⁺ e consequentemente a de Ca²⁺. A entrada de Ca²⁺ provoca a libertação da insulina por exocitose. O gráfico representado representa as fases de libertação da insulina. Figura adaptada de (15).

O fígado e outros tecidos de armazenamento tais como o músculo-esquelético e tecido adiposo são as células alvo da insulina (12). A insulina libertada das células β pancreáticas liga-se a recetores específicos na membrana das células alvo. Estes recetores são constituídos por um par de subunidades α extracelulares onde se liga a insulina e um par de subunidades β envolvidas na membrana que contem domínios da enzima tirosina cinase e locais de ligação de ATP (figura 3). A insulina ao ligar-se a estes recetores promove a absorção de glicose nas células que expressam a proteína transportadora GLUT 4, aumentando a actividade e o número destes transportadores na superfície da célula (6, 12). Todavia nem todas as células dependem exclusivamente da insulina para absorver glicose, nomeadamente, as células dos tecidos do fígado, mucosas intestinais, rins e células do sistema nervoso (6). O fígado, devido a não necessitar da insulina para

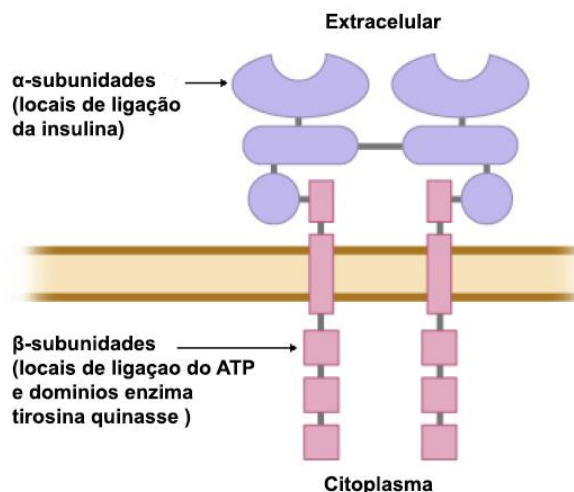


Figura 3- O recetor da insulina é um recetor tirosina - cinase composto por um par de subunidades α e um par de subunidades β . Figura adaptada de (6).

absorver glicose, constitui um importante meio na sua regulação, removendo grandes quantidades de glicose da corrente sanguínea, de modo a que após uma refeição os níveis de glicose nunca aumentem acima de 110 mg/dl em pessoas não diabéticas (6, 15). Os tecidos musculares e células adiposas, ao contrário do fígado, necessitam da insulina para absorver glicose. A glicose absorvida pelas células é usada em parte para produzir energia e alguns precursores envolvidos noutras vias metabólicas. No caso dos tecidos musculares e fígado o excesso de glicose é usado para produzir glicogénio. Reabastecidas as reservas de glicogénio, a parte sobranete é usada pelas células do tecido adiposo como substância de reserva na forma de ácidos gordos (6).

A insulina, além de estimular a absorção de glicose, também suprime a secreção da hormona glicagina, que é uma das hormonas que se opõem à ação da insulina, tendo um papel muito importante em situações de hipoglicémia mobilizando a glicose do fígado e estimulando a gliconeogénese (processo de biossíntese de glicose) e glicogenólise (processo de quebra do glicogénio em moléculas de glicose) de forma a manter a homeostasia. Inicialmente a glicose libertada do fígado provém da hidrólise do glicogénio e numa fase posterior a glicose provém do metabolismo das proteínas e dos ácidos gordos (12).

O ciclo de regulação da glicose é complexo, estando envolvidos diferentes órgãos, pelo que uma pequena alteração no seu funcionamento pode provocar DM entre outras complicações.

3. Fisiopatologia da Diabetes

As pessoas que têm DM apresentam um risco acrescido de desenvolver uma série de problemas de saúde que podem provocar incapacidade ou até a morte. Um dos problemas que contribui para o desenvolvimento destas complicações inerentes à DM é o facto de 46% dos casos da DM ainda não estar diagnosticado. Isto constitui um enorme problema, pois impossibilita que sejam tomadas todas as precauções, que permitam minimizar ou retardar o aparecimento das complicações associadas à DM (1).

Os níveis elevados de glicose no sangue característicos da doença DM podem resultar em lesões, sendo os rins, olhos, nervos periféricos e o sistema cardiovascular os órgãos mais afetados (4). A fisiopatologia das complicações da DM é algo complexa, pois depende de fatores ambientais, fisiológicos e genéticos (17).

Na DM1 o não controlo, pode progredir rapidamente para coma e morte, sendo muitas vezes diagnosticada em pacientes que apresentam pela primeira vez cetoacidose (elevados níveis de produtos da metabolização das gorduras no sangue) diabética aguda (12). Na DM2 a cetoacidose aguda não é tão frequente uma vez que os pacientes ainda produzem insulina, mesmo que de uma forma diminuta (12).

O controlo inadequado do nível de glicémia em pessoas diabéticas constitui um dos principais fatores de risco a longo prazo ao desenvolvimento das complicações características da DM. Outros fatores incluem doenças como a hipertensão e dislipidémia. Estes fatores estão na origem das complicações microvasculares (afetam pequenos vasos sanguíneos) e macrovasculares (afetam os grandes vasos sanguíneos) características da DM (17). As alterações causadas pela hiperglicémia no metabolismo proteico e lipídico podem explicar em parte o início de algumas complicações (17).

Durante as últimas décadas foram desenvolvidos vários esforços para melhorar a nossa compreensão dos mecanismos subjacentes ao desenvolvimento a longo prazo das complicações da DM2, permitindo assim desenvolver estratégias que minimizem o aparecimento dessas complicações (18). Alguns destes estudos são apresentados no parágrafo seguinte.

Diabetes complications and control trial e Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications (DCCT/ EDIC) é um estudo clínico multicêntrico conduzido entre 1983-2005 (19). Este estudo consistiu na observação dos efeitos do controlo rigoroso dos níveis de glicose no desenvolvimento das complicações microvasculares, nomeadamente, a retinopatia, neuropatia e nefropatia (20). *United Kingdom Prospective Diabetes Survey*

(UKPDS) é um outro estudo, porém relativo a DM2 que demonstra quantitativamente os efeitos prejudiciais a longo prazo da hiperglicemia e da hipertensão no desenvolvimento das complicações microvasculares e macrovasculares (este estudo realizou-se durante o período de 1977 - 1997) (12, 21). Outros estudos que avaliaram os efeitos do controle glicêmico em indivíduos com DM2 foram Kumamoto, ACCORD e ADVANCE (22-24).

Os resultados destes estudos demonstraram benefícios no controle rigoroso a longo prazo na progressão e no aparecimento das complicações associadas a DM.

3.1 Complicações da diabetes

Nos dias de hoje é utilizada uma combinação de fármacos e terapias de forma a prevenir e controlar os níveis de glicemia provocados pela DM. Este controle permite reduzir a probabilidade do desenvolvimento das complicações da DM (25).

As complicações da DM causadas por a hiperglicemia podem-se dividir em complicações macrovasculares (doença arterial coronária, doença arterial periférica e acidente vascular cerebral) e complicações microvasculares (nefropatia, neuropatia e retinopatia) (figura 4) (25)

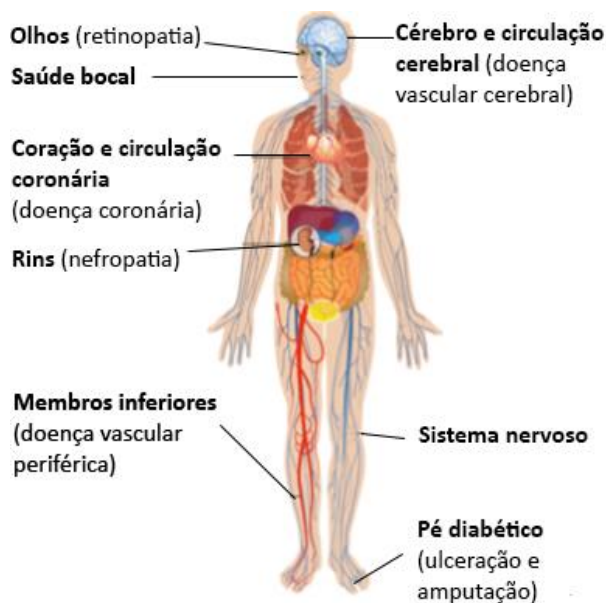


Figura 4- Complicações da diabetes. Figura adaptada de (1).

3.1.1 Complicações microvasculares

a) Retinopatia

As doenças oftalmológicas são das complicações mais temidas das pessoas com DM, e também das mais evitáveis. Atualmente a DM constitui a causa mais comum de

cegueira na faixa etária dos 30 aos 69 anos (1). A retinopatia é uma complicação oftalmológica e a complicação microvascular mais comum entre pessoas diabéticas, afeta a retina e mácula ou ambos podendo levar à perda de visão parcial ou nos casos mais graves à perda de visão total (25).

A retinopatia diabética engloba alterações fisiológicas como a perda de pericitos (células endoteliais dos pequenos vasos sanguíneos), espessamento da membrana basal dos capilares, aumento da permeabilidade das células endoteliais e formação de microaneurismas (dilatação dos vasos sanguíneos) (25).

As condições de hiperglicemia a que as pessoas diabéticas estão sujeitas frequentemente podem causar insuficiência no fluxo sanguíneo da retina, aumento inflamatório das células que aderem aos vasos sanguíneos da retina e obstrução dos capilares, o que pode resultar em hipoxia (baixa concentração de oxigênio) e danos para a retina (25).

A identificação precoce da retinopatia permite que sejam aplicados os tratamentos necessários, que permitam minimizar a progressão da doença (11).

b) Nefropatia

Nefropatia é uma patologia renal comum nas pessoas diabéticas. Os primeiros sintomas desta doença envolvem alterações no espessamento da membrana basal glomerular, hiper-filtração glomerular, expansão da matriz extracelular, aumentos da secreção de albumina que progridem para esclerose e insuficiência renal (25).

A doença é causada por danos nos vasos sanguíneos dos rins e leva a uma redução da eficiência parcial ou total desse órgão (1).

Os fatores de risco para nefropatia englobam hiperglicemia, duração da diabetes, tabagismo, dislipidemia, hipertensão arterial e obesidade (25).

c) Neuropatia

Os níveis elevados de glicose no sangue característicos de indivíduos diabéticos podem causar danos no sistema nervoso de todo o corpo (neuropatia) (1).

A neuropatia é uma patologia que afeta aproximadamente metade das pessoas diabéticas, os principais sintomas englobam a perda de sensibilidade que permite que alguns ferimentos passem despercebidos e levem ao aparecimento de outras patologias, nomeadamente, doença do pé diabético, infecções graves, úlceras e amputações (4).

Os fatores de risco desta doença englobam o controle glicêmico inadequado, idade, duração da diabetes, tabagismo, dislipidemia, hipertensão, presença de doença cardiovascular e a presença de cetoacidose grave (25).

As alterações fisiológicas características desta doença englobam espessamento da membrana basal, perda dos pericitos, perda de microfilamentos, diminuição do fluxo sanguíneo capilar para a fibra C, estes fatores levam à diminuição da perfusão do nervo e hipóxia endoneural (25).

3.1.2 Complicações macrovasculares

a) Doenças cardiovasculares

As doenças cardiovasculares são a causa mais comum de morte em pessoas diabéticas, representando cerca de 70% das mortes, porém estimativas indicam que no futuro serão 80 % (25).

As pessoas com DM tem 4 vezes maior risco de ter doenças cardiovasculares do que as pessoas sem DM, e 5 vezes maior risco para infarto do miocárdio (25).

Os fatores de risco para esta doença envolvem idade, obesidade, tabagismo, dislipidemia e hipertensão. Estes fatores juntamente com a predisposição genética de cada indivíduo para doença podem aumentar o risco para as doenças cardiovasculares (25).

b) Acidente vascular cerebral

O acidente vascular cerebral (AVC) é a terceira principal causa de morte nos Estados Unidos. O risco em pessoas diabéticas é cerca duas a quatro vezes maiores de terem um AVC (25).

A presença da DM afeta a circulação vascular cerebral, provocando um aumento no risco intracranial e extracranial de aterosclerose. Outros fatores que contribuem para o aumento do risco de AVC são a hiperglicemia, hipertensão, dislipidemia, insuficiência cardíaca, fibrilação atrial e níveis elevados de marcadores crônicos inflamatórios (25).

c) Doença Arterial Periférica

A doença arterial periférica afeta as artérias excetuando a artéria aorta, artérias cerebrais e artérias coronárias. Esta doença pode afetar várias regiões do corpo, é caracterizada pela diminuição da irrigação sanguínea no órgão afetado, pode resultar em úlceras ou na amputação do órgão afetado (25).

Os principais fatores de risco da doença arterial periférica são a DM, a duração da diabetes, a hiperglicémia, a hipertensão, o tabagismo, a obesidade, os níveis elevados de fibrinogênio sérico, dislipidémia, histórico de doenças cardiovasculares e a inatividade física (25).

4 Terapias para a DM2

O primeiro tratamento descrito para a DM foi registado no papiro de Ebers há 3500 anos, consistia numa mistura de ossos, grãos de trigo, areia, terra e água (5).

Ao longo da história foram desenvolvidos vários tipos de diagnóstico e de tratamentos. Porém, apenas em 1921 e considerado um marco histórico no tratamento da DM, foi isolado um preparado que continha insulina (a partir do pâncreas de um cão), que quando administrado a um cão diabético reduziu os níveis de açúcar no sangue. Em 1922 este tratamento foi empregue em humanos, todavia constituía um método muito dispendioso que envolvia a morte de muitos animais, pois a insulina era isolada a partir de pâncreas de animais. Em 1978 a produção da insulina sofre uma revolução, sendo produzida recorrendo organismos geneticamente modificados através de técnicas de ácido desoxirribonucleico (DNA) recombinante (6, 18, 26).

No presente são vários os tratamentos utilizados no controlo da DM, sendo que a sua administração é realizada consoante a variante da DM que o individuo é portador e consoante a causa que está por detrás da doença. Os portadores DM1 utilizam como tratamento insulina que pode ser administrada isoladamente ou combinada com outros fármacos antidiabéticos. Os portadores DM2 ao contrário dos DM1 não são insulino-dependentes, ou seja, na maioria das vezes não necessitam da insulina, sendo o seu tratamento realizado recorrendo a antidiabéticos orais. Estes antidiabéticos orais podem ser usados de forma isolada ou em associação, tanto com outros antidiabéticos orais como com insulina (5).

A associação americana de diabetes define vários objetivos para uma terapia da DM que incluem HbA1c <7,0%, pressão arterial sistólica <130 mmHg e que não provoquem aumento no peso (27). Nas secções seguintes são descritas as classes de antidiabéticos orais utilizadas atualmente e apresentado um esquema resumo (figura 5) onde são indicadas as terapias, classes dos fármacos utilizados em cada terapia e os locais alvo onde cada terapia atua.

4.1 Classes de antidiabéticos

a) Sulfonilureias

As sulfonilureias são fármacos usados no tratamento da DM2, estando disponíveis desde do meado do séc. XX. Tolbutamida, glibenclamida (gliburida), gliclazida e glimepirida são os representantes mais utilizados desta classe de fármacos e constituem uma parte importante do tratamento com antidiabéticos orais (28). Em Portugal são atualmente comercializadas as seguintes sulfonilureias: glibenclamida, gliclazida, glimepirida e glipizida (29).

A limitação na quantidade da insulina verificada em muitos diabéticos pode ser aumentada pela utilização destes fármacos segratogogos, através do estímulo à libertação da insulina a partir das células β pancreáticas. Esta ação provoca um aumento dos níveis da insulina circulante constituindo um meio de superar a resistência à insulina (12).

A nível molecular, as sulfonilureias ligam-se com elevada afinidade à subunidade SUR1 (codificada pelo gene ABCC8) e com reduzida afinidade à subunidade Kir6.2 (codificada pelo gene KCNJ11) do canal KATP, levando conseqüentemente à inibição deste canal, de forma similar ao que acontece de forma natural, em que o aumento do ATP proveniente do metabolismo da glicose (que provoca um deslocamento positivo do rácio ATP (inibidor dos KATP)/Mg²⁺-ADP (ativador dos KATP)) o que leva à inibição do canal KATP. Conseqüentemente, a inibição deste canal desencadeia um conjunto de processos que levam à despolarização da membrana e à entrada dos iões Ca²⁺ para o interior das células β pancreáticas, o que resulta na libertação por exocitose das vesículas da insulina acumulada no interior da célula (12, 30).

Estes fármacos são administrados oralmente e são metabolizados no fígado principalmente pela enzima metabolizadora do citocromo P450, família 2, subfamília C, polipeptídeo 9 (CYP2C9) (31). A terapia é iniciada com uma dose baixa e escalonada até atingir a dose ótima. O seu principal efeito adverso é a hipoglicémia. Além disso, está associado a obesidade. Geralmente as sulfonilureias são eficazes, seguras e baratas, e junto com o fármaco metformina da classe das biguanidas constituem um dos pilares do tratamento da DM2 (12).

b) Meglitinidas

As meglitinidas também conhecidas como glinidas são uma classe de fármacos secretagogos. Esta classe de fármacos ainda é bastante recente quando comparada com a

classe das sulfonilureias, sendo o primeiro fármaco (repaglinida) aprovado pela Agência Europeia do Medicamento (EMA) e pela *Food and Drug Administration* (FDA) apenas em 2001 e 1997 respectivamente. Atualmente, esta classe de fármacos é composta por dois tipos de fármacos, a repaglinida e nateglinida, sendo que em Portugal ambas as drogas se encontram aprovadas (28, 29).

O mecanismo desta classe de fármacos é idêntico ao das sulfonilureias, ou seja, estes fármacos ligam-se às subunidades SUR1 dos canais KATP, presentes na membrana das células β pancreáticas, causando a inibição do fluxo de potássio, o que desencadeia um conjunto de mecanismos (explicados para a classe das sulfonilureias) que levam à libertação de insulina por exocitose (28). Embora as sulfonilureias e meglitinidas se liguem à subunidade SUR1 do canal KATP e atuem de uma forma idêntica, o que distingue estas classes de fármacos é apresentarem locais de ligação distintos, fazendo com que alterações nos genes (ABCC8 e KCNJ11) que codificam o canal KATP influenciem de maneira diferente estas duas classes de fármacos (12, 28).

Estes fármacos têm um tempo de ação muito curto, pois após a sua absorção são rapidamente metabolizados no fígado por enzimas da superfamília dos citocromos. A nateglinida é metabolizada principalmente pelo CYP2C9 e em fração menor pelos citocromo P450, família 3, subfamília A, polipeptídeo 4 (CYP3A4) e citocromo P450, família 2, subfamília D, polipeptídeo 6 (CYP2D6). A repaglinida é metabolizada pelo CYP3A4 e citocromo P450, família 2, subfamília C, polipeptídeo 8 (CYP2C8) (28).

c) Tiazolidinedionas

As tiazolidinedionas, também conhecidas como glitazonas, constituem uma classe dos medicamentos insulino sensibilizadores. As tiazolidinedionas são substâncias que se ligam ao fator de transcrição *peroxisome proliferator-activated receptor gamma* (PPAR γ) ativando-o (31). O PPAR γ é expresso difusamente em humanos, encontrando-se predominantemente nos adipócitos, liga-se ao DNA e regula a transcrição dos genes envolvidos no crescimento celular, na diferenciação e no metabolismo, em resposta a hormonas lipofílicas, ácidos gordos e seus metabolitos (32).

As tiazolidinedionas melhoram a ação da insulina no tecido alvo, não afetando diretamente a secreção da insulina, ou seja, promovem a absorção de ácidos gordos, através do seu armazenamento em tecido adiposo (12). A redução das concentrações de ácidos gordos e lípidos circulantes disponíveis no fígado e nos músculos permitem uma maior sensibilidade por parte dos tecidos alvos da insulina e uma supressão na produção

de glicose no fígado. Para além disso, as tiazolidinedionas tem uma infinidade de outros usos terapêuticos, incluindo um efeito anti-inflamatório, melhoria da hipertensão arterial ou microalbuminúria e esteatose hepática (31).

Atualmente, esta classe é representada por dois fármacos, a rosiglitazona e a pioglitazona. Estudos recentes mostram que a utilização da rosiglitazona pode provocar efeitos secundários graves (aumentando o risco de infarto do miocárdio). Devido a estes efeitos a EMA suspendeu a sua comercialização enquanto a FDA apenas restringiu o acesso. Assim sendo a única tiazolidinediona que está disponível comercialmente é a pioglitazona que apresenta efeitos mais favoráveis quando comparados à rosiglitazona (31). Todavia a utilização prolongada (mais de um ano) da pioglitazona pode provocar aumento do peso, retenção de líquidos, insuficiência cardíaca e risco de fraturas ósseas (12).

As tiazolidinedionas são metabolizadas no fígado por enzimas da superfamília dos citocromos, a rosiglitazona e a pioglitazona são metabolizadas predominantemente por o CYP2C8, a enzima CYP2C9 tem um pequeno papel no metabolismo da rosiglitazona e as enzimas CYP3A4 e citocromo P450, família 1, subfamília A, polipeptídeo 1 (CYP1A1) têm também um pequeno papel no metabolismo da pioglitazona (28).

d) Biguanidas

A metformina é no presente a única biguanida aprovada, todavia no passado já foram utilizadas outras biguanidas, nomeadamente, a fenformina e biformina, que foram retiradas de circulação devido aos seus efeitos colaterais. O fármaco metformina é recomendado como primeira linha de terapia a nível mundial no tratamento da DM2, pois não leva a hipoglicémia, sendo o fármaco relativamente seguro (28, 31).

Embora a metformina já esteja descrita desde 1922 o mecanismo de ação ainda não está compreendido. Acredita-se que a metformina aumente a proporção do rácio $ATP/Mg^{2+}ADP$, através da inibição do complexo 1 da cadeia respiratória e a consecutiva ativação do *adenosine monophosphate activated protein kinase* (AMPK), que é uma enzima importante na regulação celular do metabolismo lipídico e da glucose (31, 33). O mecanismo potencial de fosforilação do AMPK por metformina inclui a proteína serina-treonina cinase 11 (STK1/LKB1). Estudos recentes indicam também que a metformina pode inibir a gliconeogénese de uma forma independente do AMPK (31).

Os principais efeitos da metformina englobam inibição da gliconeogénese hepática, da síntese de ácidos gordos e do colesterol. Além disso, a metformina melhora

a absorção da glicose no músculo periférico (mecanismo responsável por este efeito pouco compreendido) e aumenta a sinalização da insulina (ou seja, aumenta, a atividade do recetor da insulina) (12).

Os efeitos adversos da metformina englobam adipose láctea, náuseas, distensão abdominal e diarreia (12).

A metformina não é metabolizada mas é excretada inalterada na urina por secreção tubular ativa. Existe uma grande variação na depuração renal da metformina, sendo que os fatores genéticos contribuem com mais de 90% (12).

e) Inibidores da α -glicosidase

Os inibidores da α -glicosidase são compostos análogos a hidratos de carbono que inibem competitivamente as enzimas α -glicosidase no intestino delgado. Estas enzimas encontram-se envolvidas na hidrólise de hidratos de carbono complexos. A inibição destas enzimas afeta a catálise dos hidratos de carbono complexos aumentando o tempo de absorção da glicose nos intestinos. Isto provoca uma menor subida da glicémia e consequentemente uma menor necessidade da insulina, permitindo uma menor insulinoresistência e um melhor funcionamento por parte das células que produzem insulina (28, 34). Estes inibidores são eficazes quando apenas tomados às refeições, podem ser administrados em monoterapia ou como terapia adjuvante. Além disso, não representam um risco de hipoglicemia nem estão associados a alterações no peso, os seus principais efeitos adversos envolvem flatulência, distensão abdominal, desconforto abdominal e diarreia (34).

No presente existem três fármacos inibidores comercializados o miglitol, o voglibose e a acarbose. Todavia em Portugal apenas a acarbose é comercializada (28, 29).

f) GLP-1 e análogos

Os fármacos análogos ao *Glucagon-like peptide-1* (GLP-1) são recentes, o primeiro fármaco comercializado deste grupo foi a exenatida que chegou ao mercado em 2005. Um outro fármaco desta classe é a liraglutide, aprovado pela EMA em 2009 e pela FDA em 2010 (28). Estes fármacos tem um efeito semelhante ao GLP-1 endógeno (péptido secretado no intestino pelas células L). Ligam-se ao recetor GLP-1 (GLP1R) e estimulam a secreção de insulina e suprimem a libertação de glicagina, todavia apenas quando os níveis de glicose são altos, além de retardarem a absorção intestinal de glicose (27, 35). O mecanismo de ação destes fármacos é idêntico ao do GLP-1, este mecanismo

envolve o aumento da secreção de insulina num processo idêntico ao induzido pela glicose (mecanismo explicado anteriormente na secção regulação bioquímica da glicose) (36).

A vantagem destes fármacos (GLP-1 e análogos) em relação ao GLP-1 humano é o facto de terem tempos de semivida maiores (28).

A exenatida é eliminada por filtração glomerular com subsequente degradação proteolítica a liraglutide é metabolizada por o DPP-4 semelhantemente ao GLP-1(37, 38).

g) Inibidor DPP-4

O primeiro inibidor de dipeptidil peptidase-4 (DPP-4), a sitagliptina, foi aprovado pela FDA em 2006 e pela EMA em 2007; outros medicamentos aprovados nesta classe são a vildagliptina, a saxagliptina, a alogliptina e a linagliptina. Em Portugal são comercializados a sitagliptina, saxagliptina e a vildigliptina (28, 29).

O mecanismo destes fármacos incide sobre a molécula GLP-1 (efeitos mostrados anteriormente) que tem curto tempo de semivida. Estes fármacos aumentam o tempo de semivida dessa molécula através da inibição das enzimas que o degradam (28).

A metabolização dos inibidores DPP-4 em geral não é realizada por enzimas da superfamília do citocromo, à exceção da saxagliptina que é metabolizada pelos CYP3A4 e citocromo P450, família 3, subfamília A, polipeptídeo 5 (CYP3A5). A maioria destes fármacos é eliminada via excreção renal, à exceção da linagliptina cujo metabolismo no fígado parece ser predominante (39).

h) Análogos da Amilina

O fármaco *pramlintide* é um análogo sintético da amilina foi aprovado como antidiabético no ano 2004 pela FDA. Em geral este fármaco é administrado em combinação com outros fármacos antidiabéticos (40).

O mecanismo de ação da *pramlintide* é idêntico à hormona amilina, ou seja, liga-se com elevada afinidade a recetores específicos da amilina no sistema nervoso central, levando à sua respetiva ativação. Estes recetores são complexos constituídos por um recetor de calcitonina e um *receptor activity modifying protein* (RAMP1, RAMP2 e RAMP3). A ligação do fármaco aos recetores desencadeia um conjunto de mecanismos que culminam na redução do apetite, no retardamento da absorção intestinal da glicose, na supressão da produção endógena de glicose no fígado e da secreção de glicagina:

Embora estes resultados sejam idênticos aos da amilina, a *pramlintide* apresenta várias vantagens, tais como, ser mais estável e não agregar (40, 41).

A *pramlintide* é metabolizada e eliminada principalmente pelos rins (40).

Os efeitos adversos mais comuns da utilização deste fármaco envolvem náuseas e hipoglicémia, todavia é considerado um fármaco seguro (40).

i) Tratamentos com insulina, análogos e tratamentos mistos

Os níveis altos de glicémia característicos da DM2 por vezes não são controláveis, mesmo após o estabelecimento e o cumprimento de medidas dietéticas, de exercício físico adequado e da administração de antidiabéticos, sendo então necessário administrar insulina (5).

A insulina pode ser administrada como complemento a outras terapias ou em monoterapia por via endovenosa. A utilização da via endovenosa em detrimento da via oral deve-se ao facto da insulina ser rapidamente degradado no trato gastrointestinal (34).

Como referido anteriormente as primeiras preparações de insulina eram extraídos de animais, sendo que na atualidade são produzidas *in vitro* recorrendo a técnicas de DNA recombinante (34). A engenharia genética permitiu desenvolver a partir da insulina humana outros tipos de insulina com propriedades distintas (34). Estes tipos de insulina são agrupados em duas categorias, nomeadamente, as insulinas bolus prandial que são insulinas de ação rápida (isto é, a insulina regular, lispro, aspártico e glulisina), e as insulinas basais que são insulinas de longa duração (ou seja, insulina detemir e glargina isofânica) (34). Pacientes que utilizam insulina geralmente requerem uma bolus prandial e uma basal para o controlo da hiperglicémia (34). A principal vantagem da utilização das insulinas análogas de ação lenta e rápida em relação à insulina humana é produzirem menos hipoglicemia e um menor ganho de peso, todavia apresentam a desvantagem de ser mais caras (42).

De forma a aumentar a eficiência e por vezes para obter o controlo dos níveis de glicémia são utilizadas terapias em que são associados vários antidiabéticos a vários tipos de insulina (5).

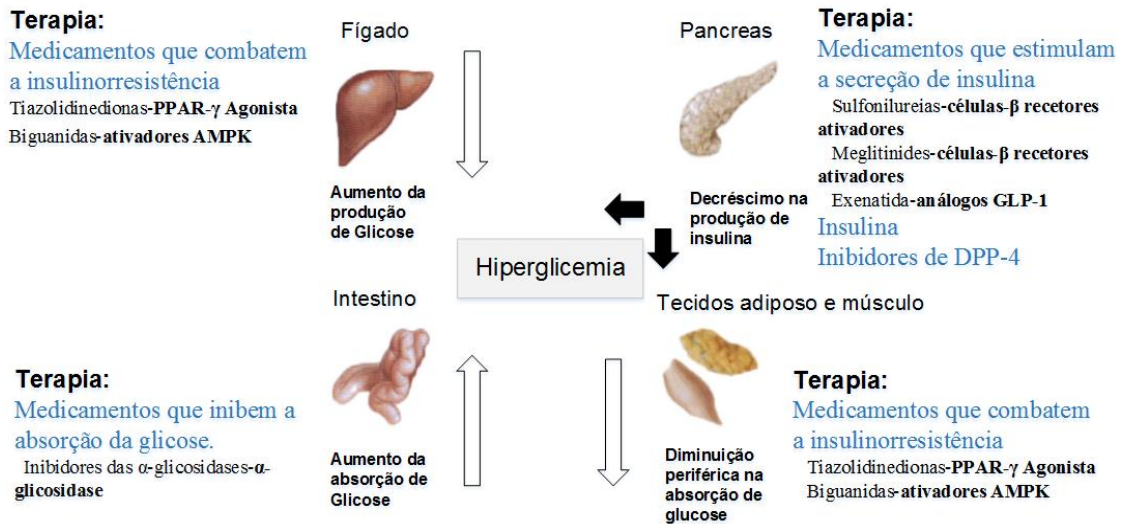


Figura 5- Terapias, locais e classes dos fármacos usados na terapia da Diabetes Mellitus tipo 2. Terapias da Diabetes Mellitus tipo 2 a azul claro. Classes de antidiabéticos usados no tratamento da Diabetes Mellitus tipo 2 a preto. Alvos terapêuticos das diferentes classes de fármacos antidiabéticos a negrito preto. Figura adaptada de (43).

5 Farmacogenética e farmacogenômica

A conjugação da eficiência de um fármaco com a variabilidade individual, tornando os fármacos mais seguros e eficazes, constitui um dos grandes desafios da atualidade (3).

Dados estatísticos indicam que por ano nos Estados Unidos da América (EUA) são hospitalizadas 2 milhões de pessoas e que morrem 100 mil pessoas por causa de reações adversas aos fármacos administrados (44). Devido a isto tornou-se extremamente importante o estudo dos aspectos que podem alterar a eficiência do fármaco e os fatores que podem levar a reação alérgica por parte do organismo. Conseqüentemente surgiu uma nova área dentro da farmacologia clínica, a farmacogenética. O termo farmacogenética foi usado pela primeira vez em 1950, e refere-se ao estudo das variantes genéticas em genes isolados que influenciam a resposta a um fármaco (44-46).

A farmacogenética evoluiu rapidamente com o aparecimento de novos estudos, nomeadamente, ao nível farmacocinético (fatores que influenciam a concentração do fármaco até chegar ao alvo), farmacodinâmico (fatores que envolvem o próprio alvo) e ao aparecimento de novas abordagens genômicas (nomeadamente, com a evolução das plataformas de sequenciação que nos permitem sequenciar cada vez mais DNA de uma forma mais barata e rápida). A convergência destes estudos, com a farmacogenética e com a rápida evolução da genómica, resultaram na farmacogenómica, um termo mais amplo, que estuda como a variabilidade genética verificada no genoma humano influencia

a resposta a um fármaco. No entanto a distinção entre os dois termos tornou-se um tanto arbitrária, sendo usados frequentemente como sinónimos (46, 47).

Um marco importante no desenvolvimento da farmacogenética foi a sequenciação do genoma humano, que tornou possível analisar o impacto das variantes da sequência do genoma humano na patogénese das doenças na resposta a uma terapia de fármacos (44). Embora atualmente seja conhecida a variabilidade genética entre indivíduos, a percepção na origem da variação na resposta a um fármaco é ainda complicada, na medida em que existem vários fatores (tabela 1) que podem alterar a resposta farmacogenética (3). Estes fatores podem ser de origem genética ou não genética. Os fatores genéticos são normalmente permanentes e de carácter hereditário, ao passo que os fatores não genéticos (ambientais e fisiológicos) têm um carácter transitório na maioria dos casos (3).

Tabela 1- Fatores que podem alterar a resposta a um fármaco, tabela adaptada (3).

Fatores genéticos	Fatores ambientais	Fatores fisiológicos
<ul style="list-style-type: none"> • Alvos terapêuticos • Enzimas metabolizadoras • Proteínas transportadoras • Alvo da reação adversa • Fatores com efeito indireto 	<ul style="list-style-type: none"> • Ambiente químico • Tabaco • Fármacos coadministrados • Álcool • Dieta 	<ul style="list-style-type: none"> • Idade • Sexo • Estado da doença • Gravidez • Atividade física • Alimentação • Índice de massa corporal

Apesar dos avanços ocorridos nas últimas décadas na área da farmacogenética a sua aplicação no presente é ainda limitada a poucos testes clínicos. As várias razões para esta falta de tradução para a prática clínica são o tamanho inadequado das amostras usadas nos estudos, as estratégias pouco extensas de fenotipagem, a falta de colaboração entre grupos e o financiamento (48). Dos testes clínicos desenvolvidos atualmente com fins farmacogenéticos, refira-se o teste *Roche Diagnostic's*, o *AmpliChip P450®* baseado na tecnologia *microarray*. Este teste analisa variantes nos genes que codificam as enzimas CYP2D6 e citocromo P450, família 2, subfamília C, polipeptídeo 19 (CYP2C19), responsáveis pelo metabolismo de fármacos muito utilizados, como as benzodiazepinas, antiepiléticos, antidepressivos, antipsicóticos, etc. Este teste permite analisar a resposta dum indivíduo para os medicamentos anteriores (49).

Os estudos *genome-wide association study* (GWAS) deram um forte estímulo à farmacogenética para identificar um conjunto de variantes genéticas ao longo do todo o genoma, no intuito de identificar a sua associação à característica observada (48).

No futuro a farmacogenética poderá ser uma ferramenta útil no desenvolvimento de novos medicamentos, no aumento da segurança e da eficiência de um determinado medicamento (44).

5.1 Farmacogenética e diabetes mellitus tipo 2

O tratamento para a DM2 é na atualidade disponibilizado essencialmente sobre a forma de antidiabéticos orais, todavia devido à variabilidade existente entre pacientes, os tratamentos não expressam a mesma resposta. Esta variabilidade está por vezes associada a uma redução na eficácia ou a falhas do tratamento, além de reações adversas (32).

Na última década, foram realizados vários esforços para identificar polimorfismos associadas à farmacogenética da DM2, estando até à data identificados vários polimorfismos genéticos que podem alterar a resposta de um indivíduo ao tratamento (32). A maioria das variantes genéticas encontradas pertence às três classes de genes principais:

a) Genes envolvidos no metabolismo e no transporte que influenciam a farmacocinética dos fármacos da DM2

Nesta classe de genes inclui-se a superfamília citocromo P450 (CYP) e a família transportadores de solutos (SLC).

As enzimas CYP são hemoproteínas que se encontram principalmente no retículo endoplasmático dos hepatócitos. Estas enzimas catalisam a mono-oxigenação dos fármacos lipofílicos, dando origem a metabolitos com atividade alterada, ou a metabolitos intermediários usados por outras enzimas (32). Até ao momento já foram identificadas 17 famílias de genes CYP, das quais as famílias de enzimas CYP 1, 2 e 3 são responsáveis por 96% da biotransformação dos compostos xenobióticos (32).

Polimorfismos nos genes que codificam enzimas metabolizadoras podem afetar a concentração do fármaco no plasma, resultando em indivíduos com diferentes perfis metabólicos, que são caracterizados pelos seguintes fenótipos de metabolização: pobre, intermédio, extensivo e rápido (44). Dentro da superfamília de enzimas CYP responsáveis pela metabolização dos fármacos utilizados como terapia para DM2, inclui-se as enzimas CYP2C8 e CYP3A4 envolvidas na metabolização do fármaco repaglinida da classe das meglitinidas e do fármaco pioglitazona da classe das tiazolidinedionas. A enzima CYP2C8 também se encontra envolvida na metabolização do fármaco rosiglitazona da classe das tiazolidinedionas (31, 50), a CYP2C9 está envolvida na metabolização do

fármaco rosiglitazona da classe das tiazolidinedionas, da nateglinida da classe das meglitinidas e da generalidade dos fármacos da classe das sulfonilureias e a enzima CYP2C19 está envolvida na metabolização do fármaco gliclazida da classe das sulfonilureias (31, 50, 51).

As proteínas transportadoras codificadas por SLC são responsáveis pelo transporte de vários compostos endógenos e xenobióticos. Estes genes são expressos em diferentes órgãos do corpo humano, desempenhando um papel crítico na disposição dos fármacos (32, 52). Desta família de proteínas transportadoras associadas à farmacogenética da DM2 incluem-se várias proteínas. *Solute carrier family 22 (organic cation transporter), member 1* (SLC22A1) e *solute carrier family 22 (organic cation transporter), member 2* (SLC22A2) são expressas, respetivamente na membrana basolateral dos hepatócitos e na membrana basolateral das células tubulares renais que são responsáveis pela absorção do fármaco metformina da classe das biguanidas. As proteínas *solute carrier family 47 (multidrug and toxin extrusion), member 1* (SLC47A1) e *solute carrier family 47 (multidrug and toxin extrusion), member 2* (SLC47A2) são expressas na membrana apical das células do túbulo proximal renal, e facilitam a excreção do fármaco metformina para a urina. A proteína *solute carrier family 29 (equilibrative nucleoside transporter), member 4* (SLC29A4) é expressa no lado luminal dos enterócitos que medeia a absorção do fármaco metformina. A proteína *solute carrier family 30 (zinc transporter), member 8* (SLC30A8) é expressa nas células β pancreáticas e parece desempenhar um papel crítico na maturação e na libertação da insulina, sendo responsável pelo transporte de zinco. Está demonstrado que polimorfismos neste gene podem afetar a disposição de zinco e a função do canal KATP, afetando assim a eficácia do fármaco repaglinida da classe das meglitinidas. Por último a proteína *solute carrier organic anion transporter family, member 1B1* (SLCO1B1) é expressa nas células do fígado e é responsável pela absorção dos fármacos repaglinida e nateglinida, ambos da classe das meglitinidas (32).

Adicionalmente, aos genes pertencentes às famílias CYP e SLC foi identificado o gene *ATP-Binding Cassette, Sub-Family B (MDR/TAP), Member 1* (ABCB1). Este gene codifica uma proteína transportadora transmembranar, que funciona como uma bomba de efluxo para uma variedade de fármacos, estando envolvida na resistência a múltiplos fármacos. Polimorfismos neste gene foram associados a uma resposta alterada para o fármaco repaglinida da classe das meglitinidas (53).

No anexo 1 são exibidos várias alterações envolvidas na farmacogenética da DM2, entres elas alterações referentes a todos os genes mencionados anteriormente relativos à superfamília CYP e da família SLC.

b) Genes que codificam para os recetores e alvos dos fármacos da DM2

Nesta classe de genes são incluídos os genes que codificam o PPAR γ (recetor tiazolidinedionas), o canal KATP (ABCC8 e KCNJ11-recetor das sulfonilureias e meglitinidas), a subunidade proteica AMPK (alvo das biguanidas), a enzima DPP-4 (alvo dos inibidores de DPP-4), as enzimas α -glicosidases (alvo dos inibidores da α -glicosidase) e o GLP1R (alvo dos análogos de GLP-1) (32, 54). A função destes genes encontra-se descrita ao longo da secção terapias para a DM2. Os polimorfismos encontrados nestes genes estão associados entre outras causas a alterações na resposta terapêutica de vários fármacos utilizados no tratamento DM2 (32). No anexo 1 estão representados todos os polimorfismos identificados nestes genes.

c) Genes envolvidos nas vias metabólicas que controlam os níveis de glicémia, que influenciam a farmacodinâmica dos fármacos da DM2

Nesta secção são apresentados de forma sistemática os genes envolvidos nas vias metabólicas que controlam os níveis de glicémia, no qual foram referenciados polimorfismos que alteram a resposta farmacodinâmica dos fármacos utilizados no tratamento da DM2. Estes polimorfismos podem levar a alterações na secreção e na resistência à insulina (32). A DM2 é caracterizada por uma diminuição na secreção da insulina e/ou por um aumento na resistência à insulina (4). Os fármacos utilizados como terapia para DM2 atuam essencialmente sobre estes dois princípios (secreção e resistência à insulina), sendo que polimorfismos que afetem estes dois princípios podem estar na origem de respostas alteradas para os fármacos utilizados no tratamento da DM2.

O gene *potassium voltage-gated channel, KQT-like subfamily, member 1* (KCNQ1) codifica um canal de K⁺ dependente de voltagem (31), o gene *CDK5 regulatory subunit associated protein 1-like 1* (CDKAL1) codifica uma proteína que inibe a atividade do CDK5 (que tem um papel permissivo na diminuição da expressão do gene da insulina) (55), o gene *nitric oxide synthase 1 (neuronal) adaptor protein* (NOS1AP) codifica uma proteína que se liga e inibe *nitric oxide synthase 1 (neuronal)* (32), o gene *ATP-binding cassette, sub-family A (ABC1), member 1* (ABCA1) expressa uma proteína transmembranar que transporta colesterol a partir da membrana celular para o plasma

apolipoproteína A1 (56) e o gene *transcription factor 7-like 2 (T cell specific, HMG-box)* (TCF7L2) responsável por codificar um fator de transcrição que se encontra envolvido na regulação da proliferação e na diferenciação celular (31, 56), têm um papel preponderante na secreção da insulina. Além disso, todos estes genes têm em comum o facto de se encontrem referências de polimorfismos associados à variabilidade de respostas dos fármacos da classe das sulfonilureias (31, 32, 55, 57).

Adicionalmente, com um papel importante na secreção de insulina, mas em relação a outras classes de fármacos utilizados no tratamento da DM2 foram identificados vários polimorfismos que afetam a resposta destas classes de fármacos.

Na classe de fármacos meglitinidas foram referenciados vários polimorfismos que afetam a resposta desta classe de fármacos, nomeadamente, no gene *uncoupling protein 2 (mitochondrial, proton carrier)* (UCP2), que expressa uma proteína com a função de translocação dos prótons e eletrões do espaço intermembranar para a matriz mitocondrial (58), no gene *nicotinamide phosphoribosyltransferase* (NAMPT), que codifica uma enzima que limita a taxa de conversão da nicotinamida em nucleótidos nicotinamida (32), nos genes *neuronal differentiation 1* (NEUROD1) e *paired box 4* (PAX4), que codificam fatores de transcrição e nos genes já referidos KCNQ1, TCF7L2 e NOS1AP (32).

Na classe de fármacos biguanidas foram referenciados polimorfismos que afetam a resposta desta classe de fármacos nos seguintes genes, no gene *serine racemase* (SRR) que codifica uma enzima que catalisa a síntese de D-serina a partir de L-serina (59), no gene *melatonin receptor 1B* (MTNR1B) codifica um recetor de alta afinidade para a melatonina que medeia a ação circadiana da melatonina (60, 61), no gene *glucose-6-phosphatase, catalytic, 2* (G6PC2) que expressa uma enzima que hidrolisa a glicose-6-fosfato para glicose (60, 61) e no gene *MAP-kinase activating death domain* (MADD) que codifica uma proteína que desempenha um papel importante na regulação da proliferação, vida e morte celular (60, 61).

Nos genes anteriormente descritos KCNQ1, UCP2 e ABCA1 foram encontrados polimorfismos associados a respostas alteradas para classe de fármacos tiazolidinedionas (32, 56, 62).

Por último no gene *Wolfram syndrome 1 (wolframin)* (WFS1) expresso entre outros tecidos nos ilhéus pancreáticos que desempenha um papel importante na regulação celular da homeostasia do Ca^{2+} (63), no gene *thyroid adenoma associated* (THADA) que codifica uma proteína associada ao adenoma da tiroide, que tem sido sugerido estar envolvido na via recetor de morte e a apoptose (64) e no gene TCF7L2 anteriormente

descrito foram encontrados polimorfismos associados a respostas alteradas para a classe dos fármacos dos GLP-1 e análogos (63, 65, 66).

Como referido anteriormente a resistência à insulina constitui uma das principais causas da DM2, sendo que polimorfismos associados diretamente ou indiretamente com esta resistência podem levar a alterações terapêuticas em relação aos fármacos utilizados no tratamento da DM2 (8).

As adipocinas incluem entre outros genes, os seguintes secretados pelo tecido adiposo, a leptina (LEP), a resistina (RETN), a adiponectina (ADIPOQ) e *tumor necrosis factor 1 alpha* (TNF- α). Estes genes têm um papel importante na resistência à insulina (uma das causas de desenvolvimento de DM2) (31). Além destes genes, também foi referenciado um papel importante na resistência à insulina nos 6 genes seguintes. No gene *adrenoceptor beta 3* (ADRB3) que codifica um recetor acoplado à proteína G que desempenha um papel central no metabolismo de lípidos e da modulação da taxa metabólica (67). No gene *Lipin1* (LPIN1) que expressa uma proteína no tecido adiposo que parece ter um papel importante na diferenciação e na manutenção da função dos adipócitos e na lipogénese (68). Bem como no gene *peroxisome proliferator-activated receptor gamma, coactivator 1 alpha* (PGC-1 α) que expressa um coativador de transcrição que se encontra associado à regulação da oxidação dos ácidos gordos, à gliconeogénese e à absorção da glicose nas células do músculo (69) e também no gene *retinol binding protein 4* (RBP4) que codifica uma proteína que transporta retinol das reservas hepáticas para os tecidos periféricos (70). Por último no gene *lipoprotein lipase* (LPL) que expressa uma glicoproteína que se encontra envolvida na hidrólise de triglicéridos de quilomicrons circulantes e das lipoproteínas de densidade muito baixa (60, 71) e no gene *protein tyrosine phosphatase, receptor type, D* (PTPRD) que expressa uma proteína da família das proteínas tirosina fosfatase, sendo que as proteínas desta família são conhecida por serem moléculas de sinalização que regulam diversos processos celulares, nomeadamente, o crescimento celular, a diferenciação, o ciclo mitótico e a transformação oncogénica (60).

O conjunto de genes referido no parágrafo anterior tem em comum, como já referido, o facto de se encontrarem associados à resistência à insulina e também o facto de em todos eles ter sido referenciado polimorfismos associados a resposta alteradas para a classe das tiazolidinedionas (31, 67-71).

Adicionalmente, em relação à resistência à insulina foram identificados mais genes associados a outras classes de fármacos antidiabéticos que se encontram descritos seguidamente.

O gene *peroxisome proliferator-activated receptor alpha* (PPAR α) é expresso em vários órgãos (fígado, rins e coração) e tem como função a regulação positiva da expressão dos genes envolvidos no metabolismo de ácidos gordos. Neste gene e nos já descritos PGC1- α e ADIPOQ foram encontrados polimorfismos associados a respostas alteradas para a classe dos inibidores da α -glicosidase (72-74). No gene *ataxia telangiectasia mutated* (ATM) que codifica uma proteína-cinase que desempenha um papel importante na ativação de respostas celulares a quebras de DNA de cadeia dupla e no gene *glucokinase (hexokinase 4) regulator* (GCKR) que expressa uma proteína reguladora que inibe a *glucokinase* por formação de um complexo inativo, foram identificados polimorfismos associados a resposta alteradas para a classe de fármacos biguanidas (60, 75, 76). Por último, nos genes *insulin receptor substrate 1* (IRS1) e *insulin-like growth factor 2 mRNA binding protein 2* (IGF2BP2) que codificam proteínas que desempenham um papel importante na sinalização da insulina, sendo que o gene IGF2BP2 também tem um papel importante na secreção de insulina, foram identificados polimorfismos no gene IRS1 associados a resposta alteradas para a classe das sulfonilureias e no gene IGF2BP2 associados a resposta alteradas para a classe das meglitinidas (32, 77).

No anexo 1 encontram-se representados todos os polimorfismos referenciados nestes genes.

6 Técnicas de Sequenciação de DNA

As tecnologias de sequenciação são relativamente recentes sendo abordadas pela primeira vez em 1973 numa publicação Walter Gilbert e Allan Maxam. Nesta publicação foi divulgado uma sequência de 24 pares de base do operador lac obtida pela técnica de sequenciação química (sequenciação Maxam-Gilbert). Pouco tempo depois Sanger publica um trabalho em que descreve um método de sequenciação que utiliza *primers* sintéticos e DNA polimerase (78). Este método tornou-se rapidamente mais popular do que o método de sequenciação de Maxam-Gilbert, isto deveu-se às vantagens que método de Sanger apresentava, entre as quais a utilização de reagentes mais seguros (78).

Nos anos seguintes foram introduzidas várias inovações aos instrumentos de sequenciação que permitiram um aumento significativo na escalabilidade, além de um

aumento da rapidez e uma diminuição no erro associado à sequenciação. As principais inovações introduzidas foram a substituição da marcação radioativa por marcação com fluoróforos e a implementação da reação em cadeia de polimerase (PCR) (79).

A marcação de fluoróforos permitiu a automação do processo de sequenciação, na medida em que pode ser facilmente acoplada a sistemas automáticos, enquanto o PCR permitiu iniciar sequenciações com uma quantidade de DNA significativamente menor (79). Estas tecnologias constituíram a primeira geração de sequenciadores.

6.1 O projeto genoma humano

O aparecimento das primeiras técnicas de sequenciação no início dos anos 70 e a evolução que se fez sentir nos anos posteriores que tornaram essas técnicas cada vez mais eficientes fez surgir a ideia de sequenciar o genoma humano (78). O projeto genoma humano teve início no ano 1987. Este projeto foi descrito como um esforço internacional no desenvolvimento de mapas genéticos e físicos da sequenciação do genoma humano e de vários genomas de organismos modelo. (78). O projeto foi finalizado no ano 2003, sendo que apenas no ano de 2004 foi publicada a sequência do genoma humano. Esta sequência apresentava uma cobertura de 99,7 % do genoma humano e tinha apenas 1 erro a cada 100.000 bases (78).

Nos anos seguintes ao projeto verificou-se uma redução significativa dos custos. de sequenciação figura 6, sendo o preço de janeiro de 2014 segundo o *National Institutes of Health* (NIH) de US\$4008 (2894€) (figura 6) (78)

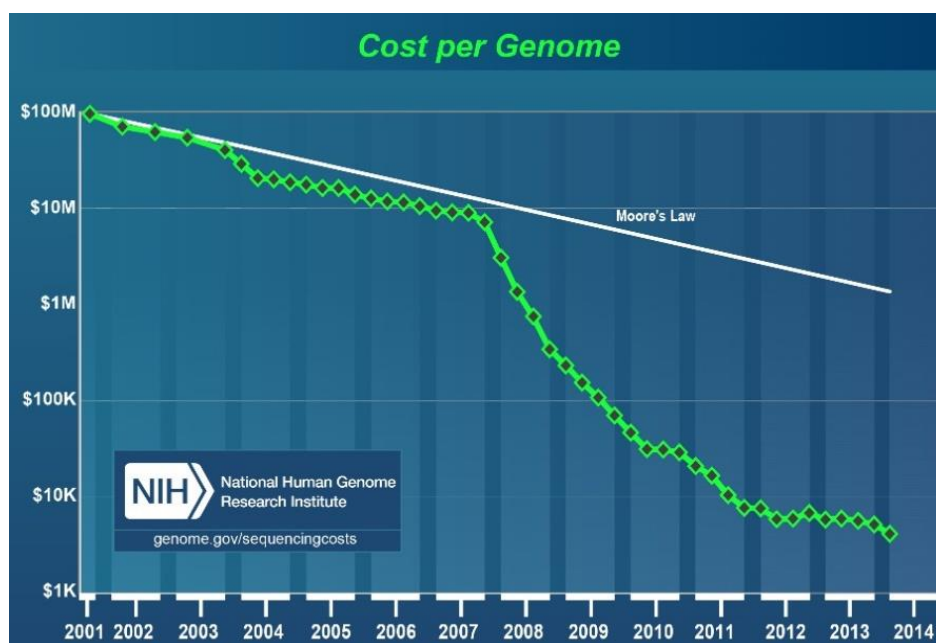


Figura 6- Evolução ao longo do tempo do preço do genoma Figura adaptada do NIH.

6.2 Next Generation Sequencing

Nos anos seguintes à finalização do projeto genoma humano o NIH iniciou um programa para reduzir rapidamente os custos de sequenciação por genoma. O objetivo era promover o desenvolvimento de tecnologias de sequenciação mais baratas e significativamente mais rápidas que pudessem ser traduzidas para aplicações médicas e terapêuticas (78).

As seções seguintes abordam as plataformas de sequenciação massiva em paralelo baseada em PCR (2ª geração) e sequenciação a partir de uma única molécula (3ª geração), contudo apenas a tecnologia de sequenciação de segunda geração *Ion Torrent* será descrita em maior detalhe (visto ser a tecnologia utilizada neste trabalho) sendo as outras tecnologias apresentadas na tabela 2 muito resumidamente. Nesta tabela são apresentadas informações relevantes sobre as principais plataformas de sequenciação utilizadas, nomeadamente, informações sobre o fabricante, a preparação do *template*, o mecanismo de sequenciação, a fonte do sinal, comprimento das *reads*, o tempo e rendimento da corrida, o rácio de erro, o preço do equipamento, o preço por Mb sequenciada e ainda as vantagens e limitações de cada plataforma de sequenciação (80).

6.2.1 Ion Torrent

A tecnologia *Ion Torrent* começou a ser comercializada no ano 2010 pela empresa com o mesmo nome, companhia que mais tarde foi adquirida pela *Life Technologies* (79). Atualmente existem dois sequenciadores assentes nesta tecnologia, o *Ion Torrent PGM* e o *Ion Torrent Proton*.

Os sequenciadores *Ion Torrent* enquadram-se na segunda geração de plataformas de sequenciação. São os únicos comercializados em que não é utilizado um sistema de deteção ótico, mas sim um sensor de iões H^+ que lê o pH (tabela 2). Estes sequenciadores utilizam um comprimento de *read* de 200 a 400 pares de bases, que entre os sequenciadores de segunda geração constitui o segundo maior tamanho de *read* (apenas menor que as *reads* utilizadas no sequenciador 454 GS –800 pares de bases), apresentam um tempo de corrida 2,5 a 4,5, o que constitui um dos menores tempos de corridas entre todos os sequenciadores, e um rendimento por corrida no máximo de 100Gb (rendimento depende do chip utilizado, o rendimento apresentado é referente ao sequenciador *Ion Proton* e ao chip de sequenciação proton 2) que constitui o segundo rendimento por corrida mais alto entre todas os sequenciadores (apenas inferior ao da plataforma

HiSeq2000 que tem um rendimento de 300 Gb). As principais vantagens destas plataformas de sequenciação são os reduzidos tempos de corrida e o custo reduzido do aparelho, as principais limitações são a alta taxa de erros na sequenciação de homopolímeros (tabela 2) (80).

A tecnologia e a metodologia aplicada nestes sequenciadores *Ion Torrent* envolvem três etapas principais. Uma primeira etapa onde é preparada a biblioteca de DNA. Nesta etapa o DNA é fragmentado e purificado e são adicionados adaptadores em ambas as extremidades dos fragmentos resultantes (79). Na etapa seguinte, o PCR de emulsão, os fragmentos obtidos na primeira etapa são ligados a microesferas (*beads*), através do emparelhamento dos adaptadores ligados às extremidades dos fragmentos com sequências complementares existentes na superfície das microesferas (apenas um fragmento por microesfera). Posteriormente as microesferas são capturadas em gotículas oleosas " microrreactores" onde ocorre o PCR de emulsão, sendo gerados milhões de fragmentos amplificados por clonagem em cada microesfera. A última fase desta etapa consiste na quebra da emulsão e no carregamento do chip de sequenciação com as microesferas (79). A última etapa deste processo consiste na sequenciação/deteção. Nesta etapa, quando é incorporado um nucleótido é libertado como subproduto um ião de hidrogénio (H^+). A alteração na tensão causada pela carga do ião é detetada pelo sensor de iões no chip semiconductor que lê o pH (figura 7) (79). A adição do nucleótido seguinte é precedida de uma inativação ou lavagem dos desoxinucleótidos (dNTPs) que ficam em solução (79).

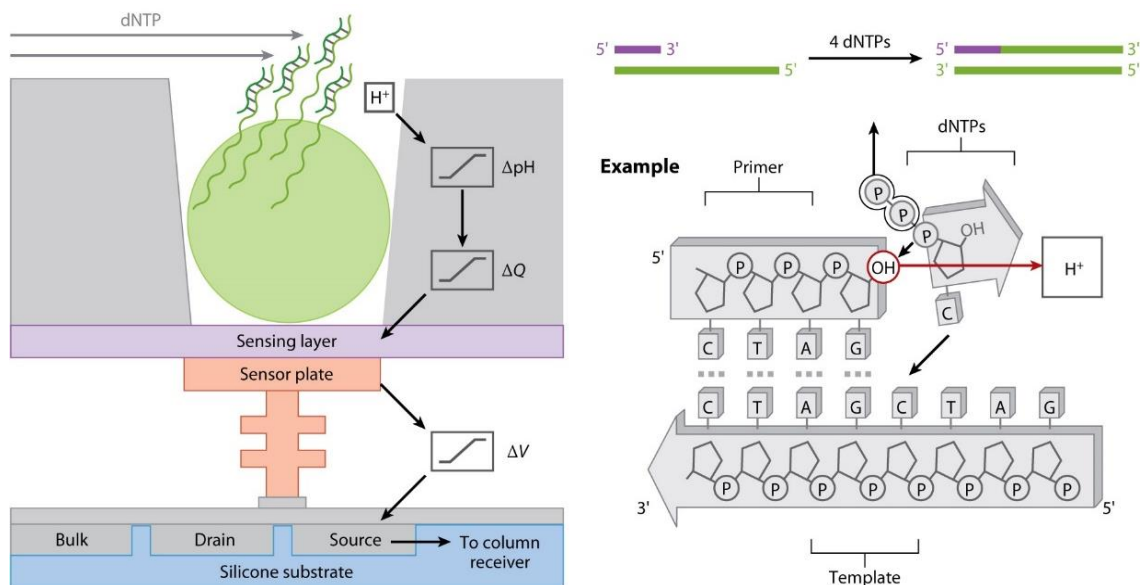


Figura 7- Imagem esquemática da técnica sequenciação do aparelho da *Ion Torrent*, onde está representado a etapa de deteção. Figura adaptada de (79).

Tabela 2- Comparação das principais plataformas de sequenciação (NGS) (78).

Plataformas	Tecnologias de sequenciação de 2º geração				Tecnologias de sequenciação de 3º geração			GridION
	454 GS	HiSeq2000	SOLiD	Ion torrent	Heliscope™	SMRT	Oxford Nanopore Technologies	
Fabricantes	Roche	Illumina	ABI, Life Technologies	Life Technologies	Helicos Biosciences	Pacific Biosciences	Oxford Nanopore Technologies	
Preparação do template	Emulsão- Baseado em PCR	<i>Bridge-PCR</i> Baseado em PCR	Emulsão-Baseado em PCR	Emulsão- Baseado em PCR	Amplificação clonal não necessária	Amplificação clonal não necessária	Amplificação clonal não necessária	
Mecanismo de sequenciação	Sequenciação por síntese	Sequenciação por síntese	Sequenciação por ligação	Sequenciação por síntese	Sequenciação por síntese	Sequenciação por síntese	Sequenciação por detecção de sinais elétricos	
Fonte do sinal	Quimiluminescente	Fluorescente	Fluorescente	Iões H+	Fluorescente	Fluorescente	Sinais elétricos	
Comprimento das reads (base)	800	50-100, paired End	75 + 35, paired end	200-400	35 em média	1000 em média	10000	
Tempo de corrida	10-20 h	4-11 dias	Mais de 8 dias	2,5-4,5 h	8 dias	< 1 h	Variável	
Rendimento por corrida	800 Mb	Maximo 300 Gb por flow cell	50-70 Gb por FlowChip	10 Mb (314 chip) 100 Mb (316 chip) 1 Gb (318 chip) 10 Gb (proton 1) 100 Gb (proton 2)	21-35 Gb	36 Mb por hora	40-100 Mb	
Rácio final erro (%)	1	0,1	≤0,1	1	≤1	1	4	
Custo por Mb (\$)	10	0,07	0,13	1 (318 chip)	0,45-0,6	>7	1	
Custo do instrumento (\$)	<500 K	700 K	530 K	50 K	~1 milhão	695 K	Ainda não é comercializado	
Vantagens	Melhores alinhamentos devido ao tamanho das <i>reads</i>	Rácio de erros baixo e um custo de sequenciação reduzido	Rácio de erros muito baixo	Baixo custo do aparelho e reduzidos tempos por corrida	Sequenciação a partir de uma única molécula	Sequenciação a partir de uma única molécula, grandes <i>reads</i> e pequenos tempos de corrida	Sequenciação a partir de uma única molécula e é capaz de analisar DNA, RNA e proteínas diretamente	
Limitações	Taxa de erros elevada na sequenciação de homopolímeros e sequenciação cara	Pequenas <i>reads</i> e longos tempos de corrida	Pequenas <i>reads</i> e longos tempos de corrida	Taxa de erros elevada na sequenciação de homopolímeros	Pequenas <i>reads</i> e alto preço do equipamento	Preço elevado do equipamento e alta taxa de erro	Taxa de erro elevada. Equipamento ainda não comercializado	

6.3 Whole exome sequencing

O exoma representa apenas o conteúdo codificante do código genético, que é cerca de 1% do genoma (que tem cerca de três mil milhões de pares de bases) (81).

A sequenciação de exomas visa principalmente os exões (conteúdo codificante), todavia em menor porção regiões não codificantes tais como regiões no limite exão-intrão, *untranslated region* (UTRs) e regiões intergénicas, também são sequenciadas como um subproduto (82). Nos dias de hoje a sequenciação do exoma fornece uma cobertura de mais de 95% dos exões, que estima-se conter cerca de 85% das mutações causadoras de doenças. Por este motivo a sequenciação de exomas tem um enorme potencial para descobrir as causas de um grande número de doenças raras, além da predisposição para doenças comuns, tornando-se assim ideal para entender a alta penetrância da variação alélica (pois apenas incluem regiões codificantes do genoma) e estudar a relação entre uma determinada variante e uma doença (83). Além disso a sequenciação de exomas é mais rápida, barata (preço de sequenciação de um exoma completo com uma cobertura de 80x na empresa 23andMe é de US\$999 (735€)) e mais fácil de analisar quando comparada à sequenciação do genoma, fazendo com que a sequenciação de exomas se torne numa ferramenta ideal para a medicina, permitindo no futuro melhores técnicas de prognóstico, diagnóstico e tratamento mais eficientes (81, 84).

A principal limitação da sequenciação de exomas em relação à sequenciação de genomas é o facto de apenas se restringir à análise de 1% do genoma, pelo que não se podem interrogar muitas alterações, nomeadamente, algumas das quais importantes no controlo da regulação da transcrição dos genes ou do *splicing*. Uma outra limitação é a nossa compreensão atual do genoma que ainda é limitada, pois regiões do genoma que não são atualmente reconhecidas como um gene não serão abrangidas por este tipo de abordagem ao exoma (83).

6.4 SNPs

Os SNPs são polimorfismos de nucleótido único e compõem uma fonte de diversidade entre indivíduos, podendo ser bi- tri ou tetra-alélica, todavia as bi-alélicas são mais comuns. Constituem o marcador molecular mais abundante no genoma com uma frequência de 1 em cada 1000 par de bases, sendo atualmente identificados mais de três milhões de SNPs. Uma inserção ou deleção de uma única base também pode ser referida

como um SNP, embora o termo variante de um único nucleótido seja mais correto para incluir estes polimorfismos (85, 86). Estas variantes podem alterar ou não a sequência dos aminoácidos codificados na sequência da proteína, sendo classificadas consoante a região onde se encontram em SNPs como exônicos, intrônicos, em região de *splicing*, *upstream gene variant*, UTR e em região intergénica. Os SNPs encontrados na região exónica podem se subdividir em SNPs sinónimos (não altera o aminoácido codificado), *missense* (alteram o aminoácido codificado), *nonsense* (inserir um codão de stop) e *indel* (inserções ou deleções de bases na sequência) consoante a alteração provocada na sequência da proteína.

A utilização deste marcador molecular neste trabalho em detrimento dos outros prende-se com facto de ser o marcador molecular mais abundante, estar localizado ao longo de todo o genoma e ser fácil de analisar. Além disso, na atualidade é o marcador molecular dominante nas aplicações biomédicas, devido à disponibilidade dos dados de projetos como o dbSNP, HapMap e 1000 genomas (86).

Objetivos

Existe uma grande variabilidade genética entre indivíduos, o que torna difícil uma terapia eficaz e eficiente que satisfaça toda a população mundial.

Os objetivos desta tese são nomeadamente:

1. Selecionar os SNPs referentes à população EUR (populações europeias e caucasianas), em região codificante e associados com a farmacogenética da DM2, e fazer o seu levantamento através do GEMINI *browser* nos arquivos VCF relativos aos exomas dos 51 indivíduos diabéticos da amostra em estudo.
2. Analisar o enquadramento e comparar os resultados da nossa amostra estudo com os da população EUR (1000 genomas), nomeadamente a frequência alélica.
3. Analisar e correlacionar os resultados obtidos do levantamento dos SNPs em região codificante, referentes à população EUR e associados à farmacogenética da DM2 com o tratamento administrado a cada indivíduo da amostra em estudo.
4. Propor um conjunto de potenciais SNPs candidatos para futuros estudos na população portuguesa, quer através de pesquisa bibliográfica de SNPs associados para a farmacogenética da DM2, todavia não descritos na população EUR, quer através da pesquisa direcionada em genes alvo.

Em suma, o objetivo deste estudo é constituir uma base informativa de todos os SNPs associados à farmacogenética da DM2 e propor um conjunto de potenciais SNPs para estudos futuros.

Material e métodos

1 Caracterização do grupo de doentes

O grupo de estudo utilizado neste trabalho foi constituído por 51 doentes portugueses (25 homens e 26 mulheres) com DM2.

As amostras de sangue periférico dos 51 indivíduos foram recolhidas no Centro Hospitalar Universitário de Coimbra e sequenciadas e analisadas na Unidade de Sequenciação Avançada do Biocant (Genoinseq). O procedimento foi efetuado com consentimento informado de todos os pacientes de acordo com a declaração de Helsínquia.

2 Levantamento de genes e SNPs relacionados com farmacogenética

O levantamento dos SNPs associados à farmacogenómica iniciou-se com a identificação dos fármacos associados à doença. Esta identificação foi realizada através da pesquisa bibliográfica e da pesquisa em bases de dados bioinformáticas da especialidade. Dentro destas bases de dados foi utilizado o PharmGKB que é uma base dados farmacogenómica que reúne informação clínica, tal como, associações gene-fármaco, associações polimorfismos-fármaco, dosagens e rótulos de medicamentos (47). Também foi utilizada a base de dados do Drugbank, que é uma base dados bioinformática e quimioinformática que combina informação detalhada de fármacos, *targets* e vias metabólicas (38).

Identificados os fármacos associados à farmacogenómica da DM2, procedeu-se ao levantamento dos genes associados aos fármacos, para isso foi utilizado as bases de dados anteriores (PharmGKB e Drugbank) e a base de dados do Clinvar (esta base dados reúne informação sobre polimorfismos e a sua relação com saúde humana). A pesquisa realizada nestas bases de dados utilizou como palavras-chave o nome dos fármacos (87).

De forma a recolher informação adicional sobre os genes identificados foi utilizado a base de dados *Hugo gene nomenclature committee* (HGNC) que gera um relatório de pesquisa que nos permite conectar a varias bases de dados relevantes, sobre o gene em pesquisa (85).

O passo seguinte foi o levantamento dos SNPs na base de dados do PharmGKB e ClinVar, utilizando-se como termos de pesquisa os genes identificados anteriormente.

Por fim, e de forma a completar a informação recolhida anteriormente, recorreu-se a pesquisa bibliográfica e a outras bases de dados, nomeadamente o SNPedia (base de

dados onde se pode encontrar informação sobre polimorfismos), Ensembl (um browser que disponibiliza a mais diversa informação do genoma humano e de outros organismos modelo) e dbSNP (base de dados de SNPs, no qual se pode encontrar diversa informação sobre estes polimorfismos) (85, 88-90). A metodologia encontra-se resumidamente esquematizada na figura 8.

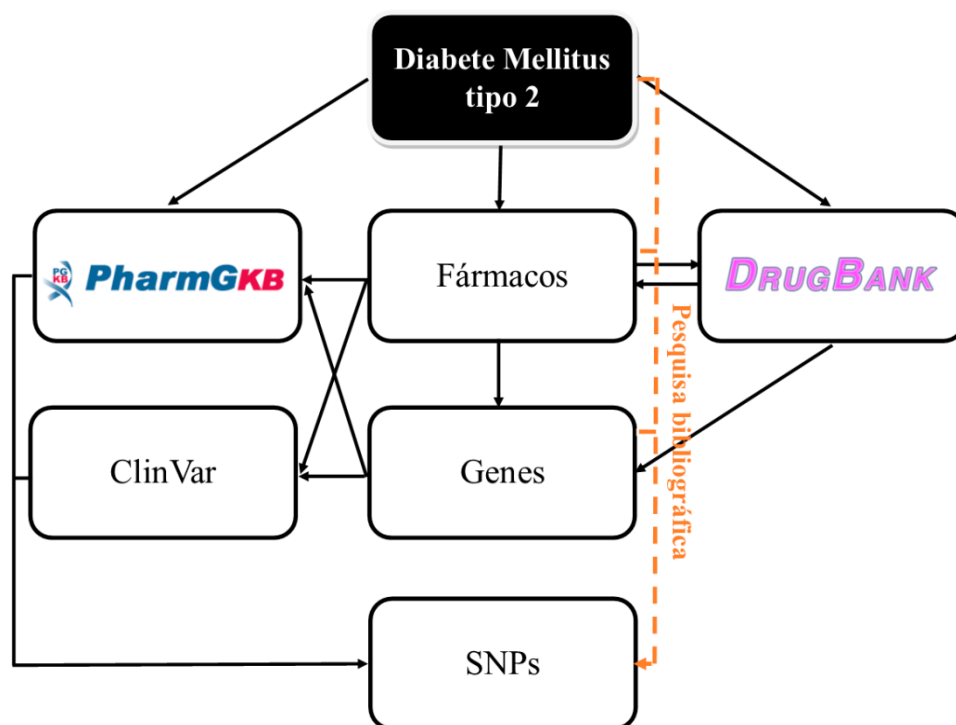


Figura 8- Metodologia utilizada no levantamento dos SNPs/genes associados à resposta aos fármacos da DM2.

3 Sequenciação de exomas

Neste trabalho não se realizou a etapa de sequenciação dos exomas, sendo que apenas se realizou a análise dos dados provenientes desta sequenciação, todavia a metodologia referente à sequenciação é introduzida devido a ser uma parte importante para a compreensão da metodologia restante.

3.1 Extração e avaliação da quantidade e qualidade do DNA

A extração de DNA a partir das amostras de sangue periférico foi efetuado recorrendo ao kit de extração *DNeasy Blood & Tissue Kit* (QIAGEN®, Alemanha) de acordo com as instruções do fabricante.

Após extração das amostras procedeu-se à quantificação e avaliação do grau de pureza por espectrofotometria utilizando o equipamento *NanoDrop® ND-1000*

Spectrophotometer (NanoDrop Technologies, EUA). Esta técnica baseia-se na lei de Beer-Lambert para determinar a concentração de ácidos nucleicos, quer de cadeia simples como dupla, recorrendo à seguinte fórmula: $[DNA] \text{ (ng/}\mu\text{L)} = A_{260} \times 50\text{ug/mL} \times \text{fator de diluição}$, em que A_{260} representa a absorvância a 260 nm (pico máximo de absorvância de ácidos nucleicos). Através da espectrofotometria é possível avaliar o grau de pureza das amostras relativamente a contaminação com proteínas, ácido ribonucleico (RNA) e outros contaminantes, determinando-se os rácios 260nm/280nm e 260nm/230nm. Uma amostra é considerada pura quando os valores destes rácios estão acima de 1,8. As amostras que apresentaram valores inferiores aos anteriormente referidos foram sujeitas a um protocolo de purificação adicional com isopropanol.

A avaliação da integridade das amostras foi efetuada através de uma electroforese em gel de agarose a 1%, sendo visível a presença de apenas uma banda de elevado peso molecular.

De forma a garantir uma quantificação do DNA mais correta sem contribuição de elementos contaminantes procedeu-se à quantificação das amostras com o kit *Qubit® dsDNA HS Assay Kit* (Life Technologies™, EUA) utilizando o *Qubit® 2.0 Fluorometer* (Life Technologies™, EUA). Esta técnica utiliza sondas fluorescentes que se ligam especificamente ao DNA, obtendo-se assim valores mais precisos de concentração de DNA. O protocolo de quantificação foi realizado de acordo com as instruções do fabricante.

3.2 Sequenciação de exomas por NGS

O primeiro passo para a sequenciação do exoma das várias amostras consistiu na preparação de uma biblioteca. Nesta etapa foi utilizado o kit *Ion AmpliSeq™ Library Kit 2.0* (Life Technologies™, EUA) que através de um *PCR multiplex* com 294.000 pares de *primers* distribuídos por 12 *pools* permite a amplificação seletiva de mais de 97% das *consensus coding sequence* (CCDS) do genoma humano.

Sucintamente, distribuiu-se por 12 poços de uma placa uma mistura de *master mix* contendo 75 ng de DNA de cada amostra, adicionando-se de seguida uma das 12 *pools* de *primers*. O passo seguinte consiste na combinação do todo o conteúdo amplificado para um só poço da placa seguido da degradação parcial dos *primers*. Posteriormente adicionaram-se os adaptadores ao fragmento de DNA. Estes adaptadores funcionam como estruturas de ligação, além disso podem funcionar como *barcodes* permitindo distinguir fragmentos de duas amostras de DNA diferentes, que permite a sequenciação

de várias amostras diferentes de DNA ao mesmo tempo. No último passo desta etapa consistiu na purificação da biblioteca não amplificada.

Após preparação da biblioteca procedeu-se à avaliação do seu perfil através do kit *High Sensitivity DNA kit* no *Agilent 2100 Bioanalyzer* e com o *software 2100 expert* (Agilent Technologies®, Waldbronn, Alemanha) e à sua quantificação por PCR em tempo real com o kit *Ion Library TaqMan® Quantitation Kit* (Life Technologies, Foster City, EUA) e o equipamento *7500 Fast Real-Time PCR System* com o programa *7500 Software v2.0* (Applied Biosystems).

O passo seguinte no processo de sequenciação do exoma incluiu a realização de um PCR em emulsão, combinando a biblioteca de duas amostras. Nesta etapa ocorre o emparelhamento dos adaptadores ligados ao fragmento de DNA com os oligonucleótidos complementares ligados às *beads*. Posteriormente as microesferas são capturadas em gotículas oleosas onde decorre o processo de amplificação monoclonal. Após a PCR em emulsão há recuperação das *beads* através da quebra das gotículas de emulsão e à seleção daquelas contendo DNA amplificado. Todo este procedimento foi realizado recorrendo ao kit *Ion PI™ Template OT2 200 Kit v2* (Life Technologies, EUA) de acordo com as indicações do fabricante.

Por último procedeu-se ao carregamento de um chip *Ion PI™ Chip Kit v2* (Life Technologies, EUA) com as *beads* enriquecidas e procedeu-se à sequenciação massiva paralela com a plataforma de sequenciação *Ion Proton™ Sequencer* (Life Technologies, EUA).

3.3 Mapeamento

O mapeamento do DNA refere-se à etapa em que são alinhadas as *reads* de DNA obtidas no *Ion Proton*. O alinhamento foi feito no *software Torrent Mapping Alignment Program* (TMAP versão 4.0.6, *Life Technologies*, EUA) utilizando os parâmetros *default*. Este *software* utiliza quatro algoritmos de alinhamento (BWA-short, BWA-long, SSAHA e *Super-maximal Exact Matching*) (91). A estratégia de alinhamento utilizada pelo *software* TMAP consiste em identificar uma lista de *Candidate Mapping Locations* (CMLs) usando os algoritmos referidos no parágrafo anterior. As listas de CMLs criadas são posteriormente alinhadas através do algoritmo de Smith Waterman e os alinhamentos resultantes são agregados para encontrar o melhor mapeamento (91). Nesta etapa utilizou-se o genoma de referência *genome reference consortium human genome version 19* para fazer os alinhamentos das *reads* resultantes da etapa de sequenciação (92).

O *software* TMAP implementa um método de mapeamento em duas fases para manter a sensibilidade e a especificidade. Neste tipo de mapeamento as *reads* que não alinham na primeira fase passam para a segunda fase, na qual se utilizam novos algoritmos ou parâmetros definidos pelo utilizador (91). Como resultado do mapeamento no TMAP é gerado um arquivo *binary alignment map* (BAM é a versão binária de um arquivo SAM, um arquivo SAM é um arquivo de texto delimitado por tabulação que contém dados de alinhamento de sequência).

3.4 Identificação das Variantes (Variant calling)

A etapa de identificação das variantes consiste em identificar os locais na sequência alinhada que diferem da sequência de referência. Nesta etapa foi utilizado o *plugin Torrent Variant Caller* (TVC 4.0.6, Life Technologies, EUA. Este *plugin* permite fazer o *calling* dos SNPs, das inserções e deleções numa amostra ou numa região específica da amostra, através da comparação com a sequência de referência hg19 (93). O resultado é um arquivo de texto *Variant Calling File* (VCF) no qual são armazenadas somente variantes numa dada sequência de DNA (94).

Os parâmetros utilizados para fazer a anotação das variantes nos exomas da amostra em estudo foram os *default GermLine - Proton - Low Stringency*.

4 Análise de SNPs

4.1 Pesquisa de SNPs já conhecidos

De forma a avaliar a presença dos SNPs identificados na literatura e em bases de dados referentes a populações EUR (populações europeias e caucasianos), em região codificante e com influência na farmacogenética da DM2, procedeu-se à análise da amostra em estudo de 51 exomas de indivíduos diabéticos.

Numa primeira fase os SNPs foram identificados através do pacote de *software* GEMINI (*GENome MINIng* versão 0.6.4, Quinlan lab, EUA) uma ferramenta que permite consultar e explorar todas as formas de variantes genéticas (ex. SNPs, *indels*, e variantes estruturais) (95). Este *software* utiliza como arquivos de entrada os VCF (este ficheiro resultou da etapa de *variant calling* realizada pelo software TVC) que são carregados para uma base de dados, onde cada variante é automaticamente comparada com informação de várias anotações genómicas, sendo que os dados resultantes são armazenados numa base de dados SQLite (95). A interface gráfica do GEMINI é apresentada na figura 9.

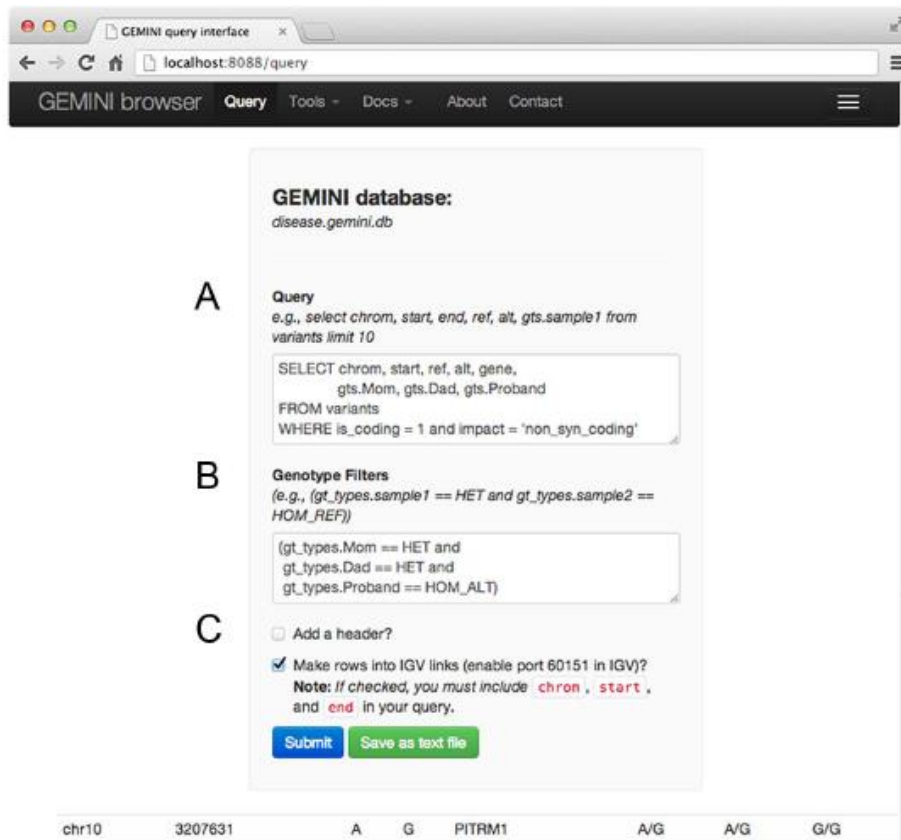


Figura 9- Interface gráfica do *software* GEMINI. A letra A representa o local onde se inserem as *queries* de pesquisa. A letra B representa o local onde se insere os filtros. A letra C representa uma secção que permite ao utilizador adicionar uma legenda às colunas ou criar ligações automáticas para IGV. Figura adaptada de (95)

Numa segunda fase de análise procedeu-se à reavaliação dos dados que resultaram do GEMINI *browser* (dados com origem nos arquivos VCF), através da verificação manual nos arquivos BAM de todos os locais onde foram identificados os SNPs em estudo.

A análise dos arquivos BAM foi efetuada no *software integrative genomics viewer* (IGV versão 2.3, Broad Institute, EUA). Este *software* possibilita uma visualização de alta performance que permite tratar de forma eficiente grandes conjuntos de dados heterogeneos, sendo o principal ênfase deste software a exploração visual e interativa de diversos dados genómicos (figura 10) (96).

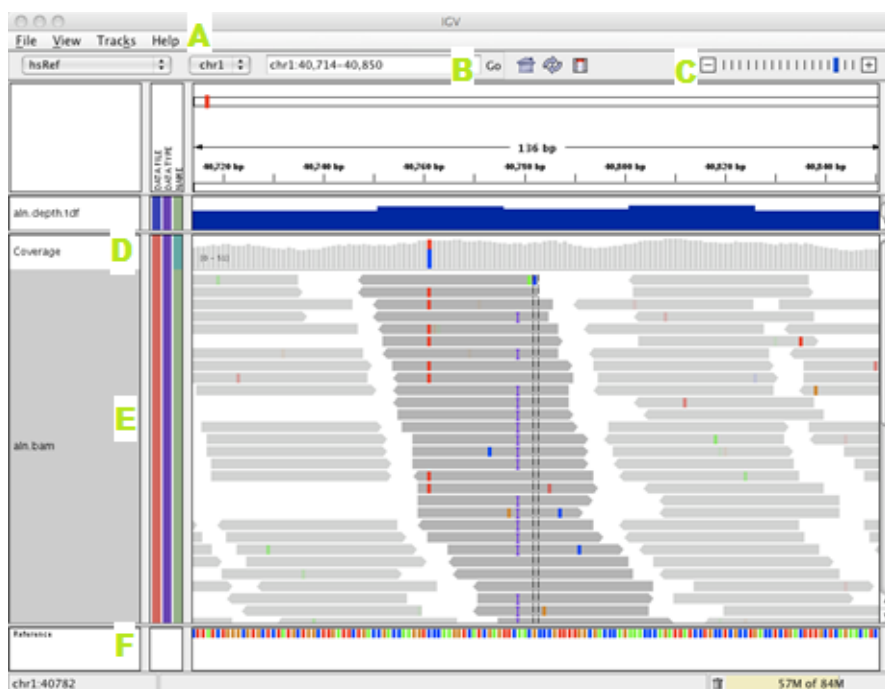


Figura 10- Interface gráfica do software IGV. A-corresponde à barra de menus. B- caixa de texto que permite de uma forma rápida deslocarmos ao longo do genoma. - barra de zoom. D – seção onde se observa cobertura. E- seção onde se observa alinhamento das reads. F- genoma de referência.

O motivo para a verificação manual nos arquivos BAM foi aumentar a confiança dos resultados. Na construção dos arquivos VCF são utilizados parâmetros de qualidade de maneira a filtrar apenas as variantes corretas (variantes que obedecem aos parâmetros) e a descartar as variantes erradas (variantes que não obedecem aos parâmetros), isto leva a que variantes falsas que obedecem aos parâmetros sejam consideradas e variantes verdadeiras que não obedecem aos parâmetros sejam descartadas. Embora isto não ocorra frequentemente constitui um grande problema que leva à perda de informação importante. A análise dos arquivos BAM no IGV permite verificar diretamente no alinhamento da sequência, permitindo uma avaliação manual da probabilidade de cada SNP.

4.2 Pesquisa de SNPs candidatos em genes alvo

O processo de pesquisa de potenciais SNPs candidatos para a farmacogenética da DM2 foi realizado em 6 genes alvo que foram agrupados consoante a classe de fármacos a qual estavam associados.

O processo de pesquisa de SNPs foi realizado no *GEMINI Browser* nos arquivos VCF, através da utilização de *queries* de pesquisa, que nos permitiram selecionar todos os SNPs referentes às regiões dos genes alvo selecionados. Após o levantamento dos SNPs foi realizada uma filtragem, de forma a excluir todos os SNPs já referenciados como estando associados à farmacogenética da DM2 em populações EUR, todos os SNPs na

região codificante do tipo sinónimo e todos os SNPs na região intrónica. De seguida os SNPs resultantes desta filtragem que apresentaram baixa frequência alélica na amostra em estudo foram analisados manualmente nos arquivos BAM no *software* IGV. Esta filtragem seguida de análise permitiu-nos selecionar um conjunto de potenciais SNPs candidatos, para uso futuro em estudos de exomas na população portuguesa referentes à DM2.

Resultados

1 Caracterização dos indivíduos em estudo

Os 51 indivíduos (25 homens e 26 mulheres) que constituem a amostra em estudo apresentam uma média de idades 61,3 anos (47-73 anos; valores correspondem à amplitude inter-quartis), um tempo médio de duração da DM2 de 15,0 anos (2,0-28,0 anos) e com os seguintes parâmetros bioquímicos médios: HbA1c 8,6% (0,6-17,6 %), lipoproteína de alta densidade (HDL) 42 mg/dl (8-93 mg/dl), lipoproteína de baixa densidade (LDL) 111 mg/dl (21-235 mg/dl), glicose 160 mg/dl (80-240 mg/dl), triglicéridos 161 mg/dl (50-341 mg/dl) e creatinina 0,98 mg/dl (0,39-1,98 mg/dl).

2 Caracterização terapêutica dos indivíduos em estudo

Da caracterização das terapias utilizadas, pelos indivíduos da amostra em estudo, no controlo dos níveis elevados de glicémia associados a DM2 verificou-se que eram muito diversificadas (anexo 2), ou seja, incluem desde monoterapia de insulina ou de antidiabéticos orais à combinação de vários tipos de insulina ou de antidiabéticos orais ou de insulina com antidiabéticos orais. Agrupando os 51 indivíduos da amostra em estudo verificou-se que 7 indivíduos utilizavam apenas como terapia antidiabéticos orais (a biguanida metformina, a sulfonilureia gliclazida e os inibidores de DPP-4 saxagliptina, sitagliptina e vildagliptina), 25 indivíduos recorriam à combinação de um ou de vários dos antidiabéticos orais já referidos (com um tipo ou vários tipos de insulina, nomeadamente, a insulina glargina, regular, lispro, aspártico, detemir, isofânica, humana e glulisina, 15 indivíduos recorriam à monoterapia ou combinação de vários tipos de insulina (referidos anteriormente nesta secção) e 4 indivíduos não utilizavam qualquer tipo de terapia. Esta distribuição terapêutica encontra-se representada na figura 11. Além

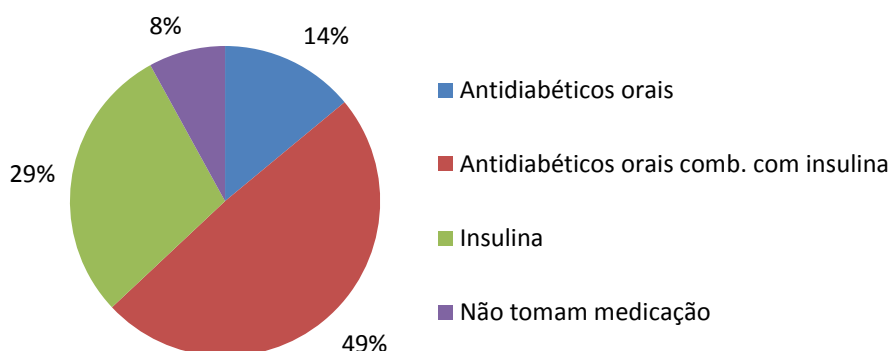


Figura 11 - Distribuição terapêutica dos doentes em estudo.

disso, notou-se que de todos os 51 indivíduos que constituam a amostra e que utilizavam antidiabéticas orais, 32 recorriam ao fármaco da classe das biguanidas, a metformina.

3 Sequenciação de exomas

Da sequenciação dos 51 exomas da amostra em estudo foram obtidas em média, $41207840,5 \pm 6883419,1$ (média \pm desvio padrão) *reads* por exoma com um comprimento de $177,1 \pm 7,3$ pares de bases, sendo que no total por exoma foram sequenciadas $7348706951 \pm 1360584822$ bases. Em média foram alinhadas pelo *software* TMAP, $40766328,4 \pm 6862627,5$ *reads* por exoma. Deste alinhamento para os 51 exomas obteve-se uma cobertura média $94,4 \pm 1,1\%$, uma uniformidade média de $88,3 \pm 9,2\%$, uma profundidade média $117,0 \pm 22,0$ e índices de qualidade Phred $\geq Q20$ para uma média $6104804787 \pm 1149736723$ bases.

Na tabela 3 são apresentados as métricas número de *reads*, comprimento médio das *reads*, *reads* alinhadas e a cobertura dos exomas, enquanto na tabela 4 são apresentadas as métricas cobertura média, uniformidade, bases por exoma e Q20 das bases. Estes parâmetros são apresentados individualmente para cada exoma da amostra em estudo.

Tabela 3- Métricas da sequenciação individuais para cada exoma.

Exomas (n°)	<i>Reads</i>	Comprimento médio das <i>reads</i>	<i>Reads</i> alinhadas	Cobertura média (%)
1	39475851	156	38453229	92,03%
2	40826569	173	40259514	93,96%
3	30429535	158	29810924	93,27%
4	18826142	158	18516510	91,97%
5	41616280	173	41053372	93,85%
6	42590625	169	42056606	92,55%
7	40948583	170	40455509	92,12%
8	19900837	155	19407650	89,58%
9	43259002	175	42666718	93,98%
10	49600229	176	48951888	94,33%
11	39974741	176	39431568	94,16%
12	48903410	186	48476194	95,28%
13	41205997	185	40831577	94,66%
14	36274911	176	35753958	93,80%
15	35951619	176	35456892	94,04%
16	48002044	180	47570535	94,50%
17	40083367	180	39713195	94,35%
18	37337574	179	37019520	94,13%
19	39278557	179	38941474	93,94%
20	42419848	181	42083706	94,59%
21	42679644	181	42355561	94,97%

Continuação tabela 3.

Exomas (n°)	Reads	Comprimento médio das reads	Reads alinhadas	Cobertura média (%)
22	45774550	180	45374642	94,77%
23	43321277	178	42919052	94,57%
24	38999534	179	38551920	94,17%
25	42831185	179	42482013	94,38%
26	39913125	177	39428313	94,12%
27	37791151	176	37295987	93,52%
28	43761063	180	43375715	94,71%
29	43043338	180	42658040	95,00%
30	32400073	173	32061479	94,57%
31	33290939	192	33119608	95,47%
32	49220309	180	48760850	94,91%
33	57174832	192	56797034	95,23%
34	60691023	175	60004978	93,78%
35	37135816	181	36873245	94,57%
36	45597068	181	45245685	95,18%
37	38128924	182	37822019	95,20%
38	41629125	180	41249229	95,20%
39	40035098	181	39685963	95,25%
40	43855710	178	43363608	94,81%
41	41050066	182	40683975	95,30%
42	44980850	180	44494031	94,87%
43	40848296	180	40451077	94,49%
44	42036777	179	41630753	95,21%
45	41488713	179	41059571	95,28%
46	40717144	181	40323607	95,57%
47	43692689	180	43292335	95,33%
48	48803289	179	48375752	95,17%
49	41916957	178	41542158	95,48%
50	39110357	175	38643370	95,24%
51	42775222	175	42250639	95,25%

Tabela 4- Métricas da sequenciação individuais para cada exoma. (Continuação)

Exomas (n°)	Cobertura média (%)	Uniformidade da cobertura (%)	Bases	Bases com >=Q20
1	95,55	74,65%	6176078225	4661499801
2	111,30	67,52%	7069611285	5795877137
3	75,33	68,34%	4829298957	3663992691
4	46,17	68,69%	2978352739	2392554878
5	113,80	68,45%	7225476759	5914540788
6	111,90	62,09%	7220022653	5975905354
7	107,90	61,78%	6990439626	5821517339
8	47,01	70,19%	3087734979	2471081009
9	120,70	89,89%	7612248799	6224876610

Continuação tabela 4.

Exomas (n°)	Cobertura média (%)	Uniformidade da cobertura(%)	Bases	Bases com >=Q20
10	139,40	89,09%	8766035663	7171046605
11	112,00	87,75%	7055306882	5777712718
12	145,10	92,74%	9107686902	7477596721
13	121,10	92,46%	7648264340	6263494559
14	101,50	93,16%	6385868043	5368723771
15	101,00	92,59%	6335083524	5349771332
16	138,70	91,87%	8678022143	7284175884
17	115,20	92,34%	7230718985	6044355427
18	106,80	92,09%	6708319621	5668891369
19	112,00	90,67%	7051254485	5969550514
20	123,10	91,95%	7712735656	6482347396
21	124,30	93,21%	7757968716	6565761096
22	132,80	92,92%	8279786713	7036804304
23	123,70	92,99%	7738023319	6499941678
24	111,50	91,58%	7001615760	5850600187
25	122,80	92,26%	7703968281	6466617316
26	112,70	90,92%	7079093012	5958174062
27	105,6	90,32%	6669474056	5609990749
28	126,2	91,37%	7901143963	6604556909
29	124,7	91,93%	7786737675	6489899319
30	90,04	91,03%	5637372052	4541602203
31	101,3	91,76%	6405668541	5182608543
32	142,1	92,18%	8863525892	7501741395
33	173,4	93,04%	11015639261	8864723356
34	168,4	93,10%	10621944075	8570832652
35	107,7	93,19%	6755649878	5764796043
36	132,7	92,52%	8271874491	6931632698
37	111,6	92,82%	6941588132	5927727050
38	120,7	92,38%	7504540367	6334323987
39	116,6	92,36%	7250538789	6146135025
40	125,4	92,62%	7831372370	6527004793
41	120,6	92,67%	7499239956	6316484926
42	130,5	92,91%	8141443584	6811050235
43	118,2	92,99%	7393012204	6308890776
44	121,3	92,87%	7547911454	6306321139
45	119,4	92,79%	7431004907	6178131258
46	118,9	91,95%	7376289514	6224456411
47	127,2	93,30%	7899040184	6693190435
48	140,6	92,81%	8752549846	7322895015
49	120,6	92,93%	7502697283	6239705038
50	110,3	91,92%	6862186196	5640543078
51	120,4	92,12%	7492593775	6148390577

4 Identificação de SNPs associados à farmacogenética da DM2

Com o objetivo de caracterizar a amostra em estudo e identificar um conjunto de potenciais SNPs candidatos para estudos futuros em relação à farmacogenética da DM2, procedeu-se ao levantamento dos SNPs já referenciados à farmacogenética da DM2. A pesquisa dos SNPs foi realizada em bases de dados e através de pesquisa bibliográfica. Ao todo foram identificados 98 SNPs em 47 genes. Estes SNPs encontram-se no anexo 1 divididos em várias tabelas consoante a classe de fármaco ao qual foram associados e também segundo o efeito demonstrado sobre a farmacodinâmica ou a farmacocinética. Além disso, o anexo 1 contém informação sobre o gene onde foi localizado o SNP, a alteração nucleotídica, as consequências da alteração e a referência do estudo onde o SNP foi relatado.

Dos 98 SNPs identificados 49 encontram-se na região codificante e 49 na região não codificante. Classificando estes 98 SNPs em relação ao local onde se encontram e à alteração provocada na proteína (caso se encontrem na região codificante) observou-se a seguinte distribuição, na região codificante: 37 SNPs do tipo *missense*, 4 do tipo *nonsense*, 6 do tipo sinónimo e 2 deleções; na região não codificante, 32 SNPs do tipo intrónica, 7 *upstream gene variant*, 5 na zona UTR, 1 na região de *splicing*, 2 *non coding exon variant* e 2 variantes intergénicas. Esta distribuição encontra-se representada na figura 12.

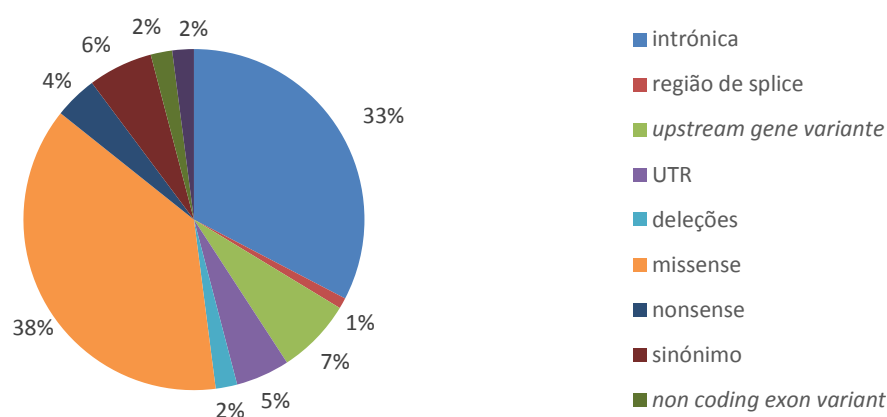


Figura 12- Distribuição dos 98 SNPs por tipo e localização.

Da análise dos 98 SNPs em relação à amostra onde foram estudados, apurou-se que 57 SNPs foram estudados em populações asiáticas, 42 em populações europeias, 5 na população americana, 1 na população africana, 10 em estudos *in vitro*, 13 em estudos realizados em várias populações e 7 sob o qual não foi possível determinar a população.

Na figura 13 é representada graficamente esta distribuição por população, todavia os SNPs que foram identificados em estudos *in vitro* ou em estudos referentes a amostras que contem indivíduos de várias populações, bem como todos os SNPs identificados em estudos no qual não foi possível identificar a população foram excluídos da representação. A população EUR representada na figura 13 engloba todos os SNPs identificados em estudos realizados nas populações do continente europeu, bem como todos os estudos referentes a populações caucasianas. As populações americana (AMR), africana (AFR) e asiática (ASN) também representadas são referentes apenas aos SNPs identificados nas populações que integram os respetivo continentes que as siglas representam.

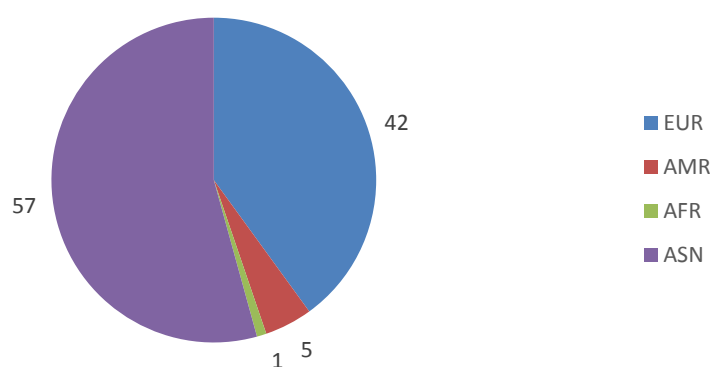


Figura 13- Distribuição dos 98 SNPs por população em estudo. Legenda: EUR- população europeia; AMR- população americana; ASN- população asiática; AFR- população africana.

Nesta distribuição verificou-se ainda que alguns SNPs estavam referenciados em mais de que uma das quatro populações anteriormente referidas, nomeadamente o SNP tipo *missense* localizado no gene ABCC8 rs757110 que se encontra referenciado nas populações AMR e ASN, os SNP tipo *missense* ambos localizados no gene CYP2C8 rs10509681 e rs11572080 que se encontram referenciado nas populações EUR e AMR e o SNP tipo intrónico localizado no gene NOS1AP rs10494366, o SNP localizado na região de *splicing* do gene ABCC8 rs1799854 e os SNPs tipo *missense* rs1801282, rs2306283, rs316019, rs5219, rs628031, rs8192678, rs1799853 e rs1057910, localizados respetivamente nos genes PPAR γ , SLCO1B1, SLC22A2, KCNJ11, SLC22A1, PGC-1 α e CYP2C9 (dois últimos), encontram-se referenciados nas populações EUR e ASN.

Quando agrupados os mesmos 98 SNPs, relativamente à classe de fármaco para o qual aparecem associados, constatou-se que 18% dos SNPs são referentes à classe das sulfonilureias, 24% à classe das meglitinidas, 30% à classe das tiazolidinedionas, 40% à classe das biguanidas, 6% à classe dos inibidores da α -glicosidase, 1% à classe dos

inibidores de DPP-4 e 6% classe do GLP-1 e análogos. Esta distribuição por classe encontra-se representada no anexo 1.

Da análise aos 98 SNPs verificou-se também que alguns se encontravam referenciados à farmacogenética de mais de que uma classe de fármacos. Os SNPs tipo intrónico rs163184 e rs10494366 localizados respetivamente, nos genes KCNQ1 e NOS1AP, o SNP localizado na região de *splicing* do gene ABCC8 rs1799854 e os SNPs tipo *missense* rs1057910 e rs5219 localizados respetivamente, nos genes CYP2C9 e KCNJ11, encontram-se associados às classes de fármacos sulfonilureias e meglitinidas. O SNP tipo intrónico rs163184 localizado no gene KCNQ1 e os SNPs tipo *missense* rs1801278, rs757110, rs5219, rs1799853 e rs1057910 localizados respetivamente, nos genes IRS1, ABCC8, KCNJ11 e CYP2C9 (dois últimos SNPs) encontram-se associados à classe de fármacos sulfonilureias e biguanidas. Destes resultados verificou-se ainda que os SNPs tipo *missense* rs1057910 e rs5219 foram comuns às classes de fármacos sulfonilureias, meglitinidas e biguanidas. Em relação às classes de fármacos biguanidas, inibidores da α -glicosidase e tiazolidinedionas foi referenciado um polimorfismo comum a estas três classes, nomeadamente, o SNP tipo *missense* rs1801282 localizado no gene PPAR γ , todavia quando restringido apenas às classes inibidores da α -glicosidase e tiazolidinedionas verificam-se existir três SNPs comuns, um de tipo sinónimo rs2241766 e um de tipo intrónico rs1501299 localizados no gene ADIPOQ e um tipo *missense* rs8192678 localizado no gene PGC-1 α . Por último, relativamente às classes de fármacos tiazolidinedionas e meglitinidas foram referenciados 8 SNPs comuns às duas classes, dos quais quatro eram do tipo *missense*, nomeadamente, os SNPs rs10509681 e rs11572080 ambos localizados no gene CYP2C8, o SNP rs13266634 localizado no gene SLC30A8 e o SNP rs4149056 localizado no gene SLCO1B1, três eram do tipo intrónico e estavam localizados no gene KCNQ1, respetivamente, rs2237892, rs2237895 e rs2237897, e um encontrava-se localizado na região *upstream* do gene UCP2, nomeadamente, SNP rs659366.

5 SNPs na região codificante do DNA referentes a populações EUR

Devido à amostra em estudo ser composta por exomas de uma população que se enquadra na população EUR, foram selecionados dos 98 SNPs identificados, apenas os SNPs referentes à população EUR (como referido anteriormente este grupo populacional engloba SNPs referentes a estudos realizados em populações do continente europeu e populações caucasianas) que demonstraram efeito na farmacogenética da DM2 e que se

encontrassem na região codificante. No total foram identificados 19 SNPs distribuídos por 10 genes. As alterações distribuíram-se por: 14 *missense*, 3 sinónimos e 2 deleções. Estes SNPs foram agrupados por classe de fármacos para o qual aparecia referenciado o seu efeito farmacogenético e encontram-se apresentados na tabela 5 juntamente com o gene onde se localizam, o tipo de SNP, a alteração causada pelo SNP na sequência de nucleótidos, os fármacos sob qual incidem os SNPs e as referências dos estudos (populações EUR) relativos às alterações farmacogenéticas para cada SNP.

Tendo como ponto de partida os 19 SNPs representados na tabela 5, procedeu-se ao seu levantamento na amostra em estudo. O levantamento como descrito na metodologia foi realizado através da análise dos arquivos VCF no *software* GEMINI. Além disso, e de forma a aumentar a confiança dos resultados também se procedeu à análise dos alinhamentos gerados para as regiões em estudo nos arquivos BAM no *software* IGV.

Deste levantamento verificou-se que à exceção das deleções com o rs72552763 e rs35167514 localizados no gene SLC22A1 e do SNP sinónimo rs1867351 localizados no gene SLC22A1 todos os outros foram identificados na amostra em estudo.

Os resultados obtidos do levantamento (encontram-se representados individualmente para cada SNP no anexo 3) permitiram-nos apurar qual a distribuição de genótipos na amostra em estudo para cada posição onde se encontravam cada um dos 16 SNPs relatados. Estes resultados, bem como a frequência alélica na população EUR (1000 genomas) e na amostra em estudo são exibidos seguidamente na tabela 6. Da análise destes resultados verificou-se que os indivíduos portadores destes SNPs exibem em $\approx 71\%$ das vezes o genótipo homocigótico que contém o alelo de referência, $\approx 20\%$ o genótipo heterocigótico que contém o alelo de referência e o alelo variante e $\approx 4\%$ o genótipo homocigótico que contém o alelo variante, em $\approx 5\%$ dos genótipos não foi possível determinar devido à baixa cobertura de alguns exomas nas posições destes SNPs. Estes valores foram obtidos através da divisão do número de genótipos (relativamente apenas aos 16 SNPs relatados) que apresentavam uma determinada característica (exemplo ser homocigótico para o alelo de referencia) nos 51 indivíduos da amostra em estudo, pelo número total de genótipos dos 51 indivíduos da amostra em estudo relativamente aos 16 SNPs.

Tabela 5 - Caracterização dos SNPs identificados associados á farmacogenética da DM2 em populações EUR e em região exônica, relativamente ao fármaco. Legenda. Ref- referência; Alt- alteração.

Gene	Nucleótido ref>alt (refSNP)	Tipo de SNP	Fármacos	Referência
Classe de fármacos sulfonilureias				
ABCC8	c.3819G>A (rs1799859)	sinónimo	Sulfonilureias no geral	(97)
	c.2277C>T (rs1801261)	sinónimo	Tolbutamida	(98)
CYP2C9	*2 (c.430C>T (rs1799853)) *3 (c.1075A>C (rs1057910))	Ambas <i>missense</i>	Glibenclamida	(99)
			Glimepirida	(100)
			Tolbutamida	(101) e (102)
			Sulfonilureias no geral	(103) e (104)
IRS1	c.2911G>A (rs1801278)	<i>missense</i>	Sulfonilureias no geral	(105) e (106)
KCNJ11	c.67A>G(rs5219)	<i>missense</i>	Gliclazida	(107)
			Sulfonilureias no geral	(108) e (109)
Classe de fármacos meglitinidas				
CYP2C8	*3 (c.986A>G (rs10509681) e c.206G>A (rs11572080))	Ambas <i>missense</i>	Repaglinida	(110) e (111)
CYP2C9	*3 (c.1075A>C (rs1057910))	<i>missense</i>	Nateglinida	(112)
SLCO1B1	c.521T>C (rs4149056) c.388A>G (rs2306283)	<i>missense</i>	Repaglinida	(113)
			Nateglinida	(114)
			Repaglinida	(114)
Classe de fármacos tiazolidinedionas				
CYP2C8	*3 (c.986A>G (rs10509681) e c.206G>A (rs11572080))	Ambas <i>missense</i>	Rosiglitazona	(115)
			Pioglitazona	(116) e (117)
Classe de fármacos biguanidas				
SLC22A1	c.1260_1262delGAT (rs72552763) e c.1258delA (rs35167514) c.181C>T (rs12208357) c.1201G>A (rs34130495) c.1393G>A (rs34059508) c.156T>C (rs1867351)	Ambas deleções	Metformina	(118)
		<i>missense</i>	Metformina	
		<i>missense</i>	Metformina	
		<i>missense</i>	Metformina	
		sinónimo	Metformina	
PPAR γ	c.34C>G (rs1801282)	<i>missense</i>	Metformina	(119)
Classe de fármacos inibidores da α-glicosidase				
PGC-1 α (PPARGC1A)	c.1444G>A (rs8192678)	<i>missense</i>	Acarbose	(72)
Classe de fármacos GLP-1 e análogos				
THADA	c.3559A>G (rs7578597)	<i>missense</i>	GLP-1	(66)

Os genótipos constituídos apenas pelo alelo de referência (genótipos homozigóticos) eram mais abundantes do que os genótipos que continham o alelo variante, excetuando os SNPs *missense* rs5219, rs1799859 e rs8192678 localizados respetivamente nos genes KCNJ11, ABCC8 e PGC-1 α em que se verificou uma maior abundância dos genótipos heterozigóticos. Para o SNP rs2306283 localizado no gene SLCO1B1 não foi possível determinar qual o genótipo mais abundante, devido à reduzida

Tabela 6 - Distribuição genotípica e frequências alélicas na amostra em estudo e na população EUR, para os 16 SNPs relacionados. Legenda. Ref- referência; Alt- alteração; *- Frequência alélica que não engloba a totalidade dos resultados (regiões de reduzida cobertura).

Gene	Nucleótido ref>alt (refSNP)	Frequência genotípica (n)	Frequência alélica nos 51 exomas	Frequência alélica na população EUR (1000 genomas)
CYP2C9	*2 (c.430C>T (rs1799853))	*1/*1:0,84 (43) *1/*2:0,16 (8)	0,08 (T)	0,12 (T)
	*3 (c.1075A>C (rs1057910))	*1/*1:0,92 (47) *1/*3:0,08 (4)	0,04 (C)	0,06 (C)
CYP2C8	*3 (c.986A>G (rs10509681) e c.206G>A (rs11572080))	A/A:0,86 (44) A/G:0,14 (7)	0,07 (G)	0,11 (G)
		G/G: 0,86 (44) G/A:0,14 (7)	0,07 (A)	0,11 (A)
IRS1	c.2911G>A (rs1801278)	G/G:0,88 (45) G/A:0,12 (6)	0,06 (A)	0,07 (A)
KCNJ11	c.67A>G (rs5219)	A/A:0,22 (11) A/G:0,43 (22) G/G:0,35 (18)	0,57 (G)	0,66 (G)
ABCC8	c.3819G>A (rs1799859)	G/G:0,41 (21) G/A:0,53 (27) A/A:0,06 (3)	0,32 (A)	0,27 (A)
	c.2277C>T (rs1801261)	C/C:0,92 (47) C/T:0,08 (4)	0,04 (T)	0,04 (T)
SLCO1B1	c.521T>C (rs4149056)	T/T:0,57 (29) T/C:0,27 (14)	0,14* (C)	0,17 (C)
	c.388A>G (rs2306283)	A/A:0,20 (10) A/G:0,24 (12) G/G:0,10 (5)	0,22* (G)	0,40 (G)
SLC22A1	c.181C>T (rs12208357)	C/C:0,92 (47) C/T:0,08 (4)	0,04 (T)	0,06 (T)
	c.1201G>A (rs34130495)	G/G:0,96 (49) G/A:0,04 (2)	0,02 (A)	0,02 (A)
	c.1393G>A (rs34059508)	G/G:0,88 (45) G/A:0,10 (5)	0,05* (A)	0,01 (A)
PPAR γ	c.34C>G (rs1801282)	C/C:0,71 (36) C/G:0,20 (10)	0,09* (G)	0,12 (G)
PGC-1 α (PPARGC1A)	c.1444G>A (rs8192678)	G/G:0,29 (15) G/A:0,53 (27) A/A:0,10 (6)	0,38* (A)	0,36(A)
THADA	c.3559A>G (rs7578597)	A/A:0,86 (44) A/G:0,14(7)	0,07(G)	0,09(G)

cobertura que se fez notar na região deste polimorfismo (cobertura reduzida em 24 indivíduos). Os SNPs rs4149056 (cobertura reduzida em 8 indivíduos), rs34059508 (cobertura reduzida em 1 indivíduo), rs1801282 (cobertura reduzida em 5 indivíduos) e o rs8192678 (cobertura reduzida em 3 indivíduos), localizados nos genes SLCO1B1, SLC22A1, PPAR γ e PGC-1 α , respetivamente, também não foi possível determinar todos

os genótipos devido à cobertura reduzida. Porém nestes SNPs já foi possível inferir qual a frequência genotípica (genótipo mais comum), visto que a distribuição dos genótipos apresentam diferenças maiores que não se alterariam com a adição dos genótipos restantes (genótipos não determinados devido à baixa cobertura).

A determinação dos genótipos para os 51 indivíduos da amostra relativamente aos 16 SNPs em estudo permitiu-nos também verificar quantos destes SNPs cada indivíduo era portador relativamente às classes de fármacos (tabela 7). Em relação aos 6 SNPs rs1799859 e rs1801261 localizados no gene ABCC8, rs1799853 e rs1057910 localizados no gene CYP2C9, rs1801278 localizado no gene IRS1 e o rs5219 localizado no gene KCNJ11, referenciados na população EUR para classe das sulfonilureias verificou-se que 8% dos indivíduos não eram portadores de nenhum destes SNPs, 29% eram portadores de 1, 39% portadores de 2, 22% portadores de 3 e 2% portadores de 4. Nos 5 SNPs referenciados na classe das meglitinidas, nomeadamente, rs10509681 e rs11572080 localizados no gene CYP2C8, rs1057910 localizado no gene CYP2C9 e os rs4149056 e rs2306283 localizados no SLC11B1 verificou-se que 45% não eram portadores de nenhum, 24% eram portadores de 1, 25% portadores de 2, 4% eram portadores 3 e 2% eram portadores 4. Na classe das tiazolidinedionas foram referenciados 2 SNPs rs10509681 e rs11572080 localizados no gene CYP2C8, verificou-se para estes SNPs que 86% não era portador de nenhum e 14% eram portadores de 2. Nos 4 SNPs referenciados para a classe das biguanidas, nomeadamente, rs12208357, rs34130495 e rs34059508 localizados no gene SLC22A1 e rs1801282 localizado no gene PPAR γ verificou-se que 61% não era portador de nenhum, 37% eram portadores de 1 e 2% era portador de 2. Na classe dos inibidores da α -glicosidase para o SNP referenciado rs8192678 e localizado no gene PGC-1 α verificou-se que 35% não era portador de nenhum e 65% eram portadores de 1. Por último na classe análogos GLP-1 (ou GLP-1) onde foi referenciado apenas o SNP rs7578597 localizado no gene THADA verificou-se que 86% não eram portadores de nenhum e 14% eram portadores de 1. Para estes cálculos não foram considerados os cinco SNPs onde não foi possível determinar o genótipo para todos os indivíduos.

Os SNPs rs10509681 e rs11572080 localizados no gene CYP2C8 foram referenciados para a classe de fármacos tiazolidinedionas e meglitinidas, enquanto que o SNP rs1057910 localizado no gene CYP2C9 foi referenciado para a classe das sulfonilureias e meglitinidas.

Tabela 7- Número de SNPs por indivíduo da amostra em estudo, relativamente à classe de fármaco.

Número de SNP	0 SNP	1 SNP	2 SNP	3 SNP	4 SNP
Sulfoniluréias	4	15	20	11	1
Meglitinidas	23	12	13	2	1
Tiazolidinedionas	44	0	7	0	0
Biguanidas	31	19	1	0	0
Inibidores da α-glicosidase	18	33	0	0	0
Análogos GLP-1 (ou GLP-1)	44	7	0	0	0

Da análise dos resultados das frequências alélicas para os 16 SNPs na população EUR (1000 genomas - tabela 6) verificou-se que à exceção dos SNPs tipo *missense* rs34130495 e rs34059508 localizados no gene SLC22A1, todos outros eram comuns (frequências alélicas maiores que 5%). Em relação às frequências alélicas dos mesmos 16 SNPs na amostra em estudo, verificou-se que para os 11 SNPs no qual foi possível determinar a totalidade dos genótipos, que as frequências alélicas foram idênticas às verificadas na população EUR (1000 genomas). Os restantes 5 SNPs não foi possível analisar dado não se conseguir determinar a suas frequências alélicas na amostra em estudo, isto devido a alguns indivíduos apresentarem reduzidas coberturas na posição destes SNPs, o que impossibilitou a determinação dos alelos. É importante realçar que na análise foi considerada apenas a frequência alélica da população EUR total (1000 genomas), e não de subdivisões da população, nomeadamente, a subpopulação CEU (residentes no Utah com ascendência no norte ou no ocidente da europa), TSI (Toscani na Itália), FIN (finlandeses na Finlândia) GBR (britânicos na Inglaterra e na Escócia) e IBS (população ibérica na Espanha).

6 SNPs na região codificante do DNA referentes a outras populações

Dos 49 SNPs identificados na região codificante do DNA foram apenas analisados nesta secção os 30 SNPs (23 do tipo *missense*, 4 do tipo *nonsense* e 3 do tipo sinónimo) que não se encontravam referenciados em populações EUR e os 2 SNPs do tipo *missense* rs5219 e rs1801278 localizados respetivamente nos genes KCNJ11 e PPAR γ que se encontravam referenciados em populações EUR. Estes 2 SNPs constituem duas exceções (visto estarem referenciados em populações EUR), sendo que apenas foram selecionados pelo fato de também estarem referenciados em populações não EUR para classes de fármacos antidiabéticos diferentes das referenciadas nas populações EUR.

A análise destes SNPs não nos dá informação farmacogenéticas para DM2 na população em estudo (população EUR), visto que não aparecem descritos em populações EUR para esta doença e quando aparecem não se referem às mesmas classes de fármacos antidiabéticos, porém a sua análise, nomeadamente, a nível da distribuição dos genótipos e frequências constitui uma importante referência para estudos futuros em populações EUR.

O levantamento dos SNPs foi realizado no GEMINI *browser* nos arquivos VCF. Nos parágrafos seguintes é realizada a análise dos resultados deste levantamento, relativamente aos 32 SNPs selecionados. Esta análise foi realizada de forma individual para cada classe de fármacos.

Cinco dos 32 SNPs estão relacionados com a classe das sulfonilureias, nomeadamente, o SNP tipo *missense* rs757110 localizado no gene ABCC8 que se encontra associado aos fármacos glibepirida, glibenclamida e gliclazida, o SNP tipo *missense* rs9332239 localizado no gene CYP2C9 que se encontra associado ao fármaco tolbutamida, o SNP tipo sinónimo rs4244285 e o SNP tipo *nonsense* rs4986893 ambos localizados no gene CYP2C19 e que se encontram associados ao fármaco gliclazida e o SNP *missense* rs9282541 localizado no gene ABCA1 que se encontra associado ao fármaco glibenclamida. Quando realizado o levantamento destes SNPs na amostra em estudo verificou-se que só os 2 SNPs rs757110 e rs4244285 foram encontrados. Analisando as frequências genótípicas exibidas na tabela 8 para os 2 SNPs verificou-se que para o SNP rs757110 existia uma predominância do genótipo com a alteração, resultado contrário ao observado para o SNP rs4244285.

Quanto às frequências alélicas para estes 5 SNPs na população EUR (1000 genomas), também exibidas na tabela 8, verificou-se que à exceção dos 2 SNPs relatados na amostra em estudo todos os outros SNPs eram raros, na medida em que apresentavam frequências alélicas inferiores a 5%, quando comparadas as frequências alélicas da amostra em estudo com as observadas na população EUR verificou-se serem semelhantes apresentando pequenas discrepâncias devido aos motivos já explicados na secção anterior.

Para a classe das meglitinidas foram identificados 7 SNPs do tipo *missense*, representados na tabela 9, todos eles associados ao fármaco repaglinida. Do levantamento destes SNPs na amostra em estudo verificou-se que à exceção do SNP rs28371759 localizado no gene CYP3A4 e do SNP rs114202595 localizado no gene PAX4, todos os

Tabela 8- SNPs associados à farmacogenética das sulfonilureias na região codificante do DNA e referentes a populações não caucasianas. Legenda. Ref- referência; Alt- alteração.

Gene	Nucleótido ref>alt (refSNP)	Tipo de SNP	Frequência genotípica (n)	Frequência alélica nos 51 exomas	Frequência alélica na população EUR (1000 genomas)
ABCC8	c.4105G>T (rs757110)	<i>missense</i>	G/G:0,22(11) G/T:0,41(21) T/T:0,37(19)	0,58(T)	0,66(T)
ABCA1	c.688C>T (rs9282541)	<i>missense</i>	C/C:1,00(51)	0,00(T)	0,00(T)
CYP2C9	c.1465C>T (rs9332239)	<i>missense</i>	C/C:1,00(51)	0,00(T)	0,00(T)
CYP2C19	c.681G>A (rs4244285)	sinónimo	G/G:0,74(38) G/A:0,20(10) A/A:0,06(3)	0,16(A)	0,15(A)
	c.636G>A (rs4986893)	<i>nonsense</i>	G/G:1,00(51)	0,00(A)	0,00(A)

outros foram identificados. Analisando a distribuição dos genótipos representados na tabela 9, verificou-se que à exceção dos SNPs (rs13266634 e rs16889462 localizados no gene SLC30A8, todos os outros SNPs identificados tinham uma predominância dos genótipos alterados. Relativamente à análise das frequências na população EUR (1000 genomas) verificou-se que todos os SNPs eram comuns (frequência > 5%) à exceção dos SNP não relatados na amostra em estudo. Para o SNP rs16889462 não foi possível comparar pelo motivo de não se encontrar descrito na população EUR (1000 genomas).

Tabela 9- SNPs associados à farmacogenética das meglitinidas na região codificante do DNA e referentes a populações não EUR. Legenda. Ref- referência; Alt- alteração.

Gene	Nucleótido ref>alt (refSNP)	Tipo de SNP	Frequência genotípica (n)	Frequência alélica nos 51 exomas	Frequência alélica na população EUR (1000 genomas)
ABCB1	c.2677T>A ou c.2677T>G (rs2032582)	<i>missense</i>	T/T:0,18(9) T/G:0,35(18) G/A:0,02(1) G/G:0,45(23)	0,47(G)	0,57(G)
KCNJ11	c.67A>G (rs5219)	<i>missense</i>	A/A:0,22(11) A/G:0,43(22) G/G:0,35(18)	0,57(G)	0,66(G)
PAX4	c.361C>T (rs114202595)	<i>missense</i>	C/C:1,00(51)	0,00(T)	0,00(T)
CYP3A4	c.875T>C (rs28371759)	<i>missense</i>	T/T:1,00(51)	0,00(C)	0,00(C)
SLC30A8	c.826C>T (rs13266634)	<i>missense</i>	C/C:0,53(27) C/T:0,45(23) T/T:0,02(1)	0,25(T)	0,29(T)
	c.827G>A (rs16889462)	<i>missense</i>	G/G:0,96(49) G/A:0,02(1) G/T:0,02(1)	0,01(A)	Não referenciado
NeuroD1/ β2	c.133G>A (rs1801262)	<i>missense</i>	A/A:0,24(12) A/G:0,29(15) G/G:0,47(24)	0,62(G)	0,60(G)

Na classe das biguanidas foram identificados 9 SNPs (8 tipo *missense* e 1 tipo *nonsense*), representados na tabela 10. Do levantamento destes SNPs na amostra em estudo verificou-se que à exceção dos SNPs rs201919874 e rs145450955 localizados ambos no gene SLC22A2, do SNP rs2282143 localizado no gene SLC22A1 e dos SNPs rs35646404 e rs35790011 localizados ambos no gene SLC47A1, todos os outros foram identificados. Através da análise da distribuição dos genótipos para os SNPs relatados na amostra em estudo exibidos na tabela 10, verificou-se que apenas o SNP rs1801278 localizado no gene IRS1 tinha uma predominância do genótipo de referência. Quando analisadas as frequências alélicas destes 9 SNPs na população EUR (1000 genomas) apurou-se que 5 SNPs eram raros (frequências <5%), nomeadamente, os 5 SNPs não encontrados na amostra em estudo. Comparando as frequências alélicas observadas para os 9 SNPs na população EUR (1000 genomas) com as da amostra em estudo apuraram-se resultados idênticos aos anteriores, com frequências próximas em ambas as amostras.

Tabela 10- SNPs associados à farmacogenética das biguanidas na região codificante do DNA e referentes a populações não EUR. Legenda. Ref- referência; Alt- alteração.

Gene	Nucleótido ref>alt (refSNP)	Tipo de SNP	Frequência genotípica (n)	Frequência alélica nos 51 exomas	Frequência alélica na população EUR (1000 genomas)
ABCC8	c.4105G>T (rs757110)	<i>missense</i>	G/G:0,22(11) G/T:0,41(21) T/T:0,37(19)	0,58(T)	0,66(T)
KCNJ11	c.67A>G (rs5219)	<i>missense</i>	A/A:0,22(11) A/G:0,43(22) G/G:0,24(12)	0,57(G)	0,66(G)
IRS1	c.2911G>A (rs1801278)	<i>missense</i>	G/G:0,88(45) G/A:0,12(6)	0,06(A)	0,07(A)
SLC22A1	c.1022C>T (rs2282143)	<i>missense</i>	C/C:1,00(51)	0,00(T)	0,01(T)
	c.480G>C (rs683369)	<i>missense</i>	G/G:0,04(2) G/C:0,29(15) C/C:0,67(34)	0,81(C)	0,79(C)
SLC22A2	c.596C>T (rs201919874)	<i>missense</i>	C/C:1,00(51)	0,00(T)	0,00(T)
	c.602C>T (rs145450955)	<i>missense</i>	C/C:1,00(51)	0,00(T)	0,00(T)
SLC47A1	c.476C>T (rs35646404)	<i>nonsense</i>	C/C:1,00(51)	0,00(T)	0,00(T)
	c.1012G>A (rs35790011)	<i>missense</i>	G/G:1,00(51)	0,00(A)	0,00(A)

Em relação à classe das tiazolidinedionas foram identificados 11 SNPs (8 tipo *missense*, 1 tipo *nonsense* e 2 tipo sinónimo) apresentados na tabela 11, sendo que à exceção do SNP rs11572103 localizado no gene CYP2C8 e do SNP rs328 localizado no gene LPL que se encontram associados ao fármaco pioglitazona, os restantes encontram-

se associados ao fármaco rosiglitazona. Do levantamento destes SNPs na amostra em estudo verificou-se que todos à exceção do SNPs rs78637571 localizado no gene CYP2C8 e do SNP rs4149313 localizado no gene ABCA1 estavam presentes. Analisando os genótipos obtidos para cada um destes SNPs verificou-se que apenas nos 5 SNP rs11572103, rs13266634, rs2241766, rs4994 e rs328, localizados respetivamente nos genes CYP2C8, SLC30A8, ADIPOQ, ADDR3 e LPL existia uma maior predominância dos genótipos de referência. Quando analisadas as frequências alélicas demonstradas para estes 11 SNPs na população EUR (1000 genomas) verificou-se que todos os SNPs à exceção do SNP tipo *nonsense* rs78637571 e do SNP tipo *missense* rs11572103 eram comuns. Da comparação das frequências da amostra em estudo com as frequências da população EUR (1000 genomas) verificaram-se resultados semelhantes aos que já se tinham observado para as classes de fármacos anteriores.

Tabela 11- SNPs associados á farmacogenética das tiazolidinedionas na região codificante do DNA e referentes a populações não EUR. Legenda. Ref- referencia; Alt-alteração.

Gene	Nucleótido ref>alt (refSNP)	Tipo de SNP	Frequência genotípica (n)	Frequência alélica nos 51 exomas	Frequência alélica na população EUR (1000 genomas)
ABCA1	c.656G>A (rs2230806)	<i>missense</i>	G/G:0,49(25) G/A:0,43(22) A/A:0,08(4)	0,29(A)	0,24(A)
	c.2649A>G (rs4149313)	<i>missense</i>	A/A:1,00(51)	0,00(G)	0,12(G)
	c.4760A>G (rs2230808)	<i>missense</i>	A/A:0,04(2) A/G:0,39(20) G/G:0,57(29)	0,76(G)	0,79(G)
ADIPOQ	c.45T>G (rs2241766)	sinónimo	T/T:0,63(32) T/G:0,29(15) G/G:0,08(4)	0,23(G)	0,11(G)
ADRB3	c.190T>C (rs4994)	<i>missense</i>	T/T:0,78(40) T/C:0,22(11)	0,11(C)	0,08(C)
LPL	c.1421C>G (rs328)	<i>missense</i>	C/C:0,75(38) C/G:0,25(13)	0,13(G)	0,10(G)
CYP2C8	c.610G>T (rs78637571)	<i>nonsense</i>	G/G:1,00(51)	0,00(T)	0,00(T)
	c.595A>T (rs11572103)	<i>missense</i>	T/T:0,98(50) T/A:0,02(1)	0,01(A)	0,0013(A)
SLC30A8	c.826C>T (rs13266634)	<i>missense</i>	C/C:0,53(27) C/T:0,45(23) T/T:0,02(1)	0,25(T)	0,29(T)
PGC-1 α (PPARGC1A)	c.1182A>G (rs2970847)	sinónimo	A/G:0,33(17) G/G:0,66(34)	0,83(G)	0,82(G)
	c.1444G>A (rs8192678)	<i>missense</i>	G/G:0,33(17) G/A:0,55(28) A/A:0,12(6)	0,39(A)	0,36(A)

Para a classe dos inibidores da α -glicosidase foi identificado um SNP tipo sinónimo rs2241766, localizado no gene ADIPOQ, representado na tabela 12 e associado ao fármaco acarbose. Da análise dos genótipos obtidos verificou-se uma predominância no genótipo de referência, como se pode observar na tabela 12. Quanto à análise da frequência alélica para este SNP na população EUR (1000 genomas) apurou-se que o SNP era comum (frequência <5%). Comparando a frequência alélica observada para este SNP na população EUR (1000 genomas) com a amostra em estudo verificou-se uma maior frequência alélica na amostra em estudo.

Tabela 12- SNPs associados á farmacogenética dos inibidores da α -glicosidase na região codificante do DNA e referentes a populações não EUR. Legenda. Ref- referência; Alt-alteração.

Gene	Nucleótido ref>alt (refSNP)	Tipo de SNP	Frequência genotípica (n)	Frequência alélica nos 51 exomas	Frequência alélica na população EUR (1000 genomas)
ADIPOQ	c.45T>G (rs2241766)	sinónimo	T/T:0,63(32) T/G:0,29(15) G/G:0,08(4)	0,23(G)	0,11(G)

Por último a classe dos GLP-1 e análogos. Para esta classe foram identificados 2 SNPs *missense* rs6923761 e rs3765467 localizados no gene GLP1R associados ao fármaco GLP-1. Efetuado o levantamento deste 2 SNPs na amostra verificou-se que apenas o SNP rs6923761 se encontrava presente. Da análise dos genótipos obtidos, verificou-se uma predominância do genótipo de referência, como se pode observar na tabela 13. Em relação à frequência alélica na população EUR (1000 genomas) para estes 2 SNPs apurou-se que o SNP não referenciado era raro (frequência <5%), comparando as frequências alélicas observadas para estes 2 SNPs na população EUR (1000 genomas) com as da amostra em estudo obteve-se resultados idênticos com pequenas discrepâncias (tabela 13).

Tabela 13- SNPs associados á farmacogenética dos GLP-1 e análogos na região codificante do DNA e referentes a populações não EUR. Legenda. Ref- referência; Alt-alteração.

Gene	Nucleótido ref>alt (refSNP)	Tipo de SNP	Frequência genotípica (n)	Frequência alélica nos 51 exomas	Frequência alélica na população EUR (1000 genomas)
GLP1R	c.502G>A (rs6923761)	<i>missense</i>	G/G:0,63(32) G/A:0,31(16) A/A:0,06(3)	0,22(A)	0,33(A)
	c.392G>A (rs3765467)	<i>missense</i>	G/G:1,00(51)	0,00(G)	0,00(A)

7 Identificação de SNPs candidatos em genes alvo

Um outro objetivo deste estudo foi identificar novos SNPs existentes na amostra em estudo referentes a um conjunto de genes alvo previamente selecionados, com isso pretendeu-se identificar um conjunto de potenciais SNPs candidatos, que possam ser aplicados em estudos futuros da farmacogenética da DM2.

O levantamento dos potenciais SNPs candidatos associados à farmacogenética da DM2 foi realizado em 6 genes alvo (ABCC8, KCNJ11, SLC22A1, SLC22A2, CYP2C8 e CYP2C9). Os motivos para a seleção destes genes prendeu-se com o facto de em todos eles estarem referenciados SNPs com impacto para farmacogenética da DM2 e pelo facto destes genes se encontrem envolvidos em vários mecanismos relacionados com o local alvo, o transporte e a metabolização de vários fármacos utilizados como terapia para a DM2. Além disso, estes genes cobrem várias classes de fármacos, nomeadamente, as sulfonilureias, as meglitinidas, as tiazolidinedionas e as biguanidas. Estes motivos fazem destes 6 genes ótimos candidatos de estudo para identificação de potenciais SNPs relacionados com a farmacogenética destas classes de fármacos.

No levantamento dos potenciais SNPs candidatos nos 6 genes selecionados realizado nos arquivos VCF, através da utilização do GEMINI *browser* foram identificados no total 143 SNPs, dos quais 105 constituíam polimorfismos conhecidos (referenciados) e os restantes 38 correspondiam a polimorfismos desconhecidos (não referenciados). Além disso apurou-se que do total dos 143 polimorfismos relatados, 54 encontram-se na região codificante e 89 na região não codificante.

Agrupando estes SNPs consoante o tipo polimorfismo, verificou-se que dos 54 SNPs encontradas na região codificante, 23 são tipo *missense*, 25 são tipo sinónimo e 6 são tipo *indel*, em relação à região não codificante 81 SNPs são tipo intrónico, 4 SNPs estão na região UTR e 4 variantes encontram-se na região de *splicing*, esta distribuição encontra-se representada sob a forma de percentagens na figura 14.

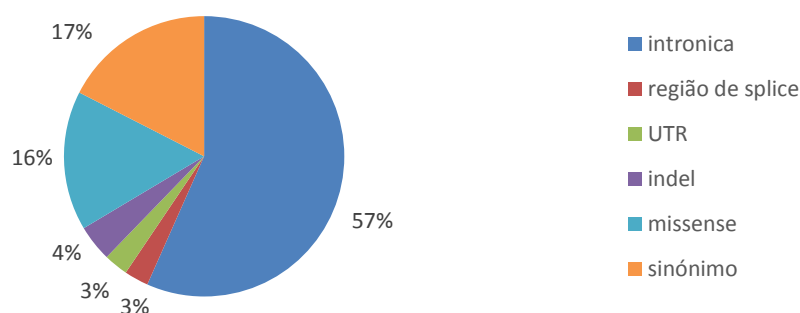


Figura 14-Distribuição dos 143 SNPs identificados por tipo de SNP.

De seguida para cada um dos 6 genes alvo efetuou-se a mesma distribuição, com base no tipo de variante (tabela 14).

Tabela 14- Distribuição dos diferentes tipos de SNP nos 6 genes selecionados. Legenda. Ref- referência; Alt-alteração.

Gene	ABCC8	KCNJ11	SLC22A1	SLC22A2	CYP2C8	CYP2C9
Nº de variantes total:	56	9	25	17	22	14
<i>Missense</i>	4	3	8	2	4	2
Sinónimos	10	6	1	5	1	2
<i>Frameshift</i>	1	-	4	-	-	-
Intrónicas	38	-	12	9	15	8
<i>UTR</i>	-	-	-	1	2	1
<i>Região de Splice</i>	3	-	-	-	-	1

Com base no conjunto de 143 SNPs candidatos levantados nos 6 genes alvo decidiu-se seleccionar apenas os SNPs encontrados na região codificante, menos os SNPs sinónimos e os SNPs que já se encontravam descritos como associados à farmacogenética. No total foram seleccionadas 15 SNPs (10 SNPs tipo *missense* e 5 *indels*), dos quais 7 SNPs não se encontrando descritos nem referenciados e 8 SNPs já referenciados mas não associadas à farmacogenética de nenhuma das classes de fármacos antidiabéticos utilizados como terapia para a DM2. Os 7 SNPs não referenciados encontram-se exibidos na tabela 15, juntamente com os genes onde foram encontrados, tipo de variações, distribuições genotípicas e frequências alélicas na amostra em estudo. Os 8 SNPs referenciados encontram-se representados na tabela 16, juntamente com os genes onde foram encontrados, tipo de variações, distribuições genotípicas, frequências alélicas na amostra em estudo e na população EUR (1000 genomas). O motivo para a seleção de SNP apenas na região codificante, quando a amostra em estudo é constituída por exomas, deve-se ao facto de na sequenciação de exomas serem sequenciados como um subproduto regiões não codificantes tais como intrões, regiões no limite exão-intrão, UTRs e regiões intergénicas. Enquanto o motivo de exclusão dos SNPs sinónimos foi pela maioria deste tipo de SNPs não ter impacto na função da proteína. Por último o motivo de exclusão dos SNPs que já se encontravam descrito para a farmacogenética da DM2 foi pelo facto de já terem sido abordados nas secções anteriores.

Da análise dos 7 SNPs (5 *indels* e 2 *missense*) não referenciados (tabela 15) verificou-se que apenas 2 SNPs (*indels*) foram identificados em mais do que um exoma, nomeadamente, o SNP NM_003057:c.1258_1260delATG localizado no gene SLC22A1 que foi referenciado em 15 exomas, 12 em heterozigotia e 3 em homozigotia e o SNP NM_003057:c.156delT localizado no gene SLC22A1 que foi referenciado em 17 exomas,

16 em heterozigotia e 1 em homozigotia. Os restantes 5 SNPs (3 *indels* e 2 *missense*) foram referenciados apenas uma única vez, sendo que 4 (NM_000352:c.3610G>C, NM_000352:c.2319G>A, NM_003057:c.368_369insG e NM_003057:c.240delG) foram referenciados em heterozigotia e 1 (NM_000352:c.1611_1612insG) em homozigotia.

Tabela 15- SNPs não referenciados. Legenda. RefSeq- NCBI reference sequence database; Ref- referenciam; Alt- alteração; Crom- cromossoma.

Gene	RefSeq Nucleótido ref>alt	Tipo variante	Frequência genotípica (n)	Frequência alélica nos 51 exomas
ABCC8	NM_000352:c.1611_1612insG	<i>indel</i>	-/-:0,98(50) G/G:0,02(1)	0,02(G)
	NM_000352:c.3610G>C	<i>missense</i>	G/G:0,98(50) G/C:0,02(1)	0,01(G)
	NM_000352:c.2319G>A	<i>missense</i>	G/G:0,98(50) G/A:0,02(1)	0,01(A)
SLC22A1	NM_003057:c.368_369insG	<i>indel</i>	-/-:0,98(50) -/G:0,02(1)	0,01(G)
	NM_003057:c.156delT	<i>indel</i>	T/T:0,67(34) T/-:0,31(16) -/-:0,02(1)	0,18(T)
	NM_003057:c.240delG	<i>indel</i>	G/G:0,98(50) G/-:0,02(1)	0,01(G)
	NM_003057:c.1258_1260delA TG	<i>indel</i>	ATG/ ATG:0,71(36) ATG/-:0,24(12) -/-:0,06(3)	0,18(ATG)

Dos 8 SNPs (*missense*) já referenciados, 7 foram identificados em mais do que um exoma e 1 foi identificado apenas num exoma em heterozigotia (tabela 16). Da análise da distribuição dos genótipos, relativamente, a estes 8 SNPs verificou-se que todos à exceção do SNP tipo *missense* rs5215, localizado no gene KCNJ11 tinham uma predominância do genótipo de referência (tabela 16). Em relação à análise das frequências alélicas na população EUR (1000 genomas) para estes 8 SNPs verificou-se que apenas os 2 SNPs tipo *missense* rs1058930 e rs5215 localizados respetivamente nos genes CYP2C8 e KCNJ11 eram comuns (frequência>5%). Comparando estas frequências alélicas com as da amostra em estudo verificou-se que eram idênticas apresentando apenas ligeiras discrepância. Para o SNP rs139857881 localizado no gene SLC22A2 não foi possível comparar na medida em que não se encontra descrito na população EUR (1000 genomas) (tabela 16).

Tabela 16- SNPs referenciados mas não associadas à farmacogenética da DM2. Legenda. Ref- referência; Alt-alteração.

Gene	Nucleótido ref>alt (refSNP)	Tipo de SNP	Frequência genotípica (n)	Frequência alélica nos 51 exomas	Frequência alélica na população EUR (1000 genomas)
ABCC8	c.4714G>A (rs8192690)	<i>missense</i>	C/C:0,86(44) C/T:0,14(7)	0,07(C)	0,05(C)
KCNJ11	c.1009G>A (rs5215)	<i>missense</i>	C/C:0,22(11) C/T:0,43(22) TT:0,35(18)	0,57(C)	0,66(C)
	c.808C>G (rs1800467)	<i>missense</i>	G/G:0,86(44) G/C:0,14(7)	0,07(G)	0,04(G)
SLC22A1	c.113G>A (rs35888596)	<i>missense</i>	GG:0,96(49) G/A:0,04(2)	0,02(G)	0,01(G)
	c.566C>T (rs34104736)	<i>missense</i>	C/C:0,96(49) C/T:0,04(2)	0,02(C)	0,001(C)
	c.1503G>A (rs41267797)	<i>missense</i>	GG:0,96(49) G/A:0,04(2)	0,02(G)	0,01(G)
SLC22A2	c.1630T>G (rs139857881)	<i>missense</i>	A/A:0,98(50) A/C:0,02(1)	0,01(A)	Não referenciado
CYP2C8	c.582C>G (rs1058930)	<i>missense</i>	G/G:0,92(47) G/C:0,08(4)	0,04(G)	0,06(G)

Os 15 potenciais SNPs candidatos encontrados nos 6 genes alvo foram agrupados pelas quatro classes de fármacos (sulfonilureias, meglitinidas, tiazolidinedionas e biguanidas). A distribuição e associação dos genes às respectivas classes de fármacos foi realizada com base em artigos científicos, na medida em que os genes foram associados a uma classe de fármacos, mediante a existência de uma ou várias referências que associem um SNP à farmacogenética de uma destas classes. O agrupamento foi feito da seguinte maneira, os genes ABCC8, KCNJ11 e CYP2C9 foram agrupados na classe das sulfonilureias, ABCC8, KCNJ11, CYP2C8 e CYP2C9 na classe de fármacos meglitinidas, CYP2C8 e CYP2C9 na classe de fármacos das tiazolidinedionas e SLC22A1 e SLC22A2 na classe de fármacos biguanidas. Do agrupamento destes 15 potenciais SNPs candidatos obtiveram-se 6 SNPs para a classe das sulfonilureias, 7 para a classe das meglitinidas, 1 para classe das tiazolidinedionas e 8 para a classe das biguanidas (tabela 17). Não foi selecionado nenhum SNP no gene CYP2C9, isto devido a nenhum SNP identificado neste gene cumprir os parâmetros de seleção. Além disso, verificou-se também que alguns SNPs eram coincidentes entre classes de fármacos, nomeadamente, os 6 SNPs localizados no gene ABCC8 que eram comuns à classe das sulfonilureias e meglitinidas e o SNP localizado no gene CYP2C8 que era comum às classes das meglitinidas e tiazolidinedionas.

Tabela 17- SNPs candidatos agrupados por classe de fármaco.

Classes de fármacos		
Sulfonilureias	Gene	ABCC8
	SNPs	c.4714G>A-NM_000352:c.1611_1612insG- NM_000352:c.3610G>C- NM_000352:c.2319G>A
	Gene	KCNJ11
	SNPs	c.1009G>A - c.808C>G
Meglitinidas	Gene	ABCC8
	SNPs	c.4714G>A-NM_000352:c.1611_1612insG- NM_000352:c.3610G>C- NM_000352:c.2319G>A
	Gene	KCNJ11
	SNPs	c.1009G>A - c.808C>G
	Gene	CYP2C8
	SNPs	c.582C>G
Tiazolidinedionas	Gene	CYP2C8
	SNPs	c.582C>G
Biguanidas	Gene	SLC22A1
	SNPs	c.113G>A - c.566C>T - c.1503G>A – NM_003057:c.368_369insG – NM_003057:c.156delT – NM_003057:c.240delG – NM_003057:c.1258_1260delATG
	Gene	SLC22A2
	SNPs	c.1630T>G

8 Análise e correlação dos SNPs dos indivíduos da amostra em estudo com os fármacos antidiabéticos que lhes são administrados

Dos dados apresentados sobre os fármacos administrados aos 51 indivíduos com DM2 que constituem a amostra em estudo verificou-se que 32 recorriam a antidiabéticos orais em monoterapia, ou em combinação com outros antidiabéticos orais ou em combinação com um vários tipos de insulina, 15 recorriam a insulina em monoterapia ou à combinação de vários tipos de insulina e 4 não tomavam qualquer medicação.

Os 32 indivíduos que recorriam a antidiabéticos orais tinham em comum o facto de em todos ser administrado o fármaco metformina da classe das meglitinidas. Além disso, em 15 destes indivíduos ainda foram administrados fármacos da classe dos inibidores de DPP-4, nomeadamente, sitagliptina, vildagliptina e saxagliptina e o fármaco gliclazida da classe das sulfonilureias, sendo que em 11 indivíduos eram administrados

fármacos da classe dos inibidores de DPP-4, em 2 fármacos da classe das sulfonilureias e nos restantes 2 fármacos das duas classes. Esta distribuição encontra-se ilustrada na figura 15.

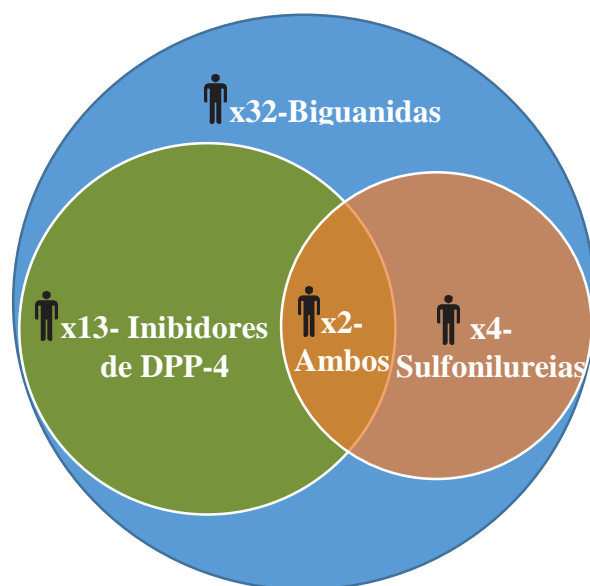


Figura 15- Distribuição terapêutica para os 32 indivíduos no qual eram administrados antidiabéticos orais.

Como verificado no subcapítulo 5, tabela 6 dos resultados foram identificados 16 SNPs na literatura e em bases de dados referentes à população EUR que foram relatados nos exomas dos 51 indivíduos da amostra em estudo. Estes SNPs foram referenciados como estando associados a alterações nas respostas de vários fármacos utilizados como terapia para a DM2.

Analisando a medicação de cada um dos 51 indivíduos relativamente estes 16 SNPs (em região codificante e em relação à população EUR) observados na amostra em estudo e relacionados com a farmacogenética da DM2 verificou-se que apenas foi possível analisar fármacos das classes administradas biguanidas e sulfonilureias. A classe de fármacos dos inibidores de DPP-4 também administrada nos indivíduos da amostra em estudo, não pode ser analisada dado não ter sido identificado nenhum SNP que cumprisse os seguintes critérios, nomeadamente, estar em região codificante, estar associado à população EUR e à farmacogenética desta classe de fármacos. Em relação às restantes classes para qual foram identificados SNPs em região codificante, associados à população EUR e associados a alterações da resposta terapêutica, nomeadamente, as tiazolidinedionas, meglitinidas, inibidores da α -glicosidase e GLP-1 e análogos, não foram analisadas pelo facto de nenhum dos indivíduos da amostra em estudo utilizar fármacos destas classes como terapia.

Para a classe das biguanidas foram identificados 4 SNPs, 3 SNPs (rs12208357, rs34130495 e rs34059508) localizados no gene SLC22A1 e um SNP (rs1801282) localizado no gene PPAR γ . Estes 4 SNPs foram identificados em vinte indivíduos da amostra em estudo, todos em heterozigotia. No diagrama representado na figura 16 são indicados o número dos exomas correspondentes aos indivíduos da amostra em estudo onde foram observados estes SNPs.

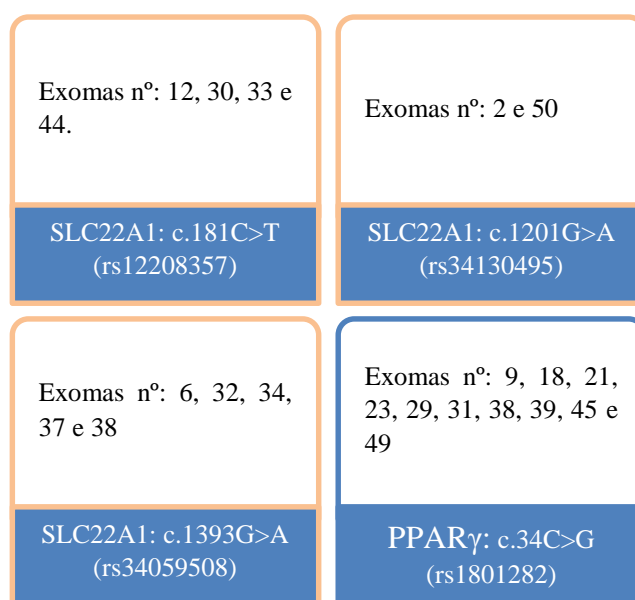


Figura 16- Diagrama indicativo dos exomas onde foram observados os 4 SNPs associados às biguanidas.

Dos indivíduos portadores dos SNPs indicados na figura 16, os com os exoma número 2, 9, 12, 23 e 49 não utilizavam na sua terapia para a DM2 o fármaco metformina da classe das biguanidas. Além disso, verificou-se ainda que 17 indivíduos (com os exomas número 3, 4, 5, 8, 10, 19, 20, 22, 24, 26, 36, 41, 42, 43, 46, 47, e 51) que não tinham qualquer um destes 4 SNPs representados na figura 16 utilizavam como terapia para a DM2 o fármaco metformina da classe das biguanidas.

O indivíduo com o exoma 38 (figura 16) foi o único indivíduo onde foram relatados 2 destes SNPs, nomeadamente, o rs34059508 e o rs1801282, sendo que deve manifestar os efeitos relativos a cada SNP.

Em relação à classe das sulfonilureias foram identificados 6 SNPs, 2 (rs1799859 e rs1801261) localizados no gene ABCC8, 2 (*2 rs1799853 e *3 rs1057910) localizados no gene CYP2C9, 1 (rs1801278) localizado no gene IRS1 e 1 (rs5219) localizado no gene KCNJ11. Deste conjunto de 6 SNPs foram identificados SNPs em 47 indivíduos, estando na figura 17 representados para cada SNP os números dos indivíduos (exomas) onde foram relatados estes SNPs.

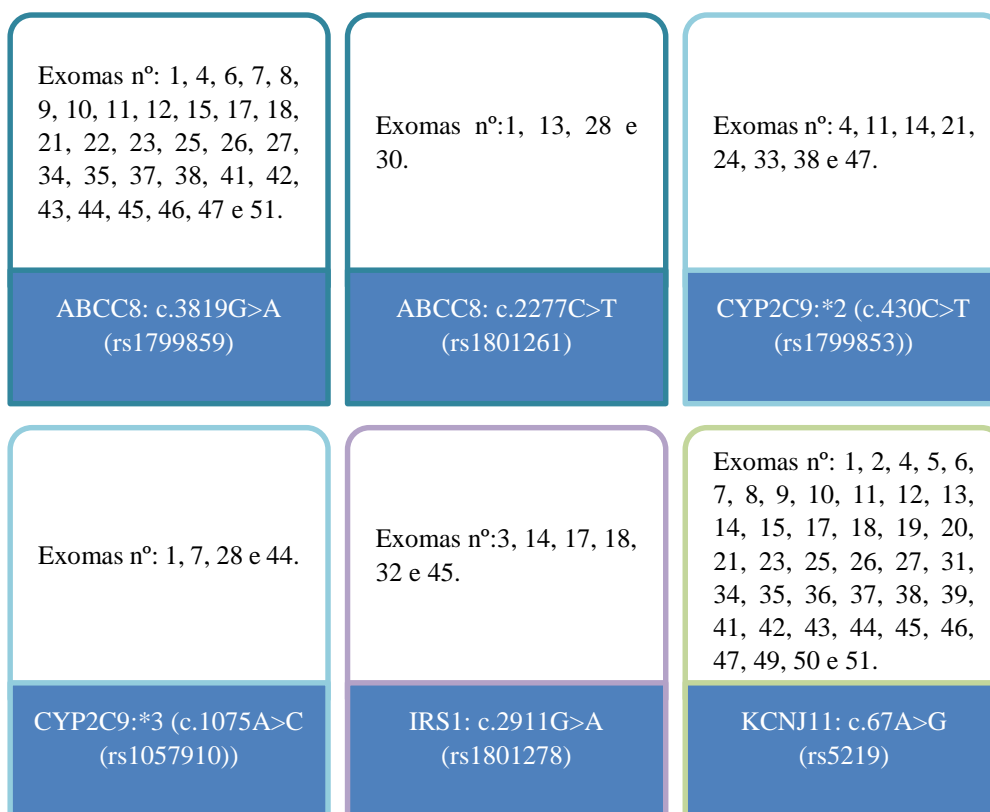


Figura 17-Diagrama indicativo dos exomas onde foi relatado os 6 SNPs associados às sulfonilureias.

Dos 47 indivíduos onde foram relatados estes 6 SNPs, 3 indivíduos com os exomas número 46, 50 e 51 utilizavam a sulfonilureia gliclazida como terapia, 3 indivíduos com os exomas número 12, 28 e 49 não tomavam qualquer medicação e os restantes utilizavam outras terapias que não as sulfonilureias. Nos 4 indivíduos restantes não portadores de nenhum dos 6 SNPs verificou-se que o indivíduo com o exoma número 29 utilizava o fármaco gliclazida da classe das sulfonilureias, os indivíduos com os exomas número 40 e 48 utilizavam outra terapia que não as sulfonilureias e o indivíduo com exoma número 16 não utilizava qualquer terapia.

Da análise farmacogenética para os 3 indivíduos onde foram relatados SNPs verificou-se que os indivíduos com exomas número 46 e 51 apresentavam o mesmo conjunto de SNPs, nomeadamente, o SNP rs5219 localizado no gene KCNJ11 e o SNP rs1799859 localizado no gene ABCC8, ambos em heterozigotia. O indivíduo com o exoma número 50 apresentava apenas o SNP rs5219 em homozigotia para o alelo G.

Discussão

1 Levantamento e análise dos 98 SNPs identificados

O estudo aqui realizado teve como um dos principais objetivos identificar um conjunto de SNPs referenciados como associados à farmacogenética da DM2, nomeadamente, em bases de dados e em artigos científicos, sendo que no total foram identificados 98 SNPs.

Na atualidade, já se encontram publicados vários artigos que vão ao encontro desta pesquisa, nomeadamente, algumas *reviews*, das quais menciono as realizadas por Semiz et al (2013) e Leeuwen et al (2013)(28, 31). Porém dado a informação que vai surgindo, quer sob a forma de artigos quer em bases de dados, sentiu-se a necessidade de uma pesquisa mais detalhada, de forma assim a tornar a informação o mais completa e atual possível.

No trabalho foi estudado um grupo de 51 diabéticos portugueses. Estes indivíduos tinham uma média de idades de 61,3 anos e uma duração média da DM2 de 15 anos, subtraindo à média de idades a duração média da DM2 obteve-se uma média de idades de diagnóstico da DM2 aos 46,3 anos, a qual está de acordo com o relatório anual do observatório nacional da diabetes que refere que o diagnóstico da DM2 ocorre geralmente após os 40 anos de idade (4). Em relação ao conjunto de tratamentos adotado por 51 indivíduos da amostra verificou-se ser muito diversificado, ou seja, os tratamentos incluíram desde a monoterapia de insulina ou de antidiabéticos orais á combinação de vários tipos de insulina ou de antidiabéticos orais ou de insulina com antidiabéticos orais. Além disso, apurou-se que 41 indivíduos necessitavam de insulina, o que vai de encontro ao descrito num estudo Nyenwe et al (2011) que diz que ao longo do tempo em pacientes com DM2 existe um declínio inevitável da função das células β pancreáticas resultando em consequentes falhas dos tratamentos com antidiabéticos orais, fazendo assim com que a maioria dos pacientes com DM2 acabe por necessitar de terapia de insulina para atingir e manter os níveis de glicémia sob controlo (42). Da análise à utilização dos diferentes tipos antidiabéticos orais verificou-se que o maior número de indivíduos da amostra em estudo utilizava o fármaco metformina da classe das biguanidas, panorama idêntico ao que acontece a nível nacional, onde se verificou uma maior utilização deste fármaco (4).

Os exomas dos 51 diabéticos utilizados neste trabalho como amostra foram sequenciados recorrendo a plataforma de sequenciação *Ion Proton* que apresenta como principal vantagem em relação a outras soluções no mercado o reduzido custo do aparelho

e o reduzido tempo de corrida e como desvantagem assinalável o elevado rácio de erros (79). O motivo para neste trabalho ter-se sequenciado exomas em detrimento de outras abordagens como a sequenciação de genomas foi devido ao facto da sequenciação de exomas ser uma tecnologia mais barata, ser direccionada para a deteção de SNPs e *indels* em regiões codificantes de proteínas (tipo de variantes analisadas neste trabalho) e também porque atualmente a sequenciação dum exoma fornece uma cobertura de mais de 95% dos exões no qual estima-se conter cerca de 85% das mutações causadoras de doenças (83).

2 SNPs referenciados em populações EUR e em região codificante

Dos 98 SNPs identificados procedeu-se numa primeira fase, apenas ao levantamento na amostra em estudo dos SNPs que se apresentassem em região codificante e associados à população EUR (população caucasiana e populações do continente europeu). O motivo para a seleção dos SNPs apenas referentes à população EUR, prendeu-se com o facto da amostra utilizada neste estudo ser constituída por 51 diabéticos portugueses, sem evidência expressa de outra etnia que não a caucasiana, amostra que se enquadra na população EUR, permitindo assim ter uma ideia mais fiel do efeito destes SNPs na amostra. A opção de seleção apenas de SNPs em região codificante deveu-se à análise ser realizada em exomas. Num total foram identificados 19 SNPs distribuídos por 10 genes que obedeceram a estes dois critérios.

A superfamília CYP é responsável pela metabolização de uma grande percentagem de compostos xenobióticos: Relativamente a esta família foram identificados no gene CYP2C9 dois SNPs do tipo *missense*, o rs1799853 representado como o alelo CYP2C9*2 e o rs1057910 representado como alelo CYP2C9*3 e no gene CYP2C8 dois SNPs do tipo *missense*, o rs10509681 e o rs11572080, que se encontram em *linkage* e são representados pelo alelo CYP2C8*3 (31, 32, 120).

O gene CYP2C9 codifica uma enzima que foi referenciada como envolvida na metabolização dos fármacos pertencentes à classe das sulfonilureias, da nateglinida da classe das meglitinidas e também no metabolismo da rosiglitazona fármaco das tiazolidinedionas (28). As variantes alélicas CYP2C9*3 e CYP2C9*2 foram, na população EUR, associados à farmacocinética das sulfonilureias, nomeadamente, a menor depuração média total, e maior AUC e a uma necessidade de doses menores do fármaco tolbutamida, a maiores AUCs para os fármacos glibenclamida e glimepirida, a maior probabilidade de alcançar as metas do tratamento (níveis de HbA1c inferior a 7%),

a menor probabilidade de falha do tratamento com sulfonilureias e a um maior risco ligeiro de hipoglicemia em pacientes tratados com gliclazida (101, 102, 121, 122). Num estudo realizado por Kirchheiner et al (2002) em indivíduos saudáveis caucasianos (população EUR) verificou-se também que indivíduos portadores do genótipo *3/*3 têm uma menor depuração oral total para o fármaco glibenclamida (99). Em populações não EUR, nomeadamente, populações asiáticas foi apenas referenciado efeitos farmacocinéticos para a variante alélica *3, ou seja, uma maior AUC e uma melhor resposta para o fármaco glibenclamida, uma maior C_{max} e AUC para o fármaco tolbutamida e uma maior AUC para o fármaco glimepirida (123-125). Como demonstrado nas linhas anteriores os alelos *2 e *3 têm um efeito importante na farmacocinética das sulfonilureias, porém segundo Swen et al (2010) este efeito é apenas modesto quando traduzido para a clínica, sendo demonstrado que o efeito destas duas variantes não é significativo na dose prescrita nos utilizadores dos fármacos da classe das sulfonilureias (126). A variante alélica CYP2C9*3 também foi associada com a farmacocinética da nateglinida, fármaco da classe das meglitinidas, verificando-se num estudo realizado em indivíduos saudáveis caucasianos (população EUR), que portadores desta variante têm uma menor depuração oral para a nateglinida, além de um maior risco de hipoglicemia nos portadores do genótipo *3/*3 quando comparados com o genótipo *1/*1 (112). Numa população asiática de indivíduos saudáveis para a mesma variante alélica e fármaco verificou-se uma menor depuração oral do fármaco e uma AUC maior para a nateglinida (127). A enzima codificada por este gene também foi referenciada como tendo um pequeno papel no metabolismo da rosiglitazona fármaco da classe das tiazolidinedionas, todavia não se encontrou qualquer referência da sua associação com a farmacogenética da rosiglitazona (28).

O gene CYP2C8 da superfamília dos citocromos tem um papel importante na metabolização dos principais fármacos da classe das tiazolidinedionas (pioglitazona e rosiglitazona) e na metabolização da repaglinida fármaco da classe das meglitinidas (31). A variante alélica CYP2C8*3 identificada neste gene foi associada na população EUR a menores AUC e C_{max} para o fármaco repaglinida da classe das meglitinidas, todavia também foi referenciado em estudos da mesma população que a variante *3 não tinha efeito na farmacocinética da repaglinida (110, 111, 128). Esta variante alélica também na população EUR foi associada a menor AUC para o fármaco pioglitazona e a maiores depurações renais para rosiglitazona, ambos fármacos da classe das tiazolidinedionas (115, 129). Em indivíduos saudáveis de uma população americana também foram

associados a menores AUC para o fármaco rosiglitazona (130). Estes resultados indicam que indivíduos portadores do alelo *3 devem necessitar de uma maior dose, relativamente aos fármacos das tiazolidinedionas e ao fármaco repaglinida da classe das meglitinidas.

O gene IRS1 codifica uma proteína que é fosforilada após a ligação à insulina ao recetor de insulina tirosina cinase, esta ligação tem um papel crucial como mediador da sinalização da insulina, uma vez que esta ligação conduz a ativação de cascata de fosforilações responsável pela mediação das respostas metabólicas e anabólicos da insulina (32, 106). Neste gene foi identificado um SNP *missense* rs1801278 que se encontra associado na população EUR a um risco aumentado para a DM2, a um maior risco de falha secundária para as sulfonilureias, à suscetibilidade para resistência à insulina e a maiores níveis de HbA1c, em comparação com indivíduos não portadores (32, 105, 106).

Várias variantes genéticas foram identificadas nos genes KCNJ11 e ABCC8 ligadas à secreção da insulina e à farmacogenética da DM2 (32). Estes dois genes são responsáveis por codificar as subunidades SUR1 (codificado no gene ABCC8) e Kir6.2 (codificado no gene KCNJ11) que compõem o canal KATP (32). O interesse destes dois genes como candidatos à farmacogenética da DM2 deve-se ao papel importantíssimo deste canal na secreção da insulina, pois é a inibição deste canal por o ATP que induz a secreção da insulina, além disso este canal constitui o alvo farmacológico das classes sulfonilureias e meglitinidas (12, 32). No gene KCNJ11 foi identificado um SNP *missense* rs5219 representado frequentemente como E23K (31). A variante alélica K (que corresponde ao alelo A no DNA) deste SNP foi associado à suscetibilidade para a DM2 e a efeitos na secreção e na sensibilidade da insulina (28, 31). Em relação à farmacogenética em populações EUR foi referenciado para o alelo K um aumento da eficácia da gliclazida medida pela redução dos níveis de HbA1c, um aumento da probabilidade de falha do tratamento quando tratadas com metformina, sulfonamidas e derivados de ureia em pessoas com DM2 e uma maior frequência do alelo K em indivíduos com falha secundária para as sulfonilureias (107, 108). Além disso, em populações asiáticas foi referenciado que os portadores do alelo K apresentavam maiores taxas de respostas à repaglinida e maiores níveis de FPG, glicose pós-prandial (PPG) e HbA1c para o tratamento repaglinida, comparativamente aos portadores do genótipo EE (131). Este SNP rs5219 juntamente com o SNP *missense* rs757110 (S1369A) localizado no gene ABCC8 formam o haplótipo K23/A1369, que se encontra referenciado em estudos *in vitro* no aumento do risco para a DM2, menor sensibilidade na inibição do

canal KATP para os fármacos tolbutamida, clorpropamida e glimepirida, além de um aumento da sensibilidade para a gliclazida (132, 133). Este SNP como descrito nos resultados contraria a regra geral, na medida em que o alelo de referência (alelo A (DNA) e K (Proteína)) corresponde ao alelo com menor frequência na população em geral. Isto pode-se explicar dado o alelo de referência ser determinado da sequência do genoma referência. Porém essa sequência de referência não é representativa da população em geral, dado que foi obtida através da sequenciação de um conjunto limitado de genomas (134). A nível farmacogenético pode se inferir que os portadores EUR do SNP rs5219 devem necessitar de uma maior dose de gliclazida e portadores asiáticos de uma menor dose de repaglinida, relativamente aos portadores do genótipo tipo selvagem.

No gene ABCC8 foi identificado em populações caucasianas (população EUR) o SNP sinónimo rs1799859 e o também SNP sinónimo rs1801261. Em relação ao SNP rs1799859 estudado numa população diabética em terapia de sulfonilureias apurou-se que os portadores deste SNP em homozigotia apresentavam níveis mais baixos de HbA1c em comparação com o genótipo selvagem (97). Este resultado indica que os portadores homozigóticos deste SNP devem necessitar de uma dose menor de sulfonilureias em relação aos portadores do genótipo selvagem para atingir os mesmos níveis de HbA1c. O SNP rs1801261 foi associado após o tratamento do fármaco tolbutamida a melhores respostas da insulina, nomeadamente, a maiores secreções (98). A nível farmacogenético este resultado permite-nos inferir que os indivíduos portadores deste SNP devem necessitar de uma menor quantidade de fármaco para alcançar o tratamento.

O gene SLCO1B1 codifica uma proteína transportadora localizada na membrana sinusoidal dos hepatócitos humanos, desempenhando um papel crítico na disposição de alguns fármacos utilizados como terapia para a DM2, nomeadamente, na nateglinida e repaglinida (28). No presente gene foi identificado o SNP *missense* rs4149056 e o SNP *missense* rs2306283 representado SLCO1B1*1B. Estudos realizados em populações chinesas referentes ao SNP rs4149056 demonstraram que os seus portadores tinham maiores AUC e concentrações C_{max} para o fármaco nateglinida, na mesma população um outro estudo reporta que este SNP não se encontra associado significativamente com a farmacocinética da nateglinida (127, 135). Em estudos em populações EUR apurou-se que os portadores do SNP rs4149056 em homozigotia tinham maiores AUC para a repaglinida fármaco da classe das meglitinidas e uma tendência para menores concentrações de glicose no sangue (113). Todavia num outro estudo realizado na mesma população (população EUR) foi descrito que o SNP rs4149056 não tinha qualquer efeito

na farmacogenética da nateglinida fármaco da classe das meglitinidas (136). Este SNP também foi referenciado na farmacocinética dos fármacos da classe das tiazolidinedionas (rosiglitazona e pioglitazona) porém não mostrou um efeito significativo (137). Os resultados para este SNP permitem inferir que portadores homozigóticos EUR necessitam de menores doses de repaglinida para atingir o tratamento, quanto à nateglinida e aos fármacos da classe das tiazolidinedionas não foi possível inferir, dado à existência de resultados contraditórios ou de resultados não significativos. O SNP rs2306283 foi referenciado na população EUR como estando associado menores AUC e Cmax para o fármaco repaglinida e na população chinesa como estando associado também a menor AUC da repaglinida (114, 138). Estes resultados indicam que os portadores deste SNP necessitam de doses maior de repaglinida para atingir o tratamento comparativamente aos portadores do genótipo mais comum.

Como anteriormente referido ao longo deste trabalho o gene SLC22A1 codifica uma proteína transportadora que é expressa na membrana basolateral dos hepatócitos e têm com função mediar a captação hepática do fármaco metformina (31). Neste gene foram identificados 6 SNPs (3 *missense*, 2 *indels* e 1 sinónimo), nomeadamente o rs12208357, o rs34130495, o rs35167514, o rs72552763, rs34059508 e o rs1867351. Num estudo de Tzvetkov et al (2009) realizado numa população caucasiana (população EUR) para estes SNPs foi referido que os seus portadores tinham maiores depurações renais para a metformina, todavia também foi referido que os níveis de depuração renal variavam consoante tivessem 0, 1 ou 2 destes SNPs, sendo que os maiores níveis de depuração renal correspondiam aos indivíduos portadores de dois SNPs e os menores aos indivíduos não portadores (118). Os SNPs rs12208357, rs34130495, rs72552763 e o rs34059508 também foram associados a maiores AUC e Cmax, além de menores volume orais de distribuição e nível de depuração oral para o fármaco metformina, resultados estes que contradizem os resultados de Tzvetkov et al (2009) (139). Num estudo realizado num grupo de indivíduos escoceses para os SNPs rs34130495, rs72552763 e rs12208357 foi referido que os portadores destes SNPs não tinham qualquer efeito na redução dos níveis de HbA1c para o fármaco metformina (140). Os resultados obtidos para os estes SNPs são contraditórios, todavia se nos basearmos nos resultados Tzvetkov et al (2009) inferimos que os portadores EUR destes SNPs necessitam de uma maior quantidade de metformina para atingir o tratamento relativamente aos portadores do genótipo tipo selvagem.

O PPAR γ codifica um recetor de uma hormona nuclear que regula a transcrição dos genes envolvidos no crescimento celular, diferenciação e no metabolismo, em resposta a hormonas lipofílicas, ácidos gordos e seus metabolitos. Após a ligação do ligando natural ao recetor, este é ativado, tornando-se capaz de heterodimerizar com o recetor retinóide X e ligar-se em regiões específicas do DNA localizadas em inúmeros promotores de genes (32). Além disso, este gene tem um papel importante na farmacogenética da DM2, principalmente nos fármacos referentes à classe das tiazolidinedionas que têm o fator de transcrição codificado por este gene como recetor (32). No presente gene foi identificado o SNP *missense* rs1801282, que se encontra em populações caucasianas (população EUR) associado a um efeito protetor para a DM, a um aumento da sensibilidade à insulina, a um risco maior de falha do tratamento com metformina (119). Na mesma população, este polimorfismo também apareceu associado ao fármaco pioglitazona da classe das tiazolidinedionas, todavia verificou-se que esta variante alélica não afetava o fármaco (141). Em populações asiáticas foi associado a menores FPG e HbA1c para a rosiglitazona e pioglitazona (142, 143). Dos resultados obtidos para este SNP pode-se inferir que indivíduos asiáticos necessitam de menores doses de rosiglitazona e pioglitazona para alcançar o tratamento relativamente aos portadores do genótipo selvagem.

O gene PGC-1 α codifica um coativador de transcrição que entre outros órgãos é expresso no pâncreas, encontra-se associado à regulação da oxidação dos ácidos gordos, na gliconeogénese e na absorção da glicose nas células do músculo (69). Neste gene foi relatado um polimorfismo na população EUR envolvido na farmacogenética da DM2, nomeadamente, o SNP tipo *missense* rs8192678 (72). Portadores deste SNP eram mais sensíveis ao fármaco acarbose da classe dos inibidores da α -glicosidase, (72). A nível farmacogenético este resultado pode indicar que os portadores destes SNP conseguem atingir o tratamento com menores quantidades de fármaco relativamente aos portadores do genótipo selvagem.

O gene THADA que codifica uma proteína associada ao adenoma da tiroide tem sido sugerido estar envolvido na via recetor de morte e a apoptose (64). Neste gene foi relatado em indivíduos de populações EUR o SNP do tipo *missense* rs7578597, o qual foi associado à DM2 e à farmacogenética da classe de fármacos GLP-1 e análogos onde foi referenciado uma menor resposta das células β pancreáticas para o GLP-1 e arginina (66). Este resultado permite-nos inferir que os portadores deste SNP necessitam de maior quantidades de fármaco para atingir o tratamento.

Da análise dos efeitos farmacogenéticos em relação a estes 19 SNPs verifica-se para alguns SNPs resultados discrepantes, isto deve-se principalmente ao facto da maioria das amostras em estudo serem muito pequenas, por isso embora os resultados por vezes sejam significativos estatisticamente o tamanho da amostra faz com que as discrepâncias tenham pouca relevância na farmacogenética clínica da DM2. A utilização de amostras pequenas constitui ainda problema, todavia com a redução significativa dos custos de sequenciação e com melhoramento das plataformas informáticas é esperado que este problema seja suprimido no futuro.

O levantamento destes 19 SNPs na amostra em estudo, como referido anteriormente, foi realizado nos arquivos VCF utilizando o GEMINI *browser*, sendo depois consultados os arquivos BAM no IGV e verificadas manualmente todas as posições na amostra onde se encontravam estes SNPs. O motivo para a verificação manual nos arquivos BAM foi aumentar a veracidade dos resultados, visto que na construção dos arquivos VCF são aplicados parâmetros de qualidade, que permitem eliminar as variantes que não lhes obedecem. Normalmente estes parâmetros eliminam variantes falsas, todavia por vezes são eliminadas variantes verdadeiras. A análise dos arquivos BAM permite-nos assim dum ponto de vista do utilizador avaliar a informação obtida nos arquivos VCF.

Da análise do levantamento dos 19 SNPs na amostra em estudo verificou-se que os SNPs tipo indels rs72552763 e rs34130495, o SNP tipo sinónimo rs1867351 e a variante alélica rs1801261 localizados respetivamente no gene SLC22A1 e ABCC8 não foram detetados. Além disso, verificou-se também que alguns exomas da amostra em estudo apresentavam baixa cobertura nas posições dos 5 SNPs tipo *missense* rs4149056 e o rs2306283 localizado no gene SLCO1B1, rs34059508 localizado no gene SLC22A1, o rs1801282 localizado no gene PPAR γ e o rs8192678 localizado no gene PGC-1 α . A existência de variações na cobertura ao longo de um exoma deve-se entre outros fatores às diferenças na eficiência de amplificação as regiões alvo. Estas diferenças na eficiência estão associadas ao conteúdo GC e á presença de sequências repetitivas ou de baixa complexidade (144).

Através dos dados resultantes do levantamento dos SNPs calculou-se a frequência a alélica para cada um dos SNPs identificado na amostra em estudo, á exceção dos 5 SNPs que apresentaram baixa cobertura. Comparando as frequências alélicas da nossa amostra para os 11 SNPs resultantes com a frequência alélica da população EUR (1000 genomas),

observaram-se frequências idênticas com ligeiras discrepâncias, resultado do qual se estava à espera dado a população da amostra se enquadrar na população EUR.

Estas pequenas discrepâncias podem não ser consideradas relevantes dado o tamanho pequeno da amostra em estudo. Além disso, segundo dados dos 1000 genomas todos os SNPs à exceção dos SNPs *missense* rs34130495 e rs34059508 localizados no gene SLC22A1 eram comuns na população EUR pois apresentavam frequências superiores a 5% (frequência a partir do qual se considera um SNP frequente) (145).

3 SNPs referenciados em populações não EUR e em região codificante na amostra em estudo

Do conjunto dos 98 SNPs identificados na literatura e em bases de dados como associados à farmacogenética DM2 foram filtrados os SNPs na região codificante do DNA e referentes a populações não EUR. No total foram identificados 32 SNPs, que posteriormente foram analisados e levantados na amostra em estudo. Este procedimento prendeu-se com o facto de estes SNPs representarem excelentes candidatos para futuros estudos de farmacogenética na população portuguesa, na medida em que, já se encontra descrita a sua associação à farmacogenética da DM2.

Do levantamento destes 32 SNPs na amostra em estudo verificou-se que 13 SNPs não foram detetados. Destes 13 SNPs não identificados na amostra em estudo verificou-se também que apresentavam uma frequência de 0% na população EUR (1000genomas).

Os restantes 19 SNPs foram relatados na amostra em estudo. Analisando as suas frequências alélicas na população EUR (1000 genomas) observou-se que todos os SNPs eram comuns (apresentam uma frequência superior a 5% na amostra) à exceção do SNP tipo *missense* rs11572103 localizado no gene CYP2C8 (tabela 11) e do SNP sinónimo rs16889462 localizado no gene SLC30A8 (tabela 9). Comparando as frequências alélicas obtidas na amostra em estudo com as frequências alélicas da população EUR reparou-se que eram na maioria similar. No futuro o estudo deste 19 SNPs em populações EUR poderá ser importante, na medida em que a maioria destes SNPs são comuns na população EUR. Estes estudos permitirão tornar cada vez mais as terapias da diabetes mais eficientes e seguras. Reitero a necessidade de utilizar amostras cada vez maiores para tornar os resultados mais precisos.

4 Análise dos potenciais SNPs identificados nos 6 genes alvo

Neste trabalho e com o objetivo de identificar um conjunto de potenciais SNPs candidatos ainda não descritos para a farmacogenética da DM2 que possam ser aplicados em futuros estudos foram selecionados 6 genes alvo (ABCC8, KCNJ11, SLC22A1, SLC22A2, CYP2C8 e CYP2C9). A seleção dos genes ABCC8 e KCNJ11 foi pelo motivo de codificarem o canal KATP que é de extrema importância na secreção da insulina e também pelo motivo destes dois genes constituírem alvos da classe das meglitinidas e sulfonilureias (32). Os genes SLC22A1 e SLC22A2 foram selecionados pelo motivo de serem dois genes responsáveis pelo transporte e disposição de vários compostos xenobióticos entres eles o fármaco antidiabético metformina da classe das biguanidas. Este fármaco como anteriormente referido constitui o antidiabético oral mais utilizado na amostra em estudo e na população portuguesa (32). Por fim a seleção do gene CYP2C8 e CYP2C9 prendeu-se com facto de serem dois genes metabolizadores envolvidos na metabolização de várias classes de fármacos, nomeadamente, as sulfonilureias, meglitinidas e tiazolidinedionas (32).

Com a seleção destes genes tentou-se cobrir as principais classes de fármacos, nomeadamente, as sulfonilureias, as meglitinidas, as tiazolidinedionas e as biguanidas. Além disso, a importância já descrita destes genes na farmacocinética da DM2, para as classes de fármacos referidas anteriormente e o facto de em todos os 6 genes já terem sido reportados SNPs, tanto em populações EUR e não EUR, para a farmacogenética destas classes de fármacos, fazem destes genes ótimos candidatos de estudo.

Do levantamento dos SNPs neste 6 genes num total 143 SNPs, foram filtrados apenas os SNPs que obedeceram ao seguintes critérios o SNP encontrar-se na região codificante, não ser sinónimo e não se encontrar referenciado para a farmacogenética da DM2, num total foram identificados 15 SNPs, dos quais 7 SNPs não se encontravam descritos nem referenciados e 8 SNPs já se encontravam referenciados mas não associados à farmacogenética da DM2. O motivo, como anteriormente explicado nos resultados para a utilização do critério de filtragem em que o SNP tem de se encontrar na região codificante, quando a amostra em estudo é constituída por exomas, deve-se ao facto de na sequenciação de exomas serem sequenciados como um subproduto regiões não codificantes (82). O critério de exclusão dos SNPs sinónimos foi pelo motivo da maioria deste tipo de SNPs não ter impacto na função da proteína. Por último, o critério de filtragem dos SNPs que já se encontravam descrito para a farmacogenética da DM2

em populações EUR foi pelo motivo destes não constituírem potenciais SNPs candidatos dado já estarem referenciados a sua associação, em populações não EUR os SNPs foram filtrados pelo motivo de terem sido analisados discutidos na secção anterior.

Dos 8 SNPs (tabela 16) que se encontravam referenciados mas não associados à farmacogenética da DM2, o SNP tipo *missense* rs1058930 localizado no gene CYP2C8 foi associado embora que não significativamente para uma menor atividade da 6 α -hidroxilase para o paclitaxel (medicamento utilizado no tratamento do cancro) comparativamente aos portadores do genótipo de tipo selvagem (146). Para os restantes SNPs não foi encontrado qualquer associação (doenças, fármacos, etc). Destes 8 SNPs o SNP *missense* rs139857881 localizado no gene SLC22A1 foi identificado uma vez na amostra em estudo e em heterozigotia, sendo que todos outros foram referenciados várias vezes.

Para os 7 SNPs (tabela 15) não referenciados verificou-se que à exceção dos 2 SNPs (*indels*) localizados no gene SLC22A1 no cromossoma 6 e nas posições NM_003057:c.156delT e NM_003057:c.1258_1260delATG, todos os outros eram SNPs pouco comuns na amostra em estudo estando referenciados em apenas em um único indivíduo.

O conjunto dos 15 SNPs candidatos identificados nos 6 genes alvo em conjunto com os 32 SNP já identificados como estarem associados à farmacogenética da DM2 em populações não EUR constituem uma ótima base para futuros estudos relativos à farmacogenética da DM2 na população EUR. Todavia e reiterando o que já foi referido anteriormente, na realização de estudos futuros em populações EUR com estes SNPs deve-se utilizar amostras maiores, na medida em que, alguns destes SNPs apresentam frequências muito baixas na população EUR e também de forma a tornar os resultados mais representativos da população.

5 Correlação dos SNPs dos indivíduos da amostra em estudo com os fármacos antidiabéticos que lhes são administrados

Da análise à medicação administrada a cada um dos 51 indivíduos da amostra em estudo verificou-se que apenas 32 utilizavam antidiabéticos orais, nomeadamente, a metformina da classe das biguanidas, a sitagliptina, vildagliptina e saxagliptina da classe dos inibidores de DPP-4 e a gliclazida da classe das sulfonilureias. Correlacionando estes fármacos com os SNPs identificados na populações EUR e associados à farmacogenética da DM2 verificou-se que apenas foi possível correlacionar os fármacos das classes das

biguanidas e sulfonilureias. Os motivos para apenas se correlacionar estas duas classes de fármacos devem-se no caso dos inibidores de DPP-4 não ter sido encontrado nenhum SNP na população EUR e em região codificante associados à farmacogenética desta classe de fármacos e em relação às outras classes, nomeadamente, as tiazolidinedionas, meglitinidas, inibidores da α -glicosidase e GLP-1 e análogos pelo facto de nenhum dos indivíduos da amostra em estudo utilizar fármacos destas classes como terapia.

Em relação à classe de fármacos biguanidas foram identificados 4 SNPs, 3 SNPs (rs12208357, rs34130495 e rs3405950) localizados no gene SLC22A1 e um SNP (rs1801282) localizado no gene PPAR γ . Estes SNPs afetam todos os indivíduos em estudo à exceção dos que não utilizam fármacos desta classe, que são nomeadamente, os indivíduos com os exomas número 2, 9, 12, 23 e 49. Analisando a nível farmacogenético, com base no que está descrito na literatura, nomeadamente, num artigo de Tzvetkov et al (2009), indivíduos portadores dos 3 SNP (rs12208357, rs34130495 e rs34059508) localizados no gene SLC22A1 que utilizam a metformina como terapia têm maior depuração renal para este fármaco, o que leva conseqüentemente a uma depuração/eliminação mais rápida do fármaco do organismo, fazendo com que os indivíduos portadores destes SNPs tenham menores tempos de atuação para o fármaco e teoricamente a uma necessidade maior de quantidade de fármaco (118). As conseqüências para cada um destes 3 SNPs na depuração renal são idênticas, sendo maior a depuração renal consoante o maior número destes 3 SNPs que o indivíduo é portador. Num estudo precedente de Shu et al (2008) relativamente a estes 3 SNPs são apresentados resultados contraditórios, na medida em que é referido, mesmo que de forma indireta maior tempo de exposição ao fármaco (139). Esta indicação é-nos dada pela maior *área under the curve* (AUC) e concentração máxima (C_{max}) para a metformina nos portadores destes SNPs. O AUC representa a exposição de um fármaco ao longo do tempo, é obtido através da integração da curva (quantidade de fármaco vs. tempo) e apresentado sob forma de área, um maior AUC indica uma maior permanência do fármaco no organismo, já o C_{max} representa a concentração máxima do fármaco no organismo, sendo que um maior C_{max} indica que foram atingidos maiores concentrações do fármaco no organismo. Por fim, ainda em relação a estes 3 SNPs verificou-se na amostra em estudo que nenhum indivíduo era portador de mais de que um SNP dos 3 analisados.

O SNP rs1801282 localizado no gene PPAR γ foi referenciado como estar associado maior risco de falha ao tratamento e a uma redução na eficácia da metformina

(119). Na prática os portadores deste SNP (figura 16) que seguem a terapia de metformina devem ter um controlo mais apertado dado as consequências que este SNP mostra.

O indivíduo com exoma número 38 apresenta 2 SNPs dos 4 relatados para as classes das biguanidas nomeadamente, o rs34059508 e o rs1801282, sendo que deve manifestar os efeitos relativos a cada SNP.

Em relação à classe das sulfonilureias foram identificados 6 SNPs, 2 (rs1799859 e rs1801261) localizados no gene ABCC8, 2 (*2 rs1799853 e *3 rs1057910) localizados no gene CYP2C9, 1 (rs1801278) localizado no gene IRS1 e 1 (rs5219) localizado no gene KCNJ11. Estes SNPs foram observados em 47 indivíduos, todavia destes apenas os indivíduos com os exomas numero 46, 50 e 51 utilizavam a sulfonilureia gliclazida como terapia.

Nos indivíduos com os exomas número 46 e 51 foram identificados os mesmos SNPs, nomeadamente, o SNP rs5219 localizado no gene KCNJ11 e o SNP rs1799859 localizado no gene ABCC8, ambos em heterozigotia. O indivíduo com exoma 50 apresentava apenas o SNP rs5219 em homozigotia para o alelo G.

Analisando a nível farmacogenético o SNP rs5219, com base no que está descrito na literatura, apurou-se que os portadores do alelo de referência A (alelo K na proteína) para este SNP tinham um aumento da eficácia da gliclazida medida pela redução dos níveis de HbA1c, pelo que os portadores do alelo variante G (alelo E na proteína) devem ter um efeito antagónico. Todavia entres os indivíduos que utilizavam a gliclazida e tinham este SNP (nomeadamente, os indivíduos com os exomas número 46, 50 e 51), o indivíduo com o exoma 50 deve ter um efeito reforçado dado o SNP se encontrar em homozigotia (107). Este SNP contraria a maioria dos outros SNPs, na medida em que o alelo de referência corresponde ao alelo com menor frequência na população em geral. Isto deve-se ao facto do alelo de referência ser determinado da sequência do genoma referencia, que foi construída a partir da sequenciação de um conjunto limitado de genomas, que não representam a população em geral (134).

Em relação ao SNP rs1799859 localizado no gene ABCC8 foi apurado na literatura que os portadores homozigóticos para este SNP apresentavam níveis mais baixos de HbA1c em comparação com o genótipo selvagem, todavia como verificado ambos os indivíduos portadores deste SNP, nomeadamente, os com número de exoma 46 e 51 eram heterozigóticos para este SNP (97).

Conclusões

Do levantamento realizado na literatura e bases de dados foram identificados 98 SNPs descritos em 47 genes, 10 genes relativos à classe das sulfonilureias, 16 à classe das meglitinidas, 16 à classe das tiazolidinedionas, 15 à classe das biguanidas, 4 à classe dos GLP-1 e análogos, 1 à classe de inibidores de DPP-4 e 4 à classe dos inibidores da α -glicosidase.

Com o objetivo de caracterizar e analisar a amostra em estudo (51 exomas de indivíduos diabéticos) dos 98 SNPs identificados foram selecionados todos os SNPs referentes à população EUR, em região codificante e associados à farmacogenética da DM2, num total de 19.

Do levantamento dos 19 SNPs na amostra em estudo, apenas 11 foram analisados, dado que 3 não foram relatados na amostra e 5 apresentavam em alguns exomas reduzida cobertura. Da análise das frequências alélicas para os 11 SNPs apurou-se que as frequências alélicas na amostra em estudo eram similares à da população EUR (1000 genomas). No levantamento da terapia utilizada pelos 51 doentes verificou-se apenas a utilização dos antidiabéticos orais metformina da classe das biguanidas, gliclazida da classe das sulfonilureia e a saxagliptina, sitagliptina e vildagliptina da classe dos inibidores de DPP-4. Estes fármacos foram usados em monoterapia, combinados uns com outros e combinados com insulina.

Da correlação dos fármacos administrados na amostra em estudo com os resultados decorrentes do levantamento destes 19 SNPs apurou-se que os indivíduos portadores dos SNPs rs12208357, rs34130495 e rs3405950 localizados no gene SLC22A1 necessitariam de uma maior dose de metformina (segundo autor Tzvetkov et al, 2008), os portadores do SNP rs1801282 localizado no gene PPAR γ necessitariam de um controlo mais apertado do tratamento metformina (dado o aumento de risco de falha para este tratamento) e os portadores do SNP rs5219 localizado no gene KCNJ11 necessitariam de uma dose maior de gliclazida.

Na proposta de um conjunto de potenciais SNPs candidatos para futuros estudos de farmacogenética da DM2 em populações portuguesas, selecionou-se do conjunto de 98 identificados na literatura e em bases dados, 32 SNPs (em região codificante, associados à farmacogenética da DM2 e em populações não EUR). Além destes também foram propostos mais 15 SNPs (localizados na região, codificante não sinónimos e não

referenciados para a farmacogenética da DM2) resultantes do levantamento direcionado nos 6 genes alvo.

A realização deste trabalho fez sobressair as limitações da aplicabilidade dos conhecimentos farmacogenéticos na terapia da DM2, visto que atualmente nenhum dos SNPs identificados foi ainda implementado a nível clínico.

Perspetivas futuras

Em futuros estudos relativos aos 19 SNPs utilizados neste estudo para caracterizar a amostra, proponho a utilização de um maior número de amostras mais alargadas que permitam averiguar de forma mais precisa o impacto destes SNPs na farmacogenética da DM2 e também a sua utilização prática na clinica.

Em relação ao conjunto de potenciais SNPs candidatos identificados neste trabalho é do interesse no futuro realizar estudos sobre estes SNPs na população portuguesa de forma averiguar o seu efeito na farmacogenética da DM2. Todavia dada a baixa frequência de alguns destes SNPs e também de forma a tornar os resultados mais fiáveis e representativos da população é aconselhável aqui também utilizar amostras mais alargadas.

Por fim é também aconselhável alargar a pesquisa de novos potenciais SNPs candidatos a outros genes alvo.

Bibliografia

1. Federation ID. IDF Diabetes atlas. Sixth edition ed2013 2013.
2. Glauber H, Rische N, Karnieli E. Introduction to Personalized Medicine in Diabetes Mellitus. Rambam Maimonides Medical Journal. 2014;5(1):e0002.
3. Ma Q, Lu AY. Pharmacogenetics, pharmacogenomics, and individualized medicine. Pharmacological reviews. 2011;63(2):437-59.
4. Gardete Correia L, Boavida JM, Fragoso de Almeida JP, Massano Cardoso S, Dores J, Sequeira Duarte J, et al. Diabetes: Factos e Números 2013– Relatório Anual do Observatório Nacional da Diabetes: Sociedade Portuguesa de Diabetologia; 2013.
5. Diabéticos APd. Diabetes Tipo 2: Um Guia de apoio e Orientação. Lisboa, Lidel–Edições Técnicas, Lda; 2009.
6. Dean L, McEntyre J. The genetic landscape of diabetes. 2004.
7. Shaw J, Sicree R, Zimmet P. Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030. Diabetes research and clinical practice. 2010;87(1):4-14.
8. Champe PC, Harvey RA, Ferrier DR. Biochemistry: Lippincott Williams & Wilkins; 2005. 12 p.
9. Langley CH, Crow JF. The direction of linkage disequilibrium. Genetics. 1974;78:937-41.
10. Maahs DM, West NA, Lawrence JM, Mayer-Davis EJ. Epidemiology of type 1 diabetes. Endocrinology and metabolism clinics of North America. 2010;39(3):481.
11. Watkins PJ. ABC of Diabetes; Treatment of Type 2 diabetes mellitus. London: Blackwell Publishing Ltd.; 2003. p. 5.
12. Golan DE, Tashjian AH, Armstrong EJ. Principles of pharmacology: the pathophysiologic basis of drug therapy: Lippincott Williams & Wilkins; 2011. 16 p.
13. Infopédia I. pâncreas Porto: Porto Editora; 2003-2014 [cited 2014 2014-05-03]. Available from: [http://www.infopedia.pt/\\$pancreas](http://www.infopedia.pt/$pancreas).
14. Nelson DL, Lehninger AL, Cox MM. Lehninger principles of biochemistry: Macmillan; 2008.
15. de la Vega M-LL. Beta-Cell Function and Failure in Type 1 Diabetes. 2011.

16. Nichols CG. KATP and Sulfonylurea Receptor. *Encyclopedia of Biophysics*: Springer; 2013. p. 1175-82.
17. Mealey BL. *Diabetes Complications Health* [cited 2014 18 January 2014]. Available from: <http://www.health.am/db/diabetes-complications/>.
18. Gardete Correia L, Boavida JM, Fragoso de Almeida JP, Massano Cardoso S, Dores J, Sequeira Duarte J, et al. *Diabetes: Factos e Números 2012– Relatório Anual do Observatório Nacional da Diabetes: Sociedade Portuguesa de Diabetologia*; 2012.
19. Group TDCaCTR. The Effect of Intensive Treatment of Diabetes on the Development and Progression of Long-Term Complications in Insulin-Dependent Diabetes Mellitus. *New England Journal of Medicine*. 1993;329(14):977-86.
20. Watkins PJ. *ABC of Diabetes; Diabetic complications: cause and prevention*: London: Blackwell Publishing Ltd.; 2003. 11 p.
21. Holman RR, Paul SK, Bethel MA, Matthews DR, Neil HAW. 10-Year Follow-up of Intensive Glucose Control in Type 2 Diabetes. *New England Journal of Medicine*. 2008;359(15):1577-89.
22. Ohkubo Y, Kishikawa H, Araki E, Miyata T, Isami S, Motoyoshi S, et al. Intensive insulin therapy prevents the progression of diabetic microvascular complications in Japanese patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus: a randomized prospective 6-year study. *Diabetes research and clinical practice*. 1995;28(2):103-17.
23. Ismail-Beigi F, Craven T, Banerji MA, Basile J, Calles J, Cohen RM, et al. Effect of intensive treatment of hyperglycaemia on microvascular outcomes in type 2 diabetes: an analysis of the ACCORD randomised trial. *The Lancet*. 2010;376(9739):419-30.
24. Group TAC. Intensive Blood Glucose Control and Vascular Outcomes in Patients with Type 2 Diabetes. *New England Journal of Medicine*. 2008;358(24):2560-72.
25. Cade WT. Diabetes-related microvascular and macrovascular diseases in the physical therapy setting. *Physical therapy*. 2008;88(11):1322-35.
26. Pories WJ, Dohm GL. Diabetes: have we got it all wrong? Hyperinsulinism as the culprit: surgery provides the evidence. *Diabetes care*. 2012;35(12):2438-42.
27. Garber AJ. Long-Acting Glucagon-Like Peptide 1 Receptor Agonists A review of their efficacy and tolerability. *Diabetes Care*. 2011;34(Supplement 2):S279-S84.

28. Leeuwen N, Swen JJ, Guchelaar HJ, 't Hart LM. The Role of Pharmacogenetics in Drug Disposition and Response of Oral Glucose-Lowering Drugs. *Clinical Pharmacokinetics*. 2013;52(10):833-54.
29. INFARMED – Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde IMdS. *Prontuário Terapêutico* – 112012.
30. Proks P, Reimann F, Green N, Gribble F, Ashcroft F. Sulfonylurea stimulation of insulin secretion. *Diabetes*. 2002;51(suppl 3):S368-S76.
31. Semiz S, Dujic T, Causevic A. Pharmacogenetics and personalized treatment of type 2 diabetes. *Biochemia medica*. 2013;23(2):154-71.
32. Mannino G, Sesti G. Individualized Therapy for Type 2 Diabetes. *Molecular Diagnosis & Therapy*. 2012;16(5):285-302.
33. Zhou G, Myers R, Li Y, Chen Y, Shen X, Fenyk-Melody J, et al. Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. *The Journal of clinical investigation*. 2001;108(108 (8)):1167-74.
34. Golan DE, Tashjian AH, Armstrong EJ. *Principles of pharmacology: the pathophysiologic basis of drug therapy*: Lippincott Williams & Wilkins; 2011.
35. Koole C, Wootten D, Simms J, Valant C, Miller LJ, Christopoulos A, et al. Polymorphism and ligand dependent changes in human glucagon-like peptide-1 receptor (GLP-1R) function: allosteric rescue of loss of function mutation. *Molecular pharmacology*. 2011;80(3):486-97.
36. Doyle ME, Egan JM. Mechanisms of action of glucagon-like peptide 1 in the pancreas. *Pharmacology & Therapeutics*. 2007;113(3):546-93.
37. Malm-Erjefält M, Bjørnsdottir I, Vanggaard J, Helleberg H, Larsen U, Oosterhuis B, et al. Metabolism and excretion of the once-daily human glucagon-like peptide-1 analog liraglutide in healthy male subjects and its in vitro degradation by dipeptidyl peptidase IV and neutral endopeptidase. *Drug Metabolism and Disposition*. 2010;38(11):1944-53.
38. database D. DrugBank [cited 2013 13 November 2013]. Available from: <http://www.drugbank.ca/>.
39. Scheen A. Pharmacokinetics of dipeptidylpeptidase-4 inhibitors. *Diabetes, Obesity and Metabolism*. 2010;12(8):648-58.
40. Ryan GJ, Jobe LJ, Martin R. Pramlintide in the treatment of type 1 and type 2 diabetes mellitus. *Clinical therapeutics*. 2005;27(10):1500-12.

41. Roth JD, Mack CM, Soares CJ, Ghosh SS, Parkes DG. Amylin-based pharmacotherapy-past, present & future. *Immunology, Endocrine & Metabolic Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Immunology, Endocrine and Metabolic Agents)*. 2008;8(4):317-24.
42. Nyenwe EA, Jerkins TW, Umpierrez GE, Kitabchi AE. Management of type 2 diabetes: evolving strategies for the treatment of patients with type 2 diabetes. *Metabolism*. 2011;60(1):1-23.
43. Raffa RB. *Netter's illustrated pharmacology: Icon Learning Systems Teterboro, NJ; 2005. 1 p.*
44. Metzger IF, Souza-Costa DC, Tanus-Santos JE. Farmacogenética: princípios, aplicações e perspectivas. *Medicina (Ribeirão Preto)*. 2006;39(4):515-21.
45. Daly A. Pharmacogenetics and human genetic polymorphisms. *Biochemical Journal*. 2010;429:435-49.
46. Wang L. *Pharmacogenomics: a systems approach. Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine*. 2010;2(1):3-22.
47. PharmGKB. Questions about pharmacogenomics and definitions 2013 [cited 2013 12/11/2013]. Available from: <http://www.pharmgkb.org/page/faqs>.
48. Pirmohamed M. Pharmacogenetics: past, present and future. *Drug discovery today*. 2011;16(19):852-61.
49. Jain KK. Applications of AmpliChip™ CYP450. *Molecular Diagnosis*. 2005;9(3):119-27.
50. Ruzilawati A, Gan S. CYP3A4 genetic polymorphism influences repaglinide's pharmacokinetics. *Pharmacology*. 2010;85(6):357-64.
51. Zhang Y, Si D, Chen X, Lin N, Guo Y, Zhou H, et al. Influence of CYP2C9 and CYP2C19 genetic polymorphisms on pharmacokinetics of gliclazide MR in Chinese subjects. *British Journal of Clinical Pharmacology*. 2007;64(1):67-74.
52. SLC gene family Genetics Home References2012 [cited 2014 03/06/2014]. Available from: <http://ghr.nlm.nih.gov/geneFamily/slc>.
53. Xiang Q, Cui YM, Zhao X, Yan L, Zhou Y. The Influence of MDR1 G2677T/a genetic polymorphisms on the pharmacokinetics of repaglinide in healthy Chinese volunteers. *Pharmacology*. 2012;89(1-2):105-10.
54. Cheng AY, Fantus IG. Oral antihyperglycemic therapy for type 2 diabetes mellitus. *Canadian Medical Association Journal*. 2005;172(2):213-26.

55. Schroner Z, Javorský M, Halušková J, Klimčáková L, Babjaková E, Fabianová M, et al. Variation in CDKAL1 gene is associated with therapeutic response to sulphonylureas. *Physiological Research*. 2012;61(2).
56. Wang J, HU C, ZHANG R, XIANG Ks. Effects of ABCA1 variants on rosiglitazone monotherapy in newly diagnosed type 2 diabetes patients. *Acta Pharmacologica Sinica*. 2008;29(2):252-8.
57. Schroner Z, Dobrikova M, Klimcakova L, Javorsky M, Zidzik J, Kozarova M, et al. Variation in KCNQ1 is associated with therapeutic response to sulphonylureas. *Medical science monitor: international medical journal of experimental and clinical research*. 2011;17(7):CR392.
58. Renata Polessi B, Jair Rodrigues Garcia J. Regulação da expressão gênica das UCP2 e UCP3 pela restrição energética, jejum e exercício físico. *Revista de Nutrição*. 2005;18(6).
59. Dong M, Gong ZC, Dai XP, Lei GH, Lu HB, Fan L, et al. Serine racemase rs391300 G/A polymorphism influences the therapeutic efficacy of metformin in Chinese patients with diabetes mellitus type 2. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*. 2011;38(12):824-9.
60. GeneCards [cited 2014 12/06/2014]. Available from: <http://www.genecards.org/>.
61. Florez JC, Jablonski KA, McAteer JB, Franks PW, Mason CC, Mather K, et al. Effects of genetic variants previously associated with fasting glucose and insulin in the Diabetes Prevention Program. *PloS one*. 2012;7(9):e44424.
62. Yu W, Hu C, Zhang R, Wang C, Qin W, Lu J, et al. Effects of KCNQ1 polymorphisms on the therapeutic efficacy of oral antidiabetic drugs in Chinese patients with type 2 diabetes. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*. 2011;89(3):437-42.
63. Schäfer S, Müssig K, Staiger H, Machicao F, Stefan N, Gallwitz B, et al. A common genetic variant in WFS1 determines impaired glucagon-like peptide-1-induced insulin secretion. *Diabetologia*. 2009;52(6):1075-82.
64. Kloth L, Belge G, Burchardt K, Loeschke S, Wosniok W, Fu X, et al. Decrease in thyroid adenoma associated (THADA) expression is a marker of dedifferentiation of thyroid tissue. *BMC clinical pathology*. 2011;11(1):13.
65. Schäfer S, Tschritter O, Machicao F, Thamer C, Stefan N, Gallwitz B, et al. Impaired glucagon-like peptide-1-induced insulin secretion in carriers of

- transcription factor 7-like 2 (TCF7L2) gene polymorphisms. *Diabetologia*. 2007;50(12):2443-50.
66. Simonis-Bik AM, Nijpels G, van Haeften TW, Houwing-Duistermaat JJ, Boomsma DI, Reiling E, et al. Gene variants in the novel type 2 diabetes loci CDC123/CAMK1D, THADA, ADAMTS9, BCL11A, and MTNR1B affect different aspects of pancreatic β -cell function. *Diabetes*. 2010;59(1):293-301.
 67. Yang M, Huang Q, Wu J, Yin J-Y, Sun H, Liu H-L, et al. Effects of UCP2 -866 G/A and ADRB3 Trp64Arg on rosiglitazone response in Chinese patients with Type 2 diabetes. *British Journal of Clinical Pharmacology*. 2009;68(1):14-22.
 68. Kang ES, Park SE, Han SJ, Kim SH, Nam CM, Ahn CW, et al. LPIN1 genetic variation is associated with rosiglitazone response in type 2 diabetic patients. *Molecular genetics and metabolism*. 2008;95(1):96-100.
 69. Zhang KH, Huang Q, Dai XP, Yin JY, Zhang W, Zhou G, et al. Effects of the Peroxisome Proliferator Activated Receptor- γ Coactivator-1 α (PGC-1 α) Thr394Thr and Gly482Ser Polymorphisms on Rosiglitazone Response in Chinese Patients With Type 2 Diabetes Mellitus. *The Journal of Clinical Pharmacology*. 2010;50(9):1022-30.
 70. Yang Q, Graham TE, Mody N, Preitner F, Peroni OD, Zabolotny JM, et al. Serum retinol binding protein 4 contributes to insulin resistance in obesity and type 2 diabetes. *Nature*. 2005;436(7049):356-62.
 71. Wang G, Wang X, Zhang Q, Ma Z. Response to pioglitazone treatment is associated with the lipoprotein lipase S447X variant in subjects with type 2 diabetes mellitus. *International journal of clinical practice*. 2007;61(4):552-7.
 72. Andrulionyte L, Zacharova J, Chiasson J-L, Laakso M. Common polymorphisms of the PPAR- γ 2 (Pro12Ala) and PGC-1 α (Gly482Ser) genes are associated with the conversion from impaired glucose tolerance to type 2 diabetes in the STOP-NIDDM trial. *Diabetologia*. 2004;47(12):2176-84.
 73. Zacharova J, Chiasson J-L, Laakso M. The Common Polymorphisms (Single Nucleotide Polymorphism [SNP]+ 45 and SNP+ 276) of the Adiponectin Gene Predict the Conversion From Impaired Glucose Tolerance to Type 2 Diabetes The STOP-NIDDM Trial. *Diabetes*. 2005;54(3):893-9.
 74. Andrulionytė L, Kuulasmaa T, Chiasson J-L, Laakso M. Single Nucleotide Polymorphisms of the Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- α Gene

- (PPARA) Influence the Conversion From Impaired Glucose Tolerance to Type 2 Diabetes The STOP-NIDDM Trial. *Diabetes*. 2007;56(4):1181-6.
75. Leeuwen N, Nijpels G, Becker ML, Deshmukh H, Zhou K, Stricker BHC, et al. A gene variant near ATM is significantly associated with metformin treatment response in type 2 diabetes: a replication and meta-analysis of five cohorts. *Diabetologia*. 2012;55(7):1971-7.
 76. Goldgar DE, Healey S, Dowty JG, Da Silva L, Chen X, Spurdle AB, et al. Rare variants in the ATM gene and risk of breast cancer. *Breast Cancer Research*. 2011;13(4):R73.
 77. Huang Q, Yin J-y, Dai X-p, Pei Q, Dong M, Zhou Z-g, et al. IGF2BP2 variations influence repaglinide response and risk of type 2 diabetes in Chinese population. *Acta Pharmacologica Sinica*. 2010;31(6):709-17.
 78. White L. History of DNA Sequencing Technologies. In: Wong L-JC, editor. *Next Generation Sequencing*: Springer New York; 2013. p. 3-17.
 79. Mardis ER. Next-generation sequencing platforms. *Annual review of analytical chemistry*. 2013;6:287-303.
 80. Cui H. Methods of Gene Enrichment and Massively Parallel Sequencing Technologies. *Next Generation Sequencing*: Springer; 2013. p. 39-58.
 81. Rabbani B, Tekin M, Mahdieh N. The promise of whole-exome sequencing in medical genetics. *Journal of human genetics*. 2014;59(1):5-15.
 82. Guo Y, Long J, He J, Li C-I, Cai Q, Shu X-O, et al. Exome sequencing generates high quality data in non-target regions. *BMC genomics*. 2012;13(1):194.
 83. Biesecker LG, Shianna KV, Mullikin JC. Exome sequencing: the expert view. *Genome Biology*. 2011;12(9):128.
 84. 23andMe. Exome 80x pilot program 23andMe2014 [cited 2014 17/08/2014]. Available from: <https://www.23andme.com/exome/>.
 85. Bell C. Accessing and Selecting Genetic Markers from Available Resources. In: Yu B, Hinchcliffe M, editors. *In Silico Tools for Gene Discovery*. *Methods in Molecular Biology*. 760: Humana Press; 2011. p. 1-17.
 86. Duran C, Edwards D, Batley J. Molecular marker discovery and genetic map visualisation. *Bioinformatics*: Springer; 2009. p. 165-89.
 87. ClinVar [cited 2014 10/04/2014]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>.

88. SNPedia [cited 2013 10 November 2013]. Available from: <http://www.snpedia.com/index.php/SNPedia>.
89. Sherry ST. dbSNP: the NCBI database of genetic variation. *Nucleic Acids Res.* 2001;29:308-11.
90. Ensembl [cited 2014 10/01/2014]. Available from: <http://www.ensembl.org/index.html>.
91. Corporation LT. TMAP: The Torrent Mapping Alignment Program for Ion Torrent 2013 [cited 2014 10/05/2014]. Available from: http://mendel.iontorrent.com/ion-docs/Technical-Note---TMAP-Alignment_9012907.html.
92. Ling Y, Jin Z, Su M, Zhong J, Zhao Y, Yu J, et al. VCGDB: a dynamic genome database of the Chinese population. *BMC genomics.* 2014;15(1):265.
93. Corporation LT. Torrent Variant Caller Plugin 2013 [cited 2014 10/05/2014]. Available from: <http://mendel.iontorrent.com/ion-docs/Torrent-Variant-Caller-Plugin.html>.
94. Danecek P, Auton A, Abecasis G, Albers CA, Banks E, DePristo MA, et al. The variant call format and VCFtools. *Bioinformatics.* 2011;27(15):2156-8.
95. Paila U, Chapman BA, Kirchner R, Quinlan AR. GEMINI: integrative exploration of genetic variation and genome annotations. *PLoS computational biology.* 2013;9(7):e1003153.
96. Thorvaldsdóttir H, Robinson JT, Mesirov JP. Integrative Genomics Viewer (IGV): high-performance genomics data visualization and exploration. *Briefings in bioinformatics.* 2013;14(2):178-92.
97. Nikolac N, Simundic A-M, Katalinic D, Topic E, Cipak A, Zjajic Rotkvic V. Metabolic control in type 2 diabetes is associated with sulfonylurea receptor-1 (SUR-1) but not with KCNJ11 polymorphisms. *Archives of medical research.* 2009;40(5):387-92.
98. Hansen T, Echwald SM, Hansen L, Møller AM, Almind K, Clausen JO, et al. Decreased tolbutamide-stimulated insulin secretion in healthy subjects with sequence variants in the high-affinity sulfonylurea receptor gene. *Diabetes.* 1998;47(4):598-605.
99. Kirchheiner J, Brockmoller J, Meineke I, Bauer S, Rohde W, Meisel C, et al. Impact of CYP2C9 amino acid polymorphisms on glyburide kinetics and on the

- insulin and glucose response in healthy volunteers. *Clinical Pharmacology and Therapeutics-St Louis*. 2002;71(4):286-96.
100. Niemi M, Cascorbi I, Timm R, Kroemer HK, Neuvonen PJ, Kivistö KT. Glyburide and glimepiride pharmacokinetics in subjects with different CYP2C9 genotypes. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*. 2002;72(3):326-32.
 101. Kirchheiner J, Bauer S, Meineke I, Rohde W, Prang V, Meisel C, et al. Impact of CYP2C9 and CYP2C19 polymorphisms on tolbutamide kinetics and the insulin and glucose response in healthy volunteers. *Pharmacogenetics and Genomics*. 2002;12(2):101-9.
 102. Lee CR, Pieper JA, Hinderliter AL, Blaisdell JA, Goldstein JA. Evaluation of cytochrome P4502C9 metabolic activity with tolbutamide in CYP2C9* 1 heterozygotes. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*. 2002;72(5):562-71.
 103. Holstein A, Plaschke A, Ptak M, Egberts EH, El-Din J, Brockmüller J, et al. Association between CYP2C9 slow metabolizer genotypes and severe hypoglycaemia on medication with sulphonylurea hypoglycaemic agents. *British journal of clinical pharmacology*. 2005;60(1):103-6.
 104. Zhou K, Donnelly L, Burch L, Tavendale R, Doney ASF, Leese G, et al. Loss-of-Function CYP2C9 Variants Improve Therapeutic Response to Sulfonylureas in Type 2 Diabetes: A Go-DARTS Study. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*. 2010;87(1):52-6.
 105. Sesti G, Marini MA, Cardellini M, Sciacqua A, Frontoni S, Andreozzi F, et al. The Arg972 variant in insulin receptor substrate-1 is associated with an increased risk of secondary failure to sulfonylurea in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care*. 2004;27(6):1394-8.
 106. Seeringer A, Parmar S, Fischer A, Altissimo B, Zondler L, Lebedeva E, et al. Genetic variants of the insulin receptor substrate-1 are influencing the therapeutic efficacy of oral antidiabetics. *Diabetes, Obesity and Metabolism*. 2010;12(12):1106-12.
 107. Javorsky M, Klimcakova L, Schroner Z, Zidzik J, Babjakova E, Fabianova M, et al. KCNJ11 gene E23K variant and therapeutic response to sulfonylureas. *European Journal of Internal Medicine*. 2012;23(3):245-9.
 108. Sesti G, Laratta E, Cardellini M, Andreozzi F, Del Guerra S, Irace C, et al. The E23K variant of KCNJ11 encoding the pancreatic β -cell adenosine 5'-triphosphate-sensitive potassium channel subunit Kir6. 2 is associated with an

- increased risk of secondary failure to sulfonylurea in patients with Type 2 diabetes. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2006;91(6):2334-9.
109. Holstein A, Hahn M, Stumvoll M, Kovacs P. The E23K variant of KCNJ11 and the risk for severe sulfonylurea-induced hypoglycemia in patients with type 2 diabetes. *Hormone and metabolic research*. 2009;41(05):387-90.
 110. Niemi M, Leathart JB, Neuvonen M, Backman JT, Daly AK, Neuvonen PJ. Polymorphism in CYP2C8 is associated with reduced plasma concentrations of repaglinide. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*. 2003;74(4):380-7.
 111. Niemi M, Backman JT, Kajosaari LI, Leathart JB, Neuvonen M, Daly AK, et al. Polymorphic Organic Anion Transporting Polypeptide 1B1 is a Major Determinant of Repaglinide Pharmacokinetics. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*. 2005;77(6):468-78.
 112. Kirchheiner J, Meineke I, Müller G, Bauer S, Rohde W, Meisel C, et al. Influence of CYP2C9 and CYP2D6 polymorphisms on the pharmacokinetics of nateglinide in genotyped healthy volunteers. *Clinical pharmacokinetics*. 2004;43(4):267-78.
 113. Kalliokoski A, Neuvonen M, Neuvonen PJ, Niemi M. The effect of SLCO1B1 polymorphism on repaglinide pharmacokinetics persists over a wide dose range. *British journal of clinical pharmacology*. 2008;66(6):818-25.
 114. Kalliokoski A, Backman JT, Neuvonen PJ, Niemi M. Effects of the SLCO1B1*1B haplotype on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of repaglinide and nateglinide. *Pharmacogenetics and genomics*. 2008;18(11):937-42.
 115. Kirchheiner J, Thomas S, Bauer S, Tomalik-Scharte D, Hering U, Doroshenko O, et al. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of rosiglitazone in relation to CYP2C8 genotype. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*. 2006;80(6):657-67.
 116. Aquilante CL, Kosmiski LA, Bourne DW, Bushman LR, Daily EB, Hammond KP, et al. Impact of the CYP2C8*3 polymorphism on the drug–drug interaction between gemfibrozil and pioglitazone. *British journal of clinical pharmacology*. 2013;75(1):217-26.
 117. Kadam R, Bourne D, Kompella U, Aquilante C. Effect of Cytochrome P450 2C8*3 on the Population Pharmacokinetics of Pioglitazone in Healthy Caucasian Volunteers. *Biological & pharmaceutical bulletin*. 2012;36(2):245-51.
 118. Tzvetkov M, Vormfelde S, Balen D, Meineke I, Schmidt T, Sehr D, et al. The effects of genetic polymorphisms in the organic cation transporters OCT1, OCT2,

- and OCT3 on the renal clearance of metformin. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*. 2009;86(3):299-306.
119. Zhou K, Burch L, Hattersley AT, McCarthy MI, Morris AD, Palmer CNA, et al. PPARG, insulin resistance and metformin pharmacogenetics-A GoDARTS study. *Diabetes*. 2010;59:A115-A.
 120. Fava C, Ricci M, Melander O, Minuz P. Hypertension, cardiovascular risk and polymorphisms in genes controlling the cytochrome P450 pathway of arachidonic acid: A sex-specific relation? *Prostaglandins & Other Lipid Mediators*. 2012;98(3-4):75-85.
 121. Becker M, Visser L, Trienekens P, Hofman A, Van Schaik R, Stricker B. Cytochrome P450 2C9* 2 and* 3 polymorphisms and the dose and effect of sulfonylurea in type II diabetes mellitus. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*. 2008;83(2):288-92.
 122. Gökalp O, Gunes A, Çam H, Cure E, Aydın O, Tamer MN, et al. Mild hypoglycaemic attacks induced by sulphonylureas related to CYP2C9, CYP2C19 and CYP2C8 polymorphisms in routine clinical setting. *European Journal of Clinical Pharmacology*. 2011;67(12):1223-9.
 123. Yin OQ, Tomlinson B, Chow MS. CYP2C9, but not CYP2C19, polymorphisms affect the pharmacokinetics and pharmacodynamics of glyburide in Chinese subjects*. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*. 2005;78(4):370-7.
 124. Shon J-H, Yoon Y-R, Kim K-A, Lim Y-C, Lee K-J, Park J-Y, et al. Effects of CYP2C19 and CYP2C9 genetic polymorphisms on the disposition of and blood glucose lowering response to tolbutamide in humans. *Pharmacogenetics and Genomics*. 2002;12(2):111-9.
 125. Suzuki K, Yanagawa T, Shibasaki T, Kaniwa N, Hasegawa R, Tohkin M. Effect of CYP2C9 genetic polymorphisms on the efficacy and pharmacokinetics of glimepiride in subjects with type 2 diabetes. *Diabetes Research and Clinical Practice*. 2006;72(2):148-54.
 126. Swen JJ, Wessels JA, Krabben A, Assendelft WJ, Guchelaar H-J. Effect of CYP2C9 polymorphisms on prescribed dose and time-to-stable dose of sulfonylureas in primary care patients with Type 2 diabetes mellitus. *Pharmacogenomics*. 2010;11(11):1517-23.
 127. Cheng Y, Wang G, Zhang W, Fan L, Chen Y, Zhou H-H. Effect of CYP2C9 and SLCO1B1 polymorphisms on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of

- nateglinide in healthy Chinese male volunteers. *European Journal of Clinical Pharmacology*. 2013;69(3):407-13.
128. Bidstrup TB, Damkier P, Olsen AK, Ekblom M, Karlsson A, Brøsen K. The impact of CYP2C8 polymorphism and grapefruit juice on the pharmacokinetics of repaglinide. *British journal of clinical pharmacology*. 2006;61(1):49-57.
 129. Tornio A, Niemi M, Neuvonen PJ, Backman JT. Trimethoprim and the CYP2C8*3 allele have opposite effects on the pharmacokinetics of pioglitazone. *Drug Metabolism and Disposition*. 2008;36(1):73-80.
 130. Hruska M, Amico J, Langae T, Ferrell R, Fitzgerald S, Frye R. The effect of trimethoprim on CYP2C8 mediated rosiglitazone metabolism in human liver microsomes and healthy subjects. *British journal of clinical pharmacology*. 2005;59(1):70-9.
 131. Yu M, Xu X, Yin J, Wu J, Chen X, Gong Z, et al. KCNJ11 Lys23Glu and TCF7L2 rs290487 (C/T) polymorphisms affect therapeutic efficacy of repaglinide in Chinese patients with type 2 diabetes. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*. 2010;87(3):330-5.
 132. Lang VY, Fatehi M, Light PE. Pharmacogenomic analysis of ATP-sensitive potassium channels coexpressing the common type 2 diabetes risk variants E23K and S1369A. *Pharmacogenetics and genomics*. 2012;22(3):206-14.
 133. Hamming KS, Soliman D, Matemisz LC, Niazi O, Lang Y, Gloyn AL, et al. Coexpression of the Type 2 Diabetes Susceptibility Gene Variants KCNJ11 E23K and ABCC8 S1369A Alter the ATP and Sulfonylurea Sensitivities of the ATP-Sensitive K⁺ Channel. *Diabetes*. 2009;58(10):2419.
 134. Nature America I. E pluribus unum2010. Available from: <http://www.nature.com/nmeth/journal/v7/n5/full/nmeth0510-331.html>.
 135. Zhang W, He YJ, Han CT, Liu ZQ, Li Q, Fan L, et al. Effect of SLCO1B1 genetic polymorphism on the pharmacokinetics of nateglinide. *British journal of clinical pharmacology*. 2006;62(5):567-72.
 136. Kalliokoski A, Neuvonen M, Neuvonen PJ, Niemi M. Different effects of SLCO1B1 polymorphism on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of repaglinide and nateglinide. *The Journal of Clinical Pharmacology*. 2008;48(3):311-21.

137. Kalliokoski A, Neuvonen M, Neuvonen PJ, Niemi M. No significant effect of SLCO1B1 polymorphism on the pharmacokinetics of rosiglitazone and pioglitazone. *British Journal of Clinical Pharmacology*. 2008;65(1):78-86.
138. He J, Qiu Z, Li N, Yu Y, Lu Y, Han D, et al. Effects of SLCO1B1 polymorphisms on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of repaglinide in healthy Chinese volunteers. *European Journal of Clinical Pharmacology*. 2011;67(7):701-7.
139. Shu Y, Brown C, Castro R, Shi R, Lin E, Owen R, et al. Effect of genetic variation in the organic cation transporter 1, OCT1, on metformin pharmacokinetics. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*. 2008;83(2):273-80.
140. Zhou K, Donnelly LA, Kimber CH, Donnan PT, Doney AS, Leese G, et al. Reduced-function SLC22A1 polymorphisms encoding organic cation transporter 1 and glycemic response to metformin: a GoDARTS study. *Diabetes*. 2009;58(6):1434-9.
141. Blüher M, Lübken G, Paschke R. Analysis of the relationship between the Pro12Ala variant in the PPAR- γ 2 gene and the response rate to therapy with pioglitazone in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care*. 2003;26(3):825-31.
142. Hsieh M-C, Lin K-D, Tien K-J, Tu S-T, Hsiao J-Y, Chang S-J, et al. Common polymorphisms of the peroxisome proliferator-activated receptor- γ (Pro12Ala) and peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator-1 (Gly482Ser) and the response to pioglitazone in Chinese patients with type 2 diabetes mellitus. *Metabolism*. 2010;59(8):1139-44.
143. Kang ES, Park SY, Kim HJ, Kim CS, Ahn CW, Cha BS, et al. Effects of Pro12Ala polymorphism of peroxisome proliferator-activated receptor γ 2 gene on rosiglitazone response in type 2 diabetes. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*. 2005;78(2):202-8.
144. Sims D, Sudbery I, Illott NE, Heger A, Ponting CP. Sequencing depth and coverage: key considerations in genomic analyses. *Nature Reviews Genetics*. 2014;15(2):121-32.
145. Consortium GP. An integrated map of genetic variation from 1,092 human genomes. *Nature*. 2012;491(7422):56-65.
146. Bahadur N, Leathart JBS, Mutch E, Steimel-Crespi D, Dunn SA, Gilissen R, et al. CYP2C8 polymorphisms in Caucasians and their relationship with paclitaxel 6 α -hydroxylase activity in human liver microsomes. *Biochemical Pharmacology*. 2002;64(11):1579-89.

147. Surendiran A, Pradhan S, Agrawal A, Subrahmanyam D, Rajan S, Anichavezhi D, et al. Influence of CYP2C9 gene polymorphisms on response to glibenclamide in type 2 diabetes mellitus patients. *European Journal of Clinical Pharmacology*. 2011;67(8):797-801.
148. Wang R, Chen K, Wen S-y, Li J, Wang S-q. Pharmacokinetics of glimepiride and cytochrome P450 2C9 genetic polymorphisms. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*. 2005;78(1):90-2.
149. Ragia G, Petridis I, Tavridou A, Christakidis D, Manolopoulos VG. Presence of CYP2C9* 3 allele increases risk for hypoglycemia in Type 2 diabetic patients treated with sulfonylureas. *Pharmacogenomics*. 2009;10(11):1781-7.
150. Klen J, Dolžan V, Janež A. CYP2C9, KCNJ11 and ABCC8 polymorphisms and the response to sulphonylurea treatment in type 2 diabetes patients. *European Journal of Clinical Pharmacology*. 2014;70(4):421-8.
151. Blaisdell J, Jorge-Nebert LF, Coulter S, Ferguson SS, Lee S-J, Chanas B, et al. Discovery of new potentially defective alleles of human CYP2C9. *Pharmacogenetics and Genomics*. 2004;14(8):527-37.
152. Cho H-J, Lee S-Y, Kim Y-G, Oh S-Y, Kim J-W, Huh W-S, et al. Effect of genetic polymorphisms on the pharmacokinetics and efficacy of glimepiride in a Korean population. *Clinica Chimica Acta*. 2011;412(19):1831-4.
153. Gloyn A, Hashim Y, Ashcroft S, Ashfield R, Wiltshire S, Turner R. Association studies of variants in promoter and coding regions of beta-cell ATP-sensitive K-channel genes SUR1 and Kir6. 2 with Type 2 diabetes mellitus (UKPDS 53). *Diabetic medicine*. 2001;18(3):206-12.
154. Feng Y, Mao G, Ren X, Xing H, Tang G, Li Q, et al. Ser1369Ala variant in sulfonylurea receptor gene ABCC8 is associated with antidiabetic efficacy of gliclazide in Chinese type 2 diabetic patients. *Diabetes Care*. 2008;31(10):1939-44.
155. Meirhaeghe A, Helbecque N, Cottel D, Arveiler D, Ruidavets JB, Haas B, et al. Impact of sulfonylurea receptor 1 genetic variability on non-insulin-dependent diabetes mellitus prevalence and treatment: A population study. *American journal of medical genetics*. 2001;101(1):4-8.
156. Holstein JD, Kovacs P, Patzer O, Stumvoll M, Holstein A. The Ser1369Ala variant of ABCC8 and the risk for severe sulfonylurea-induced hypoglycemia in German patients with Type 2 diabetes. *Pharmacogenomics*. 2012;13(1):5-7.

157. Zychma MJ, Gumprecht J, Strojek K, Grzeszczak W, Moczulski D, Trautsolt W, et al. Sulfonylurea receptor gene 16-3 polymorphism–association with sulfonylurea or insulin treatment in type 2 diabetic subjects. *Medical Science Monitor*. 2002;8(7):CR512-CR5.
158. Zhang H, Liu X, Kuang H, Yi R, Xing H. Association of sulfonylurea receptor 1 genotype with therapeutic response to gliclazide in type 2 diabetes. *Diabetes Research and Clinical Practice*. 2007;77(1):58-61.
159. Sato R, Watanabe H, Genma R, Takeuchi M, Maekawa M, Nakamura H. ABCC8 polymorphism (Ser1369Ala): influence on severe hypoglycemia due to sulfonylureas. *Pharmacogenomics*. 2010;11(12):1743-50.
160. Schroner Z, Javorsky M, Tkacova R, Klimcakova L, Dobrikova M, Habalova V, et al. Effect of sulphonylurea treatment on glycaemic control is related to TCF7L2 genotype in patients with type 2 diabetes. *Diabetes, Obesity and Metabolism*. 2011;13(1):89-91.
161. Pearson ER, Donnelly LA, Kimber C, Whitley A, Doney AS, McCarthy MI, et al. Variation in TCF7L2 Influences Therapeutic Response to Sulfonylureas A GoDARTs Study. *Diabetes*. 2007;56(8):2178-82.
162. Holstein A, Hahn M, Körner A, Stumvoll M, Kovacs P. TCF7L2 and therapeutic response to sulfonylureas in patients with type 2 diabetes. *BMC medical genetics*. 2011;12(1):30.
163. Aguilar-Salinas CA, Muñoz-Hernandez LL, Cobos-Bonilla M, Ramírez-Márquez MR, Ordoñez-Sanchez ML, Mehta R, et al. The R230C variant of the ATP binding cassette protein A1 (ABCA1) gene is associated with a decreased response to glyburide therapy in patients with type 2 diabetes mellitus. *Metabolism*. 2013;62(5):638-41.
164. Becker ML, Aarnoudse A-JL, Newton-Cheh C, Hofman A, Wittteman JC, Uitterlinden AG, et al. Common variation in the NOS1AP gene is associated with reduced glucose-lowering effect and with increased mortality in users of sulfonylurea. *Pharmacogenetics and genomics*. 2008;18(7):591-7.
165. Tomalik-Scharte D, Fuhr U, Hellmich M, Frank D, Doroshenko O, Jetter A, et al. Effect of the CYP2C8 genotype on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of repaglinide. *Drug Metabolism and Disposition*. 2011;39(5):927-32.

166. He Y-y, Zhang R, Shao X-y, Hu C, Wang C-r, Lu J-x, et al. Association of KCNJ11 and ABCC8 genetic polymorphisms with response to repaglinide in Chinese diabetic patients. *Acta Pharmacologica Sinica*. 2008;29(8):983-9.
167. Qin W, Zhang R, Hu C, Wang C-r, Lu J-y, Yu W-h, et al. A variation in NOS1AP gene is associated with repaglinide efficacy on insulin resistance in type 2 diabetes of Chinese. *Acta Pharmacologica Sinica*. 2010;31(4):450-4.
168. Wang T, Wang Y, Lv DM, Song JF, Lu Q, Gao X, et al. Effects of NOS1AP rs12742393 Polymorphism on Repaglinide Response in Chinese Patients with Type 2 Diabetes Mellitus. *Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy*. 2013.
169. Wang S, Se Y-M, Liu Z-Q, Lei M-X, Sun Z-X, Nie S-D, et al. Effect of genetic polymorphism of UCP2-866 G/A on repaglinide response in Chinese patients with type 2 diabetes. *Die Pharmazie-An International Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2012;67(1):74-9.
170. Florez JC, Jablonski KA, Kahn SE, Franks PW, Dabelea D, Hamman RF, et al. Type 2 diabetes-associated missense polymorphisms KCNJ11 E23K and ABCC8 A1369S influence progression to diabetes and response to interventions in the Diabetes Prevention Program. *Diabetes*. 2007;56(2):531-6.
171. Huang Q, Yin J-Y, Dai X-P, Wu J, Chen X, Deng C-S, et al. Association analysis of SLC30A8 rs13266634 and rs16889462 polymorphisms with type 2 diabetes mellitus and repaglinide response in Chinese patients. *European Journal of Clinical Pharmacology*. 2010;66(12):1207-15.
172. JIANG F, LI Q, HU C, ZHANG R, WANG CR, YU WH, et al. Association of a SLC30A8 genetic variant with monotherapy of repaglinide and rosiglitazone effect in newly diagnosed type 2 diabetes patients in China. *Biomedical and Environmental Sciences*. 2012;25(1):23-9.
173. Sheng FF, Dai XP, Qu J, Lei GH, Lu HB, Wu J, et al. NAMPT-3186C/T polymorphism affects repaglinide response in Chinese patients with Type 2 diabetes mellitus. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*. 2011;38(8):550-4.
174. Dai XP, Huang Q, Yin JY, Guo Y, Gong ZC, Lei MX, et al. KCNQ1 gene polymorphisms are associated with the therapeutic efficacy of repaglinide in Chinese Type 2 diabetic patients. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*. 2012;39(5):462-8.

175. Pedersen RS, Damkier P, Brosen K. The effects of human CYP2C8 genotype and fluvoxamine on the pharmacokinetics of rosiglitazone in healthy subjects. *British journal of clinical pharmacology*. 2006;62(6):682-9.
176. Aquilante CL, Bushman LR, Knutsen SD, Burt LE, Rome LC, Kosmiski LA. Influence of SLCO1B1 and CYP2C8 gene polymorphisms on rosiglitazone pharmacokinetics in healthy volunteers. *Human genomics*. 2008;3(1):7.
177. Yeo C-W, Lee S-J, Lee SS, Bae SK, Kim E-Y, Shon J-H, et al. Discovery of a novel allelic variant of CYP2C8, CYP2C8* 11, in Asian populations and its clinical effect on the rosiglitazone disposition in vivo. *Drug Metabolism and Disposition*. 2011;39(4):711-6.
178. Aquilante CL, Wempe MF, Spencer SH, Kosmiski LA, Predhomme JA, Sidhom MS. Influence of CYP2C8*2 on the Pharmacokinetics of Pioglitazone in Healthy African-American Volunteers. *Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy*. 2013;33(9):1000-7.
179. Ramírez-Salazar M, Pérez-Luque E, Fajardo-Araujo M, Garza SM, Malacara JM. Effect of the Pro12Ala polymorphism of the PPAR γ 2 gene on response to pioglitazone treatment in menopausal women. *Menopause*. 2008;15(6):1151-6.
180. Makino H, Shimizu I, Murao S, Kondo S, Tabara Y, Fujiyama M, et al. A Pilot Study Suggests that the G/G Genotype of Resistin Single Nucleotide Polymorphism at -420 May Be an Independent Predictor of a Reduction in Fasting Plasma Glucose and Insulin Resistance by Pioglitazone in Type 2 Diabetes. *Endocrine Journal*. 2009;56(9):1049-58.
181. Liu H-L, Lin Y-G, Wu J, Sun H, Gong Z-C, Hu P-C, et al. Impact of genetic polymorphisms of leptin and TNF- α on rosiglitazone response in Chinese patients with type 2 diabetes. *European Journal of Clinical Pharmacology*. 2008;64(7):663-71.
182. Zhou F, Huang Q, Dai X, Yin J, Wu J, Zhou H, et al. Impact of retinol binding protein 4 polymorphism on rosiglitazone response in Chinese type 2 diabetic patients. *Zhong nan da xue xue bao Yi xue ban= Journal of Central South University Medical sciences*. 2011;36(10):949-57.
183. Sun H, Gong Z-C, Yin J-Y, Liu H-L, Liu Y-Z, Guo Z-W, et al. The association of adiponectin allele 45T/G and -11377C/G polymorphisms with Type 2 diabetes and rosiglitazone response in Chinese patients. *British Journal of Clinical Pharmacology*. 2008;65(6):917-26.

184. Kang ES, Park SY, Kim HJ, Ahn CW, Nam M, Cha BS, et al. The influence of adiponectin gene polymorphism on the rosiglitazone response in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care*. 2005;28(5):1139-44.
185. Li Z, Peng X, Wu Y, Xia Y, Liu X, Zhang Q. The influence of adiponectin gene polymorphism on the pioglitazone response in the Chinese with type 2 diabetes. *Diabetes, Obesity and Metabolism*. 2008;10(9):794-802.
186. Pei Q, Huang Q, Yang G-p, Zhao Y-c, Yin J-y, Song M, et al. PPAR- γ 2 and PTPRD gene polymorphisms influence type 2 diabetes patients' response to pioglitazone in China. *Acta Pharmacologica Sinica*. 2012;34(2):255-61.
187. Shu Y, Sheardown SA, Brown C, Owen RP, Zhang S, Castro RA, et al. Effect of genetic variation in the organic cation transporter 1 (OCT1) on metformin action. *Journal of Clinical Investigation*. 2007;117(5):1422-31.
188. Toyama K, Yonezawa A, Tsuda M, Masuda S, Yano I, Terada T, et al. Heterozygous variants of multidrug and toxin extrusions (MATE1 and MATE2-K) have little influence on the disposition of metformin in diabetic patients. *Pharmacogenetics and genomics*. 2010;20(2):135-8.
189. Yoon H, Cho H-Y, Yoo H-D, Kim S-M, Lee Y-B. Influences of organic cation transporter polymorphisms on the population pharmacokinetics of metformin in healthy subjects. *The American Association of Pharmaceutical Scientists journal*. 2013;15(2):571-80.
190. Song I, Shin H, Shim E, Jung I, Kim W, Shon J, et al. Genetic variants of the organic cation transporter 2 influence the disposition of metformin. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*. 2008;84(5):559-62.
191. Wang Z-J, Yin OQ, Tomlinson B, Chow MS. OCT2 polymorphisms and in-vivo renal functional consequence: studies with metformin and cimetidine. *Pharmacogenetics and genomics*. 2008;18(7):637-45.
192. Chen Y, Li S, Brown C, Cheatham S, Castro RA, Leabman MK, et al. Effect of Genetic Variation in the Organic Cation Transporter 2, OCT2, on the Renal Elimination of Metformin. *Pharmacogenetics and genomics*. 2009;19(7):497.
193. Christensen MM, Pedersen RS, Stage TB, Brasch-Andersen C, Nielsen F, Damkier P, et al. A gene-gene interaction between polymorphisms in the OCT2 and MATE1 genes influences the renal clearance of metformin. *Pharmacogenetics and genomics*. 2013;23(10):526-34.

194. Meyer zu Schwabedissen HE, Verstuyft C, Kroemer HK, Becquemont L, Kim RB. Human multidrug and toxin extrusion 1 (MATE1/SLC47A1) transporter: functional characterization, interaction with OCT2 (SLC22A2), and single nucleotide polymorphisms. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*. 2010;298(4):F997-F1005.
195. Chung J-Y, Cho SK, Kim TH, Kim KH, Jang GH, Kim CO, et al. Functional characterization of MATE2-K genetic variants and their effects on metformin pharmacokinetics. *Pharmacogenetics and Genomics*. 2013;23(7):365-73. 10.1097/FPC.0b013e3283622037.
196. Stocker SL, Morrissey KM, Yee SW, Castro RA, Xu L, Dahlin A, et al. The Effect of Novel Promoter Variants in MATE1 and MATE2 on the Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Metformin. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*. 2013;93(2):186-94.
197. Tkáč I, Klimčáková L, Javorský M, Fabianová M, Schroner Z, Hermanová H, et al. Pharmacogenomic association between a variant in SLC47A1 gene and therapeutic response to metformin in type 2 diabetes. *Diabetes, Obesity and Metabolism*. 2013;15(2):189-91.
198. Becker M, Visser L, van Schaik R, Hofman A, Uitterlinden A, Stricker B. Genetic variation in the organic cation transporter 1 is associated with metformin response in patients with diabetes mellitus. *The pharmacogenomics journal*. 2009;9(4):242-7.
199. Shikata E, Yamamoto R, Takane H, Shigemasa C, Ikeda T, Otsubo K, et al. Human organic cation transporter (OCT1 and OCT2) gene polymorphisms and therapeutic effects of metformin. *Journal of Human Genetics*. 2006;52(2):117-22.
200. Jablonski KA, McAteer JB, de Bakker PI, Franks PW, Pollin TI, Hanson RL, et al. Common variants in 40 genes assessed for diabetes incidence and response to metformin and lifestyle intervention in the diabetes prevention program. *Diabetes*. 2010;59(10):2672-81.
201. Li Q, Liu F, Zheng T-s, Tang J-l, Lu H-j, Jia W-p. SLC22A2 gene 808 G/T variant is related to plasma lactate concentration in Chinese type 2 diabetics treated with metformin. *Acta Pharmacologica Sinica*. 2010;31(2):184-90.
202. Christensen MM, Brasch-Andersen C, Green H, Nielsen F, Damkier P, Beck-Nielsen H, et al. The pharmacogenetics of metformin and its impact on plasma

- metformin steady-state levels and glycosylated hemoglobin A1c. *Pharmacogenetics and genomics*. 2011;21(12):837-50.
203. Becker ML, Visser LE, van Schaik RH, Hofman A, Uitterlinden AG, Stricker BHC. Genetic variation in the multidrug and toxin extrusion 1 transporter protein influences the glucose-lowering effect of metformin in patients with diabetes: a preliminary study. *Diabetes*. 2009;58(3):745-9.
204. Choi J, Yee S, Ramirez A, Morrissey K, Jang G, Joski P, et al. A common 5'-UTR variant in MATE2-K is associated with poor response to metformin. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*. 2011;90(5):674-84.
205. Becker ML, Visser LE, van Schaik RH, Hofman A, Uitterlinden AG, Stricker BHC. Interaction between polymorphisms in the OCT1 and MATE1 transporter and metformin response. *Pharmacogenetics and genomics*. 2010;20(1):38-44.
206. Choi JH, Yee SW, Ramirez AH, Morrissey KM, Jang GH, Joski PJ, et al. A Common 5[prime]-UTR Variant in MATE2-K Is Associated With Poor Response to Metformin. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*. 2011;90(5):674-84.
207. Ertunc D, Tok E, Aktas A, Erdal E, Dilek S. The importance of IRS-1 Gly972Arg polymorphism in evaluating the response to metformin treatment in polycystic ovary syndrome. *Human Reproduction*. 2005;20(5):1207-12.
208. GoDARTS, Group UDPS, 2 WTCCC. Common variants near ATM are associated with glycemic response to metformin in type 2 diabetes. *Nature genetics*. 2011;43(2):117-20.
209. Florez JC, Jablonski KA, Taylor A, Mather K, Horton E, White NH, et al. The C allele of ATM rs11212617 does not associate with metformin response in the Diabetes Prevention Program. *Diabetes care*. 2012;35(9):1864-7.
210. Sathananthan A, Dalla Man C, Micheletto F, Zinsmeister AR, Camilleri M, Giesler PD, et al. Common Genetic Variation in GLP1R and Insulin Secretion in Response to Exogenous GLP-1 in Nondiabetic Subjects A pilot study. *Diabetes care*. 2010;33(9):2074-6.
211. M't Hart L, Fritsche A, Nijpels G, van Leeuwen N, Donnelly LA, Dekker JM, et al. The CTRB1/2 locus affects diabetes susceptibility and treatment via the incretin pathway. *Diabetes*. 2013:DB_130227.

Lista de anexos

Anexo 1- SNPs identificados com associação à farmacogenética da DM2

Anexo 2- Terapias utilizadas pelos indivíduos da amostra em estudo no controlo dos níveis de glicémia

Anexo 3- Genótipos referentes aos locais onde se encontram os 16 SNPs

Anexo 1-SNPs identificados com associação à farmacogenética da DM2.

Anexo tabela 1- Estudos associados à farmacogenética das sulfonilureias. Legenda: AUC- *Area under the curve*; HbA1c- Hemoglobina glicosilada; FPG- Glicose plasmática em jejum; Cmax- Concentração máxima; OR- *Odd ratio*; HR- *Hazard ratio*

SNPs associadas à farmacocinética da sulfonilureias				
Gene	Alteração genética e classificação	Amostra população	Impacto do SNP	Ref.
CYP2C9	*2 (c.430C>T (rs1799853) <i>missense</i>) *3 (c.1075A>C (rs1057910) <i>missense</i>)	21 Indivíduos saudáveis (Alemanha)	Os portadores do genótipo *3/*3 têm menor depuração oral total para a glibenclamida (P<0,001) e maior secreção de insulina após 12 horas da ingestão da glibenclamida (P=0,028), comparativamente com o genótipo *1/*1. Em relação ao alelo *2 apenas se verificou uma redução marginal no metabolismo da glibenclamida, comparativamente com o genótipo *1/*1.	(99)
		23 Indivíduos saudáveis (Alemanha)	A média total de depuração para a tolbutamida foi diferente consoante o genótipo que o indivíduo era portador, verificando-se a seguinte ordem decrescente *1/*1-0,97 l/h, *1/*2-0,86 l/h, *2/*2-0,75 l/h, *1/*3-0,56 l/h, *2/*3-0,45 l/h e *3/*3-0,15 l/h.	(101)
		15 Indivíduos saudáveis (14 caucasianos e um hispânico)	Portadores do genótipos *1/*2 e *1/*3 (maior acentuação no genótipo *1/*3) têm maiores AUC _(0, ∞) para a tolbutamida e uma redução estatisticamente significativa na depuração oral e de formação da tolbutamida, comparativamente ao genótipo *1/*1 (P <0,05).	(100)
		29 Indivíduos saudáveis (Finlândia)	Portadores do genótipo *1/*2 não têm alterações significativas na farmacocinética da glimepirida ou glibenclamida, indivíduos heterozigóticos portadores do alelo *3 têm um aumento da AUC ao longo do tempo tanto para a glimepirida (P≤0,05) como para gliburida (P≤0,05) em relação aos portadores do genótipo *1/*1.	(102)
		20 Pacientes diabéticos (Alemanha)	Portadores dos genótipos *3/*3 e *2/*3 têm o risco aumentado de hipoglicemia grave provocados por tratamento de sulfonilureias, em relação aos portadores do genótipo *1/*1 (10% vs <2%, respetivamente: 5,2 OR).	(103)
		172 Indivíduos diabéticos (Rotterdam Study)	Portadores do alelo *3 necessitam de uma dose menor de tolbutamida em relação aos portadores do genótipo *1/*1 (P=0,009).	(121)

Continuação Anexo tabela 1

SNPs associadas à farmacocinética da sulfonilureias				
Gene	Alteração genética e classificação	Amostra população	Impacto do SNP	Ref.
CYP2C9	*2 (c.430C>T (rs1799853) <i>missense</i>) *3 (c.1075A>C (rs1057910) <i>missense</i>)	134 Pacientes diabéticos (Japão)	Pacientes que recebem glimepirida como terapia apresentam menores níveis HbA1c e maiores curvas de concentração plasmáticas para glimepirida ao longo do tempo para o genótipo *1/*3 em comparação com o genótipo selvagem *1/*1 (P<0.05).	(125)
		1073 Pacientes diabéticos (Escócia)	Portadores dos alelos *2 e *3 em duplicado eram 3,4 vezes mais propensos a atingir os objetivos do tratamento (níveis de HbA1c inferior a 7%) em relação aos portadores dos genótipos *1/*1 (p = 0,0009). Isto corresponde a uma redução 0,5% (P=0,003) maior na concentração de HbA1c. Além disso, portadores dos alelos *2 e *3 foram menos propensos a experimentar falha do tratamento com monoterapia de sulfonilurétrias (P = 0,04; 0,79 HR por alelo).	(104)
		18 Indivíduos saudáveis (Chineses)	Portadores do haplótipo *1/*3, comparativamente com os portadores do haplótipo *1/*1 tinham um aumento significativo na AUC _(0, ∞) da glibenclamida (P = 0,008).	(123)
		80 Pacientes diabéticos (Índia)	Portadores diabéticos das variantes genéticas do CYP2C9 responderam melhor ao tratamento com glibenclamida, comparativamente aos que tinham o genótipo normal. Além disso, verificou-se que o genótipo 1/*3 não influenciou significativamente os efeitos adversos de hipoglicémia entre os pacientes tratados com glibenclamida longo prazo.	(147)
		18 Indivíduos saudáveis (Coreia)	Portadores do alelo *3 em heterozigotia tinham maior C _{max} , AUC e tempo de semivida para o fármaco tolbutamida, comparativamente aos portadores homozigóticos do alelo *1.	(124)
		19 Indivíduos saudáveis	Portadores do genótipo *1/*3 têm maior AUC para glimepirida, comparativamente aos homozigóticos para alelo *1 (P <0,05).	(148)
		176 Pacientes diabéticos (Grécia)	Portadores do genótipo *1/*3 tinham um risco aumentado de hipoglicémia em resposta às sulfonilurétrias 1.687 OR (P=0,011).	(149)

Continuação Anexo tabela 1

SNPs associadas à farmacocinética da sulfonilureias				
Gene	Alteração genética e classificação	Amostra população	Impacto do SNP	Ref.
CYP2C9	*2 (c.430C>T (rs1799853) <i>missense</i>) *3 (c.1075A>C (rs1057910) <i>missense</i>)	207 Pacientes diabéticos (Holanda)	Nenhum efeito estatisticamente significativo para os alelos *2 e *3.	(126)
		108 Pacientes diabéticos (Turquia)	Os portadores do alelo *2 e*3 têm um risco ligeiramente maior de hipoglicemia, todavia apenas significativo para os pacientes tratados com gliclazida (P = 0,035).	(122)
		103 Pacientes diabéticos (Branços)	Indivíduos diabéticos portadores dos alelos variantes (*2 e *3) tinham um aumento significativo na ocorrência de episódios de hipoglicemia comparativamente aos portadores do alelo *1 (P=0,014).	(150)
	*12 (c.1465C>T (rs9332239) <i>missense</i>)	92 (Várias etnias)	Alelo T está associado com uma diminuição da atividade catalítica do CYP2C9 para o fármaco tolbutamida. (P=0,05).	(151)
CYP2C19	*2 (c.681G>A (rs4244285) <i>sinônimo</i>) *3 (c.636G>A (rs4986893) <i>nonsense</i>)	24 Indivíduos saudáveis (China)	Portadores dos alelos *2 e *3 têm uma maior AUC 3,4 vezes (P< 0,01) para o fármaco gliclazida em comparação com portadores homocigóticos do alelo *1.	(51)
SNPs associadas à farmacodinâmica da sulfonilureias				
KCNJ11	c.67A>G (rs5219) <i>missense</i>	101 Indivíduos diabéticos (Caucasianos)	Portadores do alelo A (K) apresentam reduções maiores do HbA1c em resposta ao tratamento com gliclazida, em comparação com os portadores do alelo G (E) em homocigotia P = 0,036.	(107)
		525 Indivíduos diabéticos (Caucasianos)	O alelo A (K) é mais frequente em indivíduos com falha secundária para as sulfonilureias, comparativamente com os portadores do alelo G (E) em homocigotia (P=0,04).	(108)
		97 Pacientes diabéticos (Alemanha)	Portadores do aleloA (K) estão associados menores resposta à sulfonilureias e consequentemente maiores níveis de HbA1c em comparação com o alelo G € (P=0,04).	(109)

Continuação Anexo tabela 1

SNPs associadas à farmacocinética da sulfonilureias				
Gene	Alteração genética e classificação	Amostra população	Impacto do SNP	Ref.
KCNJ11	c.67A>G (rs5219) <i>missense</i>	46 Pacientes diabéticos (Coreia)	Perfis farmacodinâmicos de glicose e insulina plasmática não apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre os grupos de genótipos.	(152)
		364 Pacientes diabéticos (UKPDS)	Nenhuma associação significativa com a diabetes para esta variante genética foi observada.	(153)
ABCC8	c.3819G>A (rs1799859) <i>sinônimo</i>	228 Pacientes diabéticos	Portadores do genótipo tipo selvagem GG tinham HbA1c mais elevados em comparação com os genótipos AA, isto em indivíduos sujeitos ao tratamento de sulfonilureias (P<0,001).	(97)
		1268 Pacientes diabéticos (China)	Portadores desta variante genética têm reduções maiores do FPG (P=0,002) quando tratados com gliclazida em comparação com indivíduos não portadores.	(154)
	c.2117-3C>T (rs1799854) <i>Splice region</i>	228 Pacientes diabéticos (Caucasianos)	Portadores do genótipo tipo selvagem CC tinham HbA1c significativamente menores em comparação com TT (P=0,009).	(97)
		70 Pacientes diabéticos (França)	Portadores do alelo C tem 35% menos concentrações de triglicéridos em jejum do que os homozigotos TT (P=0,026).	(155)
		211 Pacientes diabéticos (Alemanha)	Não foi encontrado uma associação significativa à hipoglicemia.	(156)
		68 Pacientes diabéticos	Não foi encontrado nenhum efeito significativo nas frequências alélicas ou na distribuição genotípica para a variante genética.	(157)
		380 Indivíduos saudáveis (Caucasianos)	Dez portadores do genótipo combinado c.2277C>T / c.2117-3C>T tinham as seguintes respostas da insulina (19-22 min, 124 ± 27 vs 231 ± 10 min pmol/L, P = 0,045; 19-30 min, 1154 ± 238 vs 1838 ± 72 min pmol/L, P = 0,077) após injeção tolbutamida	(98)

Continuação Anexo tabela 1

SNPs associadas à farmacodinâmica da sulfonilureias				
Gene	Alteração genética e classificação	Amostra população	Impacto do SNP	Ref.
ABCC8	c.4105G>T (rs757110) <i>missense</i>	1268: Pacientes diabéticos (China)	Portadores do genótipo GG (Ala/Ala) tinham maiores reduções no HbA1c (P=0,06) e menores FPG (P<0,001), após a terapia com gliclazida.	(154)
		115 Pacientes diabéticos (China)	Os portadores do alelo G foram mais sensíveis à gliclazida e experimentaram maiores reduções no HbA1c em comparação com indivíduos portadores do genótipo TT (TT - 0,76% ±1,70%; TG+GG -1,60% ±1,39%, P = 0,044).	(158)
		157 Pacientes diabéticos (Japão)	Não foi encontrado para esta variante genética uma associação significativa à hipoglicemia.	(159)
KCNJ11/ ABCC8	Haplótipo (c.67A>G (rs5219) / c.4105G>T (rs757110)) ambas <i>missense</i> Nome comum (K23/A1369)	Patch-clamp technique	Os portadores deste haplótipo demonstraram ter menos sensibilidade na inibição do canal KATP para os fármacos tolbutamida, clorpropamida e glibeipirida (LC50-K23/A1369 vs E23/S1369 = 1,15 vs 0,71 mmol/l; 4,19 vs 3,04 mmol/l; 4,38 vs 2,41 nmol/l, respectivamente).	(132)
		Cultura de células tsA201	Portadores do haplótipo K23/A1369 têm um aumento da sensibilidade para gliclazida no local-A do canal KATP (LC50= 52.7 nmol/l variante K23/A1369 vs. 188.7 nmol/l variante E23/S1369).	(133)
IRS1	c.2911G>A (rs1801278) <i>missense</i>	477 indivíduos diabéticos (Caucasianos)	Portadores desta variante genética têm associado um maior risco de falha secundária para as sulfonilureias, em comparação com indivíduos não portadores 2,1 OR (P=0,01).	(105)
		281 Indivíduos diabéticos (Caucasianos)	Portadores da variante genética A que expressa Arg tratados com drogas insulínótropas têm maiores níveis de HbA1c em comparação com portadores homocigóticos do alelo G que expressa Gly (P=0,005).	(106)
KCNQ1	c.1795-21928T>G intrônica	87 Pacientes diabéticos (Eslováquia)	Portadores do alelo T (TT + TG) atingiram níveis significativamente mais baixos de FPG em comparação com portadores do genótipo GG (P=0,033), para o tratamento com sulfonilureias e metformina.	(160)

Continuação Anexo tabela 1

SNPs associadas à farmacodinâmica da sulfonilureias				
Gene	Alteração genética e classificação	Amostra população	Impacto do SNP	Ref.
CDKAL1	c.371+30101 A>G (rs7756992) intrônica	101 Pacientes diabéticos (Eslováquia)	Portadores do alelo G (AG + GG) atingiram níveis significativamente mais baixos FPG em comparação com portadores do genótipo AA (P= 0,013).	(55)
TCF7L2	c.552+9017 G>T (rs12255372) intrônica	901 Pacientes diabéticos- (GoDARTS study)	Portadores do alelo de risco eram menos propensos a responder às sulfonilureias 1,95 OR (P=0,005) em comparação com indivíduos não portadores.	(161)
		901 Pacientes diabéticos (GoDARTS study)	Portadores do alelo de risco eram menos propensos a responder às sulfonilureias, comparativamente aos indivíduos não portadores 1,73 OR (P=0,015).	(161)
	c.450+33966 C>T (rs7903146) intrônica	189 Pacientes diabéticos (Alemanha)	O alelo T aparece com maior frequência em indivíduos que não respondiam às sulfonilureias 1,57 OR (P=0,046).	(162)
		87 Pacientes diabéticos (Eslováquia)s	Maiores reduções do HbA1c e do FPG em pacientes tratados com sulfonilureias para o genótipo CC em comparação com o genótipo CT + TT (P=0,031).	(160)
ABCA1	c.688C>T (rs9282541) <i>missense</i>	85 Pacientes diabéticos (México)	Portadores do alelo T necessitam de uma menor dose de glibenclamida, em comparação com indivíduos CC (P<0,001).	(163)
NOS1AP	c.106- 38510G>T (rs10494366) intrônica	619 Pacientes diabéticos (Rotterdam Study)	Portadores do genótipo TG ou GG têm uma menor redução dos níveis de glicose e uma maior taxa de mortalidade quando tratados com glibenclamida 2,80 HR, todavia quando tratados com tolbutamida 0,30 HR e glimepirida 0,18 HR apresentam menores taxas de mortalidade, isto tudo em comparação com genótipo TT.	(164)
		46 indivíduos saudáveis (Coreia)	Este SNP não demonstrou efeito significativo na farmacodinâmica da glimepirida.	(152)

Anexo tabela 2- Estudos associados à farmacogenética das meglitinidas. Legenda: AUC- *Area under the curve*; HbA1c- Hemoglobina glicosilada; FPG- Glicose plasmática em jejum; PPG- Glicose pós-prandial; FINS- *Fasting serum insulin*; PINS- *Postprandial serum insulin*; Homa- Modelo de avaliação da homeostase; LDL- Lipoproteína de baixa densidade.

SNPs associadas à farmacocinética da meglitinidas				
Gene	Alteração genética e classificação	Amostra população	Impacto do SNP	Ref.
CYP2C9	*3 (c.1075A>C (rs1057910) <i>missense</i>)	26 Indivíduos saudáveis (Alemanha)	Portadores do alelo *3 tinham menores depurações orais para a nateglinida, em comparação com os portadores do alelo *1 em homozigotia (P<0,01). Além disso, os portadores dos genótipos *3/*3 têm ligeiramente um maior risco de hipoglicemia em relação a indivíduos portadores do genótipo *1/*1.	(112)
CYP2C8	*3(c.986A>G (rs10509681) <i>missense</i>) e (c.206G>A (rs11572080) <i>missense</i>)	28 Indivíduos saudáveis (Finlândia)	Portadores do alelo *3 têm AUC reduzidas para a repaglinida em relação aos portadores do genótipo *1/*1 (P<0,005).	(110)
		56 Indivíduos saudáveis (Finlândia)	Portadores do genótipo *1/*3 tem AUC e Cmax inferiores para a repaglinida, comparativamente aos portadores do genótipo *1/*1 (P <0,05).	(111)
		36 Indivíduos saudáveis (Dinamarca)	Não apresentaram resultados com significância estatística associados à farmacogenética da repaglinida.	(128)
		28 Indivíduos saudáveis (Alemanha)	Nenhum efeito sobre farmacocinética ou na redução da glicemia.	(165)
CYP3A4	*18(c.875T>C (rs28371759)) <i>missense</i>	121 Indivíduos saudáveis (Malásia)	Portadores do genótipo *1/*18 tinham menores velocidades de metabolização (P= 0,04) e maiores tempos de semivida (P= 0,04) para a repaglinida em comparação com genótipo *1*1.	(50)
SLCO1B1	c.521T>C (rs4149056) <i>missense</i>	17 Indivíduos saudáveis (China)	Portadores dos genótipos CC e TC têm maior AUC (P=0,001) e Cmax (P=0,002) do que no genótipo TT para o fármaco nateglinida.	(135)
		20 Indivíduos saudáveis (Finlândia)	Portadores do genótipo CC apresentam maior AUC _(0,∞) para a repaglinida (P≤0,001) em comparação com os genótipos CT+TT, além de um maior efeito na redução da glicose após a administração repaglinida.	(113)

Continuação Anexo tabela 2

SNPs associadas à farmacocinética da meglitinidas				
Gene	Alteração genética e classificação	Amostra população	Impacto do SNP	Ref.
SLCO1B1	c.521T>C (rs4149056) <i>missense</i>	32 Indivíduos saudáveis (Branços)	O alelo C não está associado à farmacocinética da nateglinida comparativamente ao genótipo TT. Todavia os portadores do genótipo CC para o fármaco repaglinida tiveram 59% (P=0,001) ou 72% (P <0,001) maior AUC _(0, ∞) do que os participantes com os genótipos c.521TC ou c.521TT, respetivamente.	(136)
		56 Indivíduos saudáveis (Finlândia)	Portadores do genótipo CC têm a AUC _(0, ∞) maior para o fármaco repaglinida, 107% mais em relação a TC e 188% em relação a TT (P <0,0001).	(111)
	*1B(c.388A>G (rs2306283)) <i>missense</i>	24 Indivíduos saudáveis (Branços)	Portadores do genótipo *1B*1B (GG) está associada com a diminuição da AUC (P = 0,007) e o Cmax (P = 0,056) quando expostos a repaglinida em indivíduos saudáveis, comparativamente com o genótipo 1A/*1A.	(114)
		22 Indivíduos saudáveis (China)	Portadores do genótipo SLCO1B1*1B/*1B têm uma exposição farmacocinética reduzida após o tratamento com repaglinida, que inclui uma diminuição na AUC _(0, ∞) e maiores depuração de repaglinida, comparativamente aos portadores dos genótipos 1A/*1B ou *1A/*1A (P = 0,028 e P=0,015, respetivamente) e*15 /*1A ou *5/*1A (P=0.032 e P=0,019, respetivamente).	(138)
CYP2C9/SLCO1B1	Haplótipo (*3 (c.1075A>C (rs1057910)) e c.521T>C (rs4149056)) ambos <i>missense</i>	35 Indivíduos saudáveis (China)	Considerando apenas a variante alélica rs4149056, verificou-se que não tinha associação significativa com a farmacocinética da nateglinida. Analisando as combinações CYP2C9*1/*3 & e o genótipo TT (rs4149056), CYP2C9*1/*1 & TC/CC (rs4149056) e CYP2C9*1/*3 & TC (rs4149056), verificou-se respetivamente uma AUC _(0, ∞) 56%, 34% e 56 % mais elevada (P= 0,002, P=0,041 e P=0,013, respetivamente) do que no grupo de referencia.	(127)
ABCB1 (MDR1)	c.2677T>A ou c.2677T>G (rs2032582) <i>missense</i>	24 Indivíduos saudáveis (China)	Os portadores dos genótipos GT e TT estão mais expostos a maiores AUCs para a repaglinida do que aqueles com o genótipo GG e TA (P=0,007).	(53)

Continuação Anexo tabela 2

SNPs associadas à farmacodinâmica da meglitinidas				
Gene	Alteração genética e classificação	Amostra população	Impacto do SNP	Ref.
ABCC8	c.2117-3C>T (rs1799854) <i>Splice region</i>	100 pacientes diabéticos (China)	Alterações nos níveis de insulina de jejum e o Homa-IR foram significativamente maiores em pacientes com ABCC8 exon16-3 CC vs. os genótipos TC e TT (P = 0,0372 e 0,0274, respetivamente).	(166)
KCNJ11	c.67A>G (rs5219) <i>missense</i>	100 Pacientes diabéticos (China)	Os portadores do alelo A (K) apresentam melhores respostas à repaglinida em relação ao alelo E, existindo uma diferença significativa na taxa de resposta para a repaglinida entre o alelo G (E) e A (K) (68% vs 82% - P = 0,0324, respetivamente).	(166)
		40 Pacientes diabéticos (China)	Portadores dos genótipos CT ou TT apresentam níveis maiores de FPG, PPG e HbA1c após o tratamento de repaglinida (P <0,05).	(131)
NOS1AP	c.106-38510G>T (rs10494366) intrónica	100 Pacientes diabéticos (China)	Após o tratamento com repaglinida os valores do Δ Homa-IR (P=0,011) e Δ a insulina em jejum (P=0,019) forma significativamente diferentes. Portadores do genótipo TT tinham menor resistência à insulina após o tratamento. O modelo misto mostrou que a variante teve um efeito de interação com o tratamento repaglinida apenas no HOMA-IR (P= 0,013).	(167)
	c.178-32548A>C (rs12742393) intrónica	300 Pacientes diabéticos e 200 Indivíduos saudáveis (China)	Os efeitos do tratamento com repaglinida no FPG (P<0,01), FINS (P<0,05) e Homa-IR (p <0,001) em portadores diabéticos com o alelo C foram reduzidos em comparação com os portadores diabéticos do genótipo AA.	(168)
UCP2	c.-1245G>A (rs659366) <i>Upstream gene variant</i>	370 Pacientes diabéticos e 166: Indivíduos saudáveis- (China)	Após o tratamento repaglinida verificou-se que os portadores do alelo A tinham uma menor redução no FPG (P <0,05) e HbA1c (P <0,05) e um ligeiro aumento da insulina plasmática (P <0,01) em comparação com os genótipos GG.	(169)
NeuroD1/ Beta 2	c.133G>A (rs1801262) <i>missense</i>	306 Pacientes diabéticos e 132: Indivíduos saudáveis- (China)	Portadores dos alelos A têm uma resposta atenuada após o tratamento de repaglinida para o FPG (P<0,01) e PPG (P<0,01).	(170)

Continuação Anexo tabela 2

SNPs associadas à farmacodinâmica da meglitinidas				
Gene	Alteração genética e classificação	Amostra população	Impacto do SNP	Ref.
SLC30A8	c.826C>T (rs13266634) <i>missense</i> c.827G>A (rs16889462) <i>missense</i>	48 Pacientes diabéticos (China)	Pacientes com o genótipo CT+TT para o SNP rs13266634 apresentam uma melhor resposta de FINS (P <0,05) e PINS (P<0,01) em comparação com portadores do genótipo CC, enquanto os pacientes com o genótipo GA para o SNP rs16888462 têm uma melhoria na eficácia da repaglinida, no FPG (P <0,01), PPG (P <0,01), e HbA1c (P <0,05) em comparação com indivíduos com genótipo GG.	(171)
	c.826C>T (rs13266634) <i>missense</i>	209 Pacientes diabéticos (China)	Nenhuma diferença significativa foi detetada nos três subgrupos (CC, CT e TT) em relação com parâmetros clínicos como HbA1c, FPG, HOMA-B, HOMA-IR ou secreção de insulina aguda em relação entre a variante genética SLC30A8 e as características clínicas do grupo repaglinida.	(172)
IGF2BP2	c.239+11861 T>G (rs1470579) intrónica c.239+29254 C>A (rs4402960) intrónica	350 Pacientes diabéticos (China)	Portadores dos genótipos TG+GG para a variante genética (rs1470579) têm um menor efeito da repaglinida no FPG (P <0,05) e PPG (P <0,05) em comparação com portadores do genótipo TT. Os pacientes com os genótipos CA+AA para a variante genética SNP rs4402960 apresentam um efeito melhorado da repaglinida em relação ao PINS (P <0,01) em comparação com portadores do genótipo CC.	(77)
TCF7L2	c.876-1026C>T (rs290487) intrónica	40 Pacientes diabéticos (China)	Portadores do genótipo TT para a variante genética rs290487 mostram uma maior eficácia da repaglinida em relação ao FINS, triglicéridos, e LDL, em comparação com os portadores do genótipo CC+CT (P <0,05).	(131)
NAMPT	g.105928515 C>T (rs11977021) <i>Upstream gene variant</i>	35 Pacientes diabéticos (China)	Portadores do genótipo CT tinham PINS mais elevados quando comparados com os genótipos CC e TT (P <0,05).	(173)
PAX4	c.361C>T (rs114202595) <i>missense</i>	306 Pacientes diabéticos 132 Indivíduos saudáveis (China)	Portadores do alelo C (R) tinham PINS mais elevados em comparação ao alelo T (W) após o tratamento da repaglinida (P <0,05). Pacientes com o genótipo RR mostram melhor eficácia no PPG do que os com genótipo RW após o tratamento de repaglinida (P <0,05).	(170)

Continuação Anexo tabela 2

SNPs associadas à farmacodinâmica da meglitinidas				
Gene	Alteração genética e classificação	Amostra população	Impacto do SNP	Ref.
KCNQ1	c.1795-29246C>T (rs2237892) intrónica c.1795-11803A>C (rs2237895) intrónica	40 Pacientes diabéticos (China)	Após o tratamento de repaglinida, portadores dos alelos T (rs2237892) e C (rs2237895) foram mais propensos a uma resposta positiva para a repaglinida em termos de PPG (P <0,05), comparativamente com os genótipos tipo selvagem CC e AA, respetivamente.	(174)
		209 Pacientes diabéticos (China)	Pacientes diabéticos portadores do alelo T (rs2237892) em homozigotia exibiam níveis de 2-h glicose menores para o tratamento com repaglinida do que os portadores do alelo C, enquanto os que os portadores dos alelos C (rs2237892) e C (rs2237895) têm associados maiores FINS (P=0,0166 e 0,0274, respetivamente) e HOMA-IR (=0,0026 e 0,0259, respetivamente).	(62)

Anexo tabela 3- Estudos associados à farmacogenética das tiazolidinedionas. Legenda: AUC- *Area under the curve*; Cmax- Concentração máxima; HbA1c-Hemoglobina glicosilada; FPG- Glicose plasmática em jejum; PPG- Glicose pós-prandial; FINS-*Fasting serum insulin*; PINS- *Postprandial serum insulin*; Homa- Modelo de avaliação da homeostase; LDL-c- Lipoproteína de baixa densidade- colesterol; IMC- Índice de massa corporal; OR- *Odd ratio*.

SNPs associadas à farmacocinética da tiazolidinedionas				
Gene	Alteração genética e classificação	Amostra população	Impacto do SNP	Ref.
CYP2C8	*3(c.986A>G (rs10509681) <i>missense</i>) e (c.206G>A (rs11572080) <i>missense</i>))	31 Indivíduos saudáveis (Caucasianos)	As médias totais de depuração para a rosiglitazona para os seguintes genótipos *1/*1, *1/*3 e *3/*3 foram respectivamente 0,033 L/h Kg, 0,038 L/h Kg e 0,046 L/h Kg (P=0,02) após um dia e 0,037 L/h Kg, 0,046 L/h Kg e 0,055 L/h Kg após 14 dias P=0,01. A depuração total para a rosiglitazona foi significativamente menor após 14 dias comparativamente com a do dia 1.	(115)
		16 Indivíduos saudáveis (Finlândia)	Portadores do genótipo *3/*3 tinham menores AUC para pioglitazona comparado com os portadores do genótipo *1*1 (P <0,05).	(129)
		31 Indivíduos saudáveis (Caucasianos)	A análise de covariância apurou que o alelo *3 têm um efeito significativo sobre o pioglitazona <i>central compartment clearance</i> (CL/F, p=0,0005) e a <i>intercompartmental clearance</i> (Q/F, P=0,004). A CL/F e Q/F para a pioglitazona foram maiores 52% e 286%, nos portadores do alelo *3, comparativamente aos homocigóticos *1.	(117)
		30 Indivíduos saudáveis (Branco)	O genótipo *1A/*1A está associado com o aumento da AUC _(0,∞) e da depuração, em indivíduos saudáveis expostos a pioglitazona, comparativamente com os genótipos *1A/*3 + *3/*3 (P=0,01 e P=0,002, respectivamente).	(116)
		8 Indivíduos saudáveis (Americanos)	Tendência para um menor AUC para a rosiglitazona em portadores do alelo*3, todavia as diferenças não foram significativas.	(130)
		23 Indivíduos saudáveis (Caucasianos)	A importância da variante genética *3 no metabolismo in vivo da rosiglitazona não pôde ser confirmada.	(175)
		26 Indivíduos saudáveis (Caucasianos)	Portadores do genótipo *1/*3 têm uma AUC significativamente menor e uma depuração oral maior para a rosiglitazona.	(176)

Continuação Anexo tabela 3

SNPs associadas à farmacocinética da tiazolidinedionas				
Gene	Alteração genética e classificação	Amostra população	Impacto do SNP	Ref.
CYP2C8	*11(c.610G>T) (rs78637571) <i>nonsense</i>	17 Indivíduos saudáveis (Coreia)	Os portadores do genótipo *1/*11 têm 54% maior AUC e 34% maior Cmax, para o fármaco rosiglitazona em relação ao genótipo *1/*1 (P=0,015 e P=0,025, respetivamente).	(177)
	*2(c.595A>T) (rs11572103) <i>missense</i>	21 Indivíduos saudáveis (afro-americanos)	Os genótipos *1A/*2 e *2/*2 estão associados com decréscimos nos rácios M-III: pioglitazona AUC ₍₀₋₄₈₎ e M-III: M-IV AUC ₍₀₋₄₈₎ em voluntários afro-americanos saudáveis, quando são expostos a pioglitazona, comparativamente com o CYP2C8 *1A/*1A (P=0,006).	(178)
SNPs associadas à farmacodinâmica da tiazolidinedionas				
PPAR γ	c.34C>G (rs1801282) <i>missense</i>	198 Pacientes diabéticos (Coreia)	Menores FPG e HbA1c em indivíduos com o alelo G (P=0,026 e P=0,015, respetivamente), após o tratamento com rosiglitazona. Além disso, houve diferenças significativas na taxa de resposta ao tratamento com rosiglitazona entre o grupo CC e o grupo CG (P=0,002).	(143)
		250 Pacientes diabéticos (China)	Portadores do alelo G (CG e GG)) têm um maior decréscimo do FPG (P<0,001) e do HbA1c (P=0,004) quando tratados com pioglitazona, comparativamente aos portadores do genótipo CC.	(142)
		30 Mulheres obesas em menopausa	Após o tratamento com pioglitazona, os níveis de glicose diminuiu em ambos os genótipos (CC e CG), mas em uma quantidade maior em portadores do genótipo CG (P <0,003). No entanto os níveis de insulina e de Homa-IR foram menores nos portadores do genótipo CC do que no CG (P = 0,03).	(179)
		131 Pacientes diabéticos (Alemanha)	A variante CG não afeta a eficácia da terapia de pioglitazona, sugerindo assim, que a resposta ao fármaco/tratamento é independente dos efeitos da farmacogenética entre o PPAR- γ e o seu ligando de pioglitazona.	(141)

Continuação Anexo tabela 3

SNPs associadas à farmacodinâmica da tiazolidinedionas				
Gene	Alteração genética e classificação	Amostra população	Impacto do SNP	Ref.
PGC-1 α (PPARGC1A)	c.1182A>G (rs2970847) sinónimo c.1444G>A (rs8192678) <i>missense</i>	41 Pacientes diabéticos (China)	Após o tratamento com rosiglitazona, os portadores de um alelo A (rs2970847) mostraram uma tendência de piora para GG (P <0,05), já os portadores do alelo A (rs8192678) mostraram uma resposta significativamente terapêutica à rosiglitazona para GG (P <0,05).	(69)
Resistina	c.-216C>G (rs1862513) <i>Upstream gene variant</i>	121 Pacientes diabéticos (Japão)	O genótipo GG foi um fator independente para redução do FPG (P=0,020) e HOMA-IR (P=0,012) para o tratamento com pioglitazona.	(180)
Leptina	g.2453G>A (rs7799039) <i>Upstream gene variant</i>	42 Pacientes diabéticos (China)	Portadores do alelo G apresentaram IMC, concentração de leptina e FPG maior, comparativamente ao genótipo AA (P<0,05). Além disso verificou-se um efeito realçado para a rosiglitazona nos pacientes com genótipo AA em relação ao FINS e PINS, comparativamente com os genótipos GG+GA (P <0,05).	(181)
ABCA1	c.656G>A (rs2230806) <i>missense</i> c.2649A>G (rs4149313) <i>missense</i> c.4760A>G (rs2230808) <i>missense</i>	93 Pacientes diabéticos (China)	Portadores da variante (rs2230806) têm associado um 2,04 OR por alelo para o fracasso do tratamento com rosiglitazona (P <0,05). Os portadores do genótipo GG (rs2230806) têm uma melhoria nos indicadores de sensibilidade da insulina, determinado por uma redução significativamente maior no Homa-IR (P <0,05). Nenhuma associação fenótipo-genótipo foi detetada para os SNPs c.2649A>G e c.4760A>G.	(56)
SLCO1B1	c.521T>C (rs4149056) <i>missense</i>	16 Indivíduos saudáveis (Branco)	A variante genética não teve nenhum efeito estatístico significativo em qualquer das variáveis farmacocinéticas para a rosiglitazona, pioglitazona ou os seus metabolitos	(137)
SLC30A8	c.826C>T (rs13266634) <i>missense</i>	209 Pacientes diabéticos (China)	Portadores do genótipo CC e TC tem um maior aumento para Δ HOMA-B em comparação com os portadores de TT (P = 0,0149), além disso os portadores dos genótipo CC e TT têm menores Δ nos níveis de pró-insulina em jejum em comparação com os portadores de TT (P=0,0246), após o tratamento com rosiglitazona.	(172)

Continuação Anexo tabela 3

SNPs associadas à farmacodinâmica da tiazolidinedionas				
Gene	Alteração genética e classificação	Amostra população	Impacto do SNP	Ref.
ADRB3	c.190T>C (rs4994) <i>missense</i>	273 Pacientes diabéticos e 166: Indivíduos saudáveis (China)	Após o tratamento com rosiglitazona, portadores do genótipo TC tinham maiores atenuações séricas dos triglicerídeos (P <0,05) e do LDL-colesterol (P <0,01), bem como um ligeiro melhoramento na adiponectina (P <0,05), comparativamente aos portadores do genótipo TT.	(67)
TNF- α	c.-488G>A (rs1800629) <i>Upstream gene variant</i>	42 Pacientes diabéticos (China)	Efeito atenuado da rosiglitazona no FINS em pacientes com o genótipo GA+AA, comparativamente com o genótipo GG (P <0,05).	(181)
RBP4	c.-679G>A (rs3758539) <i>intrônica</i>	472 Pacientes diabéticos 198: Indivíduos saudáveis (China)	Após o tratamento com rosiglitazona, pacientes com genótipo GG tiveram um aumento no valor Δ FPG (P<0,05) e FINS (P<0,01) em relação aos genótipos GA+AA, respetivamente.	(182)
	c.-55T>G (rs10882283) <i>5'UTR</i>	472 Pacientes diabéticos 198: Indivíduos saudáveis (China)	Após o tratamento com rosiglitazona, pacientes com genótipo TG+GG tinham valores elevados Δ HbA1c em comparação com genótipo TT (P<0,05).	(182)
UCP2	c.-1245G>A (rs659366) <i>intrônica</i>	273 Pacientes diabéticos 166: Indivíduos saudáveis (China)	Após o tratamento com rosiglitazona, portadores do alelo A tinham uma menor atenuação no PINS (P <0,01) e uma maior atenuada no HbA1c (P <0,05) em comparação com genótipo GG.	(67)
LPIN1	c.-143+3791 C>G (rs10192566) <i>intrônica</i>	262 Pacientes diabéticos (Coreia)	Portadores do alelo G estavam associados com maiores diminuições no FPG, 2-h PPG e HbA1c para a rosiglitazona, comparativamente aos não portadores (P=0,005, P=0,005 e P=0,014, respetivamente). Além disso, verificou-se uma associação destes SNP com a resposta rosiglitazona 2,21 OR, (P=0,013).	(68)
KCNQ1	c.1795-10451C>T (rs2237897) <i>intrônica</i>	209 Pacientes diabéticos (China)	Em contraste, apenas uma associação entre variante genética e a diminuição dos níveis de 2-h glicose foi detetada no coorte da rosiglitazona (P = 0,0321).	(62)

Continuação Anexo tabela 3

SNPs associadas à farmacodinâmica da tiazolidinedionas				
Gene	Alteração genética e classificação	Amostra população	Impacto do SNP	Ref.
ADIPOQ	c.45T>G (rs2241766) sinónimo c.-1124C>G (rs266729) <i>Upstream gene variant</i>	42 Pacientes diabéticos (China)	Efeito atenuado da rosiglitazona nos portadores do alelo G (rs266729) para o FPG, PPG, HOMA-IR comparativamente aos portadores do alelo C em homozigotia. Verificou-se também um efeito reforçado da rosiglitazona na concentração sérica de adiponectina em portadores do genótipo CC (rs266729) e dos genótipos TG+GG (rs2241766), quando comparados respetivamente com CG+GG (P = 0,000) e TT (P = 0,018). Além disso, os portadores do diplotido CGTT constituídos por estes dois SNPs têm um aumento no FPG (P = 0,001) e PPG (P = 0,003) após o tratamento com rosiglitazona.	(183)
	c.45T>G (rs2241766) sinónimo c.214+62G>T (rs1501299) intrónica	166 Pacientes diabéticos (China)	Portadores do genótipo GG do c.45T>G tiveram uma menor redução no FPG e do HbA1c, comparativamente a outros genótipos TT+TG (P=0,031 e 0,013, respetivamente). Para o c.214+62G>T verificou-se que os portadores do genótipo GG tinham menores reduções no FPG, comparativamente ao genótipos GT+GG (P=0,001). Em relação aos haplótipos formados por estes dois SNPs (c.45T>G - c.214+62G>T) verificou-se menores reduções nos portadores homozigóticos GG do haplótipo, para o FPG e HbA1c em comparação com os outros haplótipos (P=0,001 e 0,001, respetivamente).	(184)
	c.-60+244G>A (rs182052) intrónica c.-1124C>G (rs266729) <i>Upstream gene variant</i>	113 Pacientes diabéticos (China)	Após o tratamento com pioglitazona verificou-se uma diminuição significativa nos valores de HbA1c no alelo G (P<0,05) do SNP rs182052 e no alelo G do SNP rs266729 (P=0,028).	(185)
LPL	c.1421C>G (rs328) <i>missense</i>	113 Pacientes diabéticos (China)	Após o tratamento com pioglitazona, os níveis de triglicéridos séricos e LDL-C foram significativamente menores e os níveis de HDL-C foram significativamente maiores em pacientes com o genótipo CC (P <0,05), comparativamente com os portadores do alelo G.	(71)

Continuação Anexo tabela 3

SNPs associadas à farmacodinâmica da tiazolidinedionas				
Gene	Alteração genética e classificação	Amostra população	Impacto do SNP	Ref.
PPAR γ / PTPRD	c.34C>G (rs1801282) <i>missense</i> c.-104+139579 G>A (rs17584499) intrónica	197 Pacientes diabéticos 212 indivíduos saudáveis (China)	Após o tratamento com pioglitazona, portadores do genótipo CG rs1801282 mostraram significativamente valores diferenciais mais elevados de PPG e triglicérideos em comparação com os portadores do genótipo CC rs1801282 (P <0,05 e P <0,05, respetivamente). Portadores do genótipo GA+AA do SNP rs17584499 apresentaram valores significativamente menores no valor diferencial de PPG quando comparados com os indivíduos portadores do genótipo GG, após tratamento da pioglitazona (P <0,01).	(186)

Anexo tabela 4- Estudos associados à farmacogenética das biguanidas. Legenda: AUC- *Area under the curve*; Cmax- Concentração máxima; HbA1c- Hemoglobina glicosilada; FPG- Glicose plasmática em jejum; OR- *Odd ratio*; HR- *Hazard ratio*

SNPs associadas à farmacocinética da biguanidas				
Gene	Alteração genética e classificação	Amostra população	Impacto do SNP	Ref.
SLC22A1 (OCT1)	c.181C>T (rs12208357) <i>missense</i> c.1201G>A (rs34130495) <i>missense</i> c.1260_1262delGAT (rs72552763) <i>deleção</i> c.1393G>A (rs34059508) <i>missense</i> c.156T>C (rs1867351) <i>sinónimo</i>	103 Indivíduos saudáveis do sexo masculino (Caucasianos)	Portadores dos SNPs de baixa atividade (c.181C>T, c.1201G>A, c.1260_1262delGAT e c.1393G>A) tinham aumentos significativos na depuração renal, contudo os níveis de depuração renal variavam consoante não tivessem nenhum SNP, tivesse 1 ou 2 destes SNPs, sendo que se verificou uma maior depuração renal consoante o maior número destes SNPs que o individuo seja portador (P=0,038).	(118)
		20 Indivíduos saudáveis- (SOPHIE study) <i>In vitro</i>	Portadores destas variantes genéticas têm maior AUC (P=0,01) e Cmax (P=0,004 para a metformina, além de um menor volume oral de distribuição (P=0,022) e um nível de depuração oral (P=0,005) para o tratamento com o fármaco metformina. Num estudo precedente <i>in vitro</i> os portadores destes SNPs mostram uma diminuição na função da linhas celulares se transfectarem com os SNPs.	(139, 187)
	c.1222A>G (rs628031) <i>missense</i>	103 Indivíduos saudáveis (Caucasianos) <i>In vitro</i>	Não tem efeito na depuração renal.	(118)
	c.922-158G>A (rs2289669) <i>intrónica</i>	103 Indivíduos saudáveis (Caucasianos) <i>In vitro</i>	Não tem efeito na depuração renal.	(118)
		48 Pacientes diabéticos (Japão)	Não tem efeito na depuração renal.	(188)
c.1022C>T (rs2282143) <i>missense</i>	96 Indivíduos saudáveis (Ásia)	O genótipo CC está associada com aumento da depuração da metformina em indivíduos saudáveis, comparativamente com os genótipos CT+TT. Os indivíduos saudáveis com o genótipo CC têm uma diminuição na AUC _(0, ∞) da metformina, em comparação com aqueles com o genótipo CT ou TT (P= 0.047).	(189)	

Continuação Anexo tabela 4

SNPs associadas à farmacocinética da biguanidas				
Gene	Alteração genética e classificação	Amostra população	Impacto do SNP	Ref.
SLC22A2 (OCT2)	c.596C>T (rs201919874) <i>missense</i> c.602C>T (rs145450955) <i>missense</i> c.808T>G (rs316019) <i>missense</i>	26 Indivíduos saudáveis (Coreia)	Portadores dos genótipos TG e TT para o SNP rs316019 mostraram maior C _{max} (P=0,0005), AUC (P=0,0003) e uma menor depuração renal (P=0,0018) para a metformina em comparação com genótipo GG. Indivíduos com o genótipo CT para os SNPs rs201919874 e rs145450955 tinham perfis semelhantes aos portadores do genótipo TT do SNP rs316019.	(190)
	c.808T>G (rs316019) <i>missense</i>	15 Indivíduos saudáveis (China)	A depuração renal tubular da metformina decrece consoante o genótipo apresentado para o SNP, da seguinte forma GG, TG e por fim TT (P = 0,037).	(191)
		23 Indivíduos saudáveis (Várias etnias)	Portadores da variante TG têm um aumento na depuração renal para a metformina, comparativamente ao genótipo GG (P <0,005).	(192)
		103 Indivíduos saudáveis (Caucasianos)	A variante genética não tem efeito na depuração renal da metformina.	(118)
		96 Indivíduos saudáveis (Ásia)	Portadores do genótipo GG estão associados com o aumento da depuração da metformina em indivíduos saudáveis, em comparação ao genótipo TG. Os indivíduos saudáveis com o genótipo CC têm uma diminuição na AUC (0, ∞) (P=0,007), no C _{max} (P=0,012), e um aumento na depuração (CL/F) da metformina (P=0,005), em comparação com aqueles com o genótipo TG.	(189)
	c.808T>G (rs316019) <i>missense</i> c.-66T>C (rs2252281) 5'UTR	50 (Caucasianos)	Quando analisado isoladamente, o c.808 (G> T) não afeta nem a depuração renal nem a depuração secretora da metformina. No entanto, a depuração renal e a depuração secretora foram aumentadas para os voluntários com alelos menores em c.808 (G> T), que também eram homocigotos para a variante de referência c.-66T> C, na depuração renal e na depuração secretora o aumento seguiu a seguinte ordem de genótipos GG, TG e TT (P = 0,004 e P = 0,005, respetivamente).	(193)

Continuação Anexo tabela 4

SNPs associadas à farmacocinética da biguanidas				
Gene	Alteração genética e classificação	Amostra população	Impacto do SNP	Ref.
SLC47A1 (MATE1)	c.476C>T (rs35646404) <i>nonsense</i> c.1012G>A (rs35790011) <i>missense</i>	<i>In vitro</i>	Portadores desta variante têm uma redução na atividade de transporte da metformina.	(194)
SLC47A2 (MATE2)	Haplótipo1- c.-130C>T (rs12943590) 5'UTR Haplótipo2- g.92412150 C>T(rs578427) variante intergênica- g.-396G>A (rs34834489) <i>Non coding exon variante</i>	41 Indivíduos saudáveis (Coreia)	Portadores do haplótipo 1 ou 2 mostraram um aumento significativo na atividade, na depuração renal (P=0,006) e na depuração secreção (P=0,007) para a metformina em comparação com os indivíduos não portadores do haplótipo.	(195)
	c.-130C>T (rs12943590) 5'UTR	57 Indivíduos saudáveis (Várias etnias)	Em indivíduos saudáveis os genótipos TT+TC estão associados com o aumento da depuração renal e de secreção da metformina quando expostos a metformina, em comparação com o genótipo CC (P <0,05).	(196)
SNPs associadas à farmacodinâmica das biguanidas				
SLC22A1 (OCT1)	c.1386-2964C>A (rs622342) intrônica	148 Pacientes diabéticos (Caucasianos)	Não existe uma relação significativa entre esta variante genética e as reduções dos níveis HbA1c depois da iniciação do tratamento da metformina.	(197)
		152 Pacientes diabéticos (Rotterdam Study)	Por cada alelo C que o individuo é portador há uma redução nos níveis de HbA1c de 0,28% (P=0,005) em resposta ao tratamento da metformina, após a correção de Bonferroni o valor de P é igual 0,050. Esta variante genética também foi associada com o efeito hipoglicemiante da metformina em pacientes com diabetes mellitus.	(198)
	c.1260_1262del GAT (rs72552763) e c.1258delA (rs35167514) c.181C>T (rs12208357) <i>missense</i>	1531 Pacientes diabéticos (GoDARTS study)	Estas variantes genéticas não tem efeito na redução de HbA1c.	(140)

Continuação Anexo tabela 4

SNPs associadas à farmacodinâmica das biguanidas				
Gene	Alteração genética e classificação	Amostra população	Impacto do SNP	Ref.
SLC22A1 (OCT1)	c.1222A>G (rs628031) <i>missense</i>	152 Pacientes diabéticos (Rotterdam Study)	Esta variante genética não têm efeito na redução do HbA1c em resposta ao tratamento da metformina.	(198)
		33 Pacientes diabéticos (Japão)	A variante genética apenas tem uma pequena contribuição na eficácia clínica da metformina.	(199)
	c.480G>C (rs683369) <i>missense</i>	990 Indivíduos com intolerância à glicose (Várias etnias)	Portadores do alelo C têm um benefício de associação nominal da metformina no que diz respeito à prevenção da diabetes.	(197)
SLC22A2 (OCT2)	c.808T>G (rs316019) <i>missense</i>	148 Pacientes diabéticos (Caucasianos)	Não há uma relação significativa entre este polimorfismo e as reduções dos níveis HbA1c depois da iniciação do tratamento da metformina.	(200)
		200 Pacientes diabéticos (China)	Os pacientes com o genótipo mutante TT apresentaram uma maior concentração de lactato no sangue no grupo tratado com metformina do que aqueles no grupo não-tratado com metformina (P=0,013). Esta tendência não foi observada nos genótipos GG e GT quando comparados com os grupos tratados e não-tratados com metformina.	(201)
		371 Pacientes diabéticos (Dinamarca)	A variante genética não tem efeito significativo nos níveis de HbA1c.	(202)
	g.160696919 C>T (rs662301) <i>non coding exon variant</i>	990 indivíduos com intolerância à glicose (Varias etnias)	Portadores deste alelo tinham benefício de associação nominal da metformina no que diz respeito à prevenção da diabetes 1,57 HR (P=0,02).	(200)

Continuação Anexo tabela 4

SNPs associadas à farmacodinâmica das biguanidas				
Gene	Alteração genética e classificação	Amostra população	Impacto do SNP	Ref.
SLC47A1 (MATE1)	c.922-158G>A (rs2289669) intrónica	116 Pacientes diabéticos (Rotterdam Study)	Esta variante genética foi significativamente associada com a resposta de metformina. Por cada alelo A desta variante a redução foi de 0,30% a mais no HbA1C (P=0,005).	(203)
		148 Pacientes diabéticos (Caucasianos)	O alelo A está significativamente associada com a redução do HbA1c, verificando-se que 20% dos pacientes com diabetes que são homozigotos para o alelo A têm uma redução de duas vezes mais HbA1c em comparação com os pacientes portadores do alelo G (GG + GA) (P= 0,018).	(197)
		371 Pacientes diabéticos (Dinamarca)	O SNP não tem efeito na cinética do HbA1c em resposta ao tratamento da metformina.	202)
		189 Indivíduos saudáveis (Caucasianos)	Observou-se uma associação para a variante alélica com a mudança relativa no nível de HbA1c, atingindo quase o nível de significância estatística (P=0,055). Os níveis de HbA1c -GG: -0.14% (-1.5 mmol/mol), GA:-0.12% (-1.3 mmol/mol), AA: -0.17% (-1.9 mmol/mol) p=0,055	(204)
	c.-66T>C (rs2252281) 5'UTR	371 Pacientes diabéticos (Dinamarca)	Esta variante genética não têm efeito sobre os níveis de HbA1c.	(202)
		57 Indivíduos saudáveis-(Várias etnias)	Esta variante genética foi associada com a tolerância à glicose alterada pós-metformina, verificando-se que os seus portadores tinham uma resposta melhorada (P <0,01).	(196)
SLC47A1 (MATE1) / SLC22A1 (OCT1)	c.922-158G>A (rs2289669) intrónica c.1386-2964C>A (rs622342) intrónica	98 (Rotterdam Study)	Em portadores do genótipo AC (rs622342), houve uma tendência entre a variante genética rs2289669 e a mudança do HbA1c -0,31 (P=0,070), em portadores do genótipo CC (rs622342) existiu uma significativa associação com as mudanças nos níveis de HbA1c 0,68 (P= 0,005).	(205)

Continuação Anexo tabela 4

SNPs associadas à farmacocinética da biguanidas				
Gene	Alteração genética e classificação	Amostra população	Impacto do SNP	Ref.
SLC47A1 (MATE1)	c.1106+1385C>T (rs8065082) intrônica	990 Indivíduos com intolerância à glicose (Várias etnias)	Portadores do minor alelo para esta variante genética têm uma interação nominal para a metformina (P=0,006) e uma mais baixa incidência da diabetes.	(200)
SLC47A2 (MATE2)	c.-130C>T (rs12943590) 5'UTR	57 Indivíduos saudáveis (Várias etnias)	O genótipo TT está associado a uma diminuição da resposta à metformina em indivíduos saudáveis e em pessoas diabéticas, comparativamente aos TC+CC (P=0,002 e P=0,002, respetivamente).	(196)
		253 Pacientes diabéticos (várias etnias)	O genótipo TT tem uma menor redução no HbA1c, após o tratamento de metformina, comparativamente com o genótipo de referência CC (P=0,002).	(206)
SLC29A4 (PMAT)	c.883-522A>G (rs2685753) intrônica c.883-144A>G (rs3889348) intrônica c.1450+1047T>C (rs4720572) intrônica c.1451-858A>G (rs4299914) intrônica c.*313T>A (rs6971788) UTR-3	371 Pacientes diabéticos (Dinamarca)	Estes SNPs não têm efeito no HbA1c, contudo parecem estar associados com a concentração da metformina atingindo a significância estatística, quando comparado os genótipos selvagens com os genótipos com a variante (P<0,05).	(202)
PPAR γ	c.34C>G (rs1801282) <i>missense</i>	1843 (GoDARTS Coorte)	Portadores do alelo G tinham um menor risco de diabetes 0,91 OR (P=0,02) e um aumento da sensibilidade para a insulina (P=0,008). Além disso, o alelo G estava associado a um maior risco de falha ao tratamento (P=0,015) e a uma redução na eficácia da metformina.	(119)
KCNJ11	c.67A>G (rs5219) <i>missense</i>	3534 Pacientes diabéticos e indivíduos saudáveis (Várias etnias)	Portadores do alelo A (K) foram menos protegidos por o tratamento de metformina do que os portadores homocigotos GG (EE) (P <0,02).	(170)

Continuação Anexo tabela 4

SNPs associadas à farmacocinética da biguanidas				
Gene	Alteração genética e classificação	Amostra população	Impacto do SNP	Ref.
KCNJ11/ ABCC8	Haplótipo (c.67A>G (rs5219) / c.4105G>T (rs757110)) ambas <i>missense</i> Nome comum (K23/A1369)	3234 Indivíduos saudáveis (América)	Portadores do alelo A (K) têm uma menor proteção para o tratamento de metformina, comparativamente aos portadores do genótipo GG (EE) (P <0,02). Resultados para ABCC8 A1369S eram semelhantes aos KCNJ11 E23K.	(170)
MTNR1B	c.223+5596C>G (rs10830963) intrónica	3548 Pacientes diabéticos e indivíduos saudáveis (Várias etnias)	Esta variante genética encontra-se associada com glicémia em jejum (P = 0,001). Além disso, também foi associada a um pior funcionamento das células β .	(61)
G6PC2	c.-301G>A (rs573225) intrónica	3548 Pacientes diabéticos e indivíduos saudáveis (Várias etnias)	Esta variante genética encontra-se associada com glicémia em jejum (P = 0,002)	(61)
GCKR	c.1423-418T>C (rs780094) intrónica	3548 Pacientes diabéticos e indivíduos saudáveis (Várias etnias)	Esta variante genética encontra-se associada com glicémia em jejum (P = 0,001)	(61)
MADD	c.3961-451A>T (rs7944584) intrónica	3548 Pacientes diabéticos e indivíduos saudáveis (Várias etnias)	A variante genética encontra-se associada com os níveis de pró-insulina em jejum (P <0,001).	(61)
IRS1	c.2911G>A (rs1801278) <i>missense</i>	60 Pacientes com Síndrome do ovário policístico	Portadores da variante genética Arg tem uma menor eficácia na redução dos níveis de insulina em jejum e da resistência à insulina, comparativamente aos não portadores (P <0,001).	(207)
ATM	c.175-5285G>T (rs11212617) intrónica	3920 Pacientes diabéticos (Escócia)	Os portadores diabéticos do alelo G têm uma maior redução do HbA1c e um maior sucesso no tratamento da diabetes em resposta ao tratamento da metformina 1,35 OR (P = 2,9 \times 10 ⁻⁹)	(208)

Continuação Anexo tabela 4

SNPs associadas à farmacocinética da biguanidas				
Gene	Alteração genética e classificação	Amostra população	Impacto do SNP	Ref.
ATM	c.175-5285G>T (rs11212617) intrónica	1365 Pacientes diabéticos (Rotterdam Study,DCS e CARDS)	Alelo G está associada com o aumento do sucesso do tratamento com a metformina quando tratados com metformina em pessoas com DM2 em comparação com o alelo T (DCS 1,27 OR (P=0,028), Rotterdam study e 1,45 OR (P=0,15) e CARDS não houve associação significativa). Em meta-análises desses três grupos separadamente ou combinados com os grupos previamente publicados, a variante alélica rs11212617 está associada com o sucesso do tratamento com metformina 1,24 OR (P=0,016) e 1,25 OR (P=7,8 x 10 ⁻⁶), respetivamente)	(75)
		990 Indivíduos com intolerância à glicose (varias etnias)	Esta variante genética não têm efeito sobre o tempo de progressão em diabéticos que utilizam metformina.	(209)
SRR	c.-4-2593T>C (rs391300) intrónica	402 Pacientes com diabetes 171 Indivíduos saudáveis chineses	Os pacientes com o genótipo CT ou TT tratados com metformina apresentam melhorias nos níveis de FPG, PPG e colesterol em relação aos indivíduos com o genótipo CC (P<0,05).	(59)

Anexo tabela 5- Estudos associados à farmacogenética GLP-1 e análogos

SNPs associadas à farmacodinâmica do GLP-1 e análogos				
Gene	Alteração genética e classificação	Amostra população	Impacto do SNP	Ref.
TCF7L2	c.382-41435C>T (rs7903146) intrónica c.483+9017G>T (rs12255372) intrónica	73 Indivíduos saudáveis (Alemanha)	A primeira fase de secreção de insulina induzida por GLP-1 foi significativamente reduzida em portadores dos alelos de risco rs7903146 (P=0,03) e rs12255372 (P=0,02).	(65)
WFS1	c.461-9A>G (rs10010131) intrónica	73 Indivíduos saudáveis (Alemanha)	Infusão de GLP-1 combinado com um <i>hyperglycaemic clamp</i> mostraram uma redução significativa da taxa de secreção de insulina durante a primeira e segunda fase da secreção de insulina induzida por GLP-1 em portadores do alelo de risco (redução de 36% e 26%, respetivamente; P=0,007 e P = 0,04, respetivamente).	(63)
THADA	c.3559A>G (rs7578597) <i>missense</i>	123 Indivíduos saudáveis (Holanda)	Portadores do alelo A têm associado uma menor resposta das células β para o GLP-1 e arginina (ambos P <1,6 x 10 ⁻³)	(66)
GLP1R	c.502G>A ou c.502G>C (rs6923761) <i>missense</i> c.392G>A, c.392G>C ou c.392G>T (rs3765467) <i>missense</i>	88 Indivíduos saudáveis	Estas duas variantes genéticas (rs6923761 e rs3765467) foram nominalmente associada a responsividade das células β alterada em resposta a infusão de GLP-1.	(210)

Anexo tabela 6- Estudos associados à farmacogenética dos inibidores de DPP-4. Legenda: HbA1c- Hemoglobina glicosilada.

SNPs associadas à farmacodinâmica dos inibidores de DPP-4				
Gene	Alteração genética e classificação	Amostra população	Impacto do SNP	Ref.
Perto CTRB1/2	g.75213347T>G (rs7202877) variante intergênica	354 Individuos saudáveis (Caucasianos)	Portadores do alelo G mostraram uma diminuição significativamente menor nos níveis de HbA1c após o tratamento com inibidor de DPP-4, isto quando comparado com o genótipo TT. A meta-análise mostrou que portadores do alelo G tiveram uma diminuição menos acentuada do HbA1c (P=0,0015).	(211)

Anexo tabela 7- Estudos associados à farmacogenética dos inibidores da α -glicosidase. Legenda: OR-*Odd ratio*

SNPs associadas à farmacodinâmica dos inibidores da α -glicosidase				
Gene	Alteração genética e classificação	Amostra população	Impacto do SNP	Ref.
ADIPOQ	c.45T>G (rs2241766) sinónimo c.214+62G>T (rs1501299) intrónica	356 Pacientes diabéticos	Os portadores do genótipo TT do SNP c.214+62G>T têm uma maior tendência para a DM2, comparativamente com os portadores do genótipo GG, 2,83 OR (P=0,012). A combinação do SNP c.45T>G com o SNP c.214+62G>T tem um efeito mais forte no aumento do risco para a DM2.	(73)
PPAR α	c.1159+1343 A>G (rs4253776) intrónica c.1160-396G>C (rs4253778) intrónica	767 Pacientes diabéticos	No grupo acarbose portadores do alelo G do SNP rs4253776 e portadores do genótipo CC do SNP rs4253778 têm um 1,7 e 2,7 vezes maior risco de diabetes.	(74)
PPAR γ / PGC-1 α (PPARGC1A)	c.34C>G (rs1801282) <i>missense</i> c.1444G>A (rs8192678) <i>missense</i>	770 Pacientes diabéticos (Branços)	Mulheres portadoras do genótipo CC (rs1801282) têm um maior risco para diabetes no grupo acarbose 2,89 OR (P=0,018). A acarbose preveniu o desenvolvimento de diabetes, independentemente do genótipo (CC, CG e GG) do gene PPAR- γ 2. mas apenas os portadores do alelo A do gene PGC-1 α eram sensíveis ao tratamento acarbose.	(72)

Anexo 2- Terapias utilizadas pelos indivíduos da amostra em estudo no controlo dos níveis de glicémia

Anexo tabela 8- Terapias utilizados no controlo da DM2 e nº de indivíduos por terapia (amostra em estudo).Legenda: BIG- biguanidas; I-DPP-4- inibidores de DPP-4; SU; sulfonilureias.

Tratamentos utilizados na amostra de 51 indivíduos diabéticos	Nº de indivíduos por tratamento	Nº do exoma dos indivíduos
Metformina (BIG) + sitagliptina (I-DPP-4) e insulina isofânica	1	3
Metformina (BIG) + sitagliptina (I-DPP-4)	1	8
Metformina (BIG) + sitagliptina (I-DPP-4) e insulina aspártico	2	26;32
Metformina (BIG) + sitagliptina (I-DPP-4) e insulina glargina	1	33
Metformina (BIG) + vildagliptina (I-DPP-4) e gliclazida (SU)	1	51
Metformina (BIG) + vildagliptina (I-DPP-4) e insulina glargina	1	19
Metformina (BIG) + vildagliptina (I-DPP-4) e insulina glargina e insulina lispro	1	34
Metformina (BIG) e insulina glargina e insulina lispro	1	36
Metformina (BIG) e gliclazida (SU)	2	50;29
Metformina (BIG) e gliclazida (SU) e saxagliptina (I-DPP-4)	1	46
Metformina (BIG) e insulina aspártico	1	43
Metformina (BIG) e insulina detemir e insulina isofânica	1	42
Metformina (BIG) e insulina glargina	2	22;31
Metformina (BIG) e insulina glargina e insulina aspártico	2	10;39
Metformina (BIG) e insulina glargina e insulina humana	2	38;45
Metformina (BIG) e insulina glargina e insulina lispro	3	5;20;36
Metformina (BIG) e insulina glargina e insulina regular	1	41
Metformina (BIG) e insulina humana	1	47
Metformina (BIG) e insulina lispro	2	30;37
Metformina (BIG) e metformina (BIG) + sitagliptina (I-DPP-4) e insulina glargina	1	44
Metformina(BIG) e sitagliptina(I-DPP4) e Insulina glargina e Insulina humana	2	6;18
Metformina (BIG) e vildagliptina (I-DPP-4)	1	4
Metformina (BIG)	1	21
Insulina Lispro	1	35
Insulina aspártico e insulina isofânica	1	1
Insulina glargina e insulina glulisina	1	2
Insulina glargina e insulina humana	3	7;11;23
Insulina glargina	1	13
Insulina aspártico	2	14;25
Insulina glargina e insulina aspártico	3	15;40;48
Insulina humana	1	17
Insulina isofânica e insulina humana	1	23
Insulina glargina e insulina lispro	1	27
Não tomam medicação	4	12;16;28;49

Anexo 3- Genótipos referentes aos locais onde se encontram os 16 SNPs

Anexo tabela 9- Genótipos referentes aos locais onde se encontram os 16 SNPs alvo. Legenda: b/c- baixa cobertura.

Nucleótido ref>alt (refSNP)	ex 1	ex 2	ex 3	ex 4	ex 5	ex 6	ex 7	ex 8	ex 9	ex 10	ex 11	ex 12	ex 13	ex 14	ex 15	ex 16	ex 17	ex 18	ex 19
c.986A>G (rs10509681)	A/A	A/A	A/A	A/G	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/G	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A
c.206G>A (rs11572080)	G/G	G/G	G/G	G/A	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/A	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G
c.521T>C (rs4149056)	b/c	T/T	b/c	T/T	T/T	T/T	T/C	b/c	T/C	T/T	T/C	T/T	T/C	T/C	T/T	T/T	T/C	T/C	T/T
c.430C>T (rs1799853)	C/C	C/C	C/C	C/T	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	C/T	C/C	C/C	C/T	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C
c.1075A>C (rs1057910)	A/C	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/C	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A
c.67A>G(rs5219)	G/G	G/G	A/A	A/G	A/G	A/G	A/G	G/G	G/G	A/G	G/G	G/G	A/G	G/G	A/G	A/A	G/G	G/G	G/G
c.3819G>A (rs1799859)	G/A	G/G	G/G	G/A	G/G	G/A	G/A	G/A	A/A	G/A	G/A	G/A	G/G	G/G	G/A	G/G	G/A	G/A	G/G
c.2277C>T (rs1801261)	C/T	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	C/T	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C
c.2911G>A (rs1801278)	G/G	G/G	G/A	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/A	G/G	G/G	G/A	G/A	G/G
c.181C>T (rs12208357)	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	C/T	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C
c.1201G>A (rs34130495)	G/G	G/A	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G
c.1393G>A (rs34059508)	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/A	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G
c.34C>G (rs1801282)	b/c	C/C	b/c	b/c	C/C	b/c	C/C	b/c	G/C	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C
c.388A>G (rs2306283)	A/A	b/c	b/c	b/c	b/c	b/c	b/c	b/c	G/G	b/c	b/c	A/A	A/G	A/G	A/A	b/c	b/c	A/A	A/G
c.1444G>A (rs8192678)	b/c	G/G	G/G	b/c	G/G	G/A	G/A	b/c	G/A	G/G	G/G	G/G	G/A	G/G	A/A	G/A	A/A	A/A	G/A
c.3559A>G (rs7578597)	A/A	A/G	A/A	A/A	A/G	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/G	A/A	A/A	A/A	A/G	A/A	A/A	A/G

Continuação Anexo tabela 9-Legenda: b/c- baixa cobertura

Nucleótipo ref>alt (refSNP)	ex 20	ex 21	ex 22	ex 23	ex 24	ex 25	ex 26	ex 27	ex 28	ex 29	ex 30	ex 31	ex 32	ex 33	ex 34	ex 35	ex 37	ex 38
c.986A>G (rs10509681)	A/A	A/G	A/A	A/A	A/G	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/G	A/A	A/A	A/A	A/G
c.206G>A (rs11572080)	G/G	G/A	G/G	G/G	G/A	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/A	G/G	G/G	G/G	G/A
c.521T>C (rs4149056)	T/T	T/T	T/T	T/T	b/c	T/C	b/c	b/c	b/c	T/T	b/c	T/T	T/T	T/C	T/T	T/T	T/C	T/T
c.430C>T (rs1799853)	C/C	C/T	C/C	C/C	C/T	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	C/T	C/C	C/C	C/C	C/T
c.1075A>C (rs1057910)	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/C	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A
c.67A>G(rs219)	A/G	A/G	A/A	G/G	A/A	A/G	A/G	A/G	A/A	A/A	A/A	A/G	A/A	A/A	A/G	G/G	A/G	A/G
c.3819G>A (rs1799859)	G/G	G/A	G/A	G/A	G/G	G/A	G/A	G/A	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/A	A/A	G/A	G/A
c.2277C>T (rs1801261)	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	C/T	C/C	C/T	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C
c.2911G>A (rs1801278)	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G
c.181C>T (rs12208357)	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	C/T	C/C	C/C	C/T	C/C	C/C	C/C	C/C
c.1201G>A (rs34130495)	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G
c.1393G>A (rs34059508)	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	b/c	G/G	G/A	G/G	G/G	G/G	G/A	G/A
c.34C>G (rs1801282)	C/C	C/G	C/C	C/G	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	C/G	C/C	C/G	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	C/G
c.388A>G (rs2306283)	b/c	G/G	A/A	A/A	b/c	b/c	b/c	b/c	b/c	b/c	b/c	b/c	b/c	A/G	A/G	A/G	b/c	G/G
c.1444G>A (rs8192678)	A/A	G/G	G/G	G/G	G/A	G/A	G/A	G/A	G/A	G/A	G/A	A/A	G/G	G/G	G/G	G/A	G/A	G/A
c.3559A>G (rs7578597)	A/A	A/A	A/A	A/G	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A

Continuação Anexo tabela 9-Legenda: b/c- baixa cobertura

Nucleótipo ref>alt (refSNP)	ex 39	ex 40	ex 41	ex 42	ex 43	ex 44	ex 45	ex 46	ex 47	ex 48	ex 49	ex 50	ex 51
c.986A>G (rs10509681)	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/G	A/A	A/A	A/A	A/A
c.206G>A (rs11572080)	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/A	G/G	G/G	G/G	G/G
c.521T>C (rs4149056)	T/T	T/T	T/T	T/C	T/T	T/T	T/T	T/T	T/T	T/T	T/C	T/C	T/C
c.430C>T (rs1799853)	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	C/T	C/C	C/C	C/C	C/C
c.1075A>C (rs1057910)	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/C	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A
c.67A>G(rs5219)	A/G	A/A	G/G	A/G	G/G	A/G	A/G	A/G	G/G	A/A	G/G	G/G	A/G
c.3819G>A (rs1799859)	G/G	G/G	G/A	G/A	A/A	G/A	G/A	G/A	G/A	G/G	G/G	G/G	G/A
c.2277C>T (rs1801261)	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C
c.2911G>A (rs1801278)	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/A	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G
c.181C>T (rs12208357)	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	C/T	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C
c.1201G>A (rs34130495)	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/A	G/G
c.1393G>A (rs34059508)	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G	G/G
c.34C>G (rs1801282)	C/G	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	C/G	C/C	C/C	C/C	G/C	C/C	C/C
c.388A>G (rs2306283)	b/c	A/A	A/A	b/c	A/A	A/G	A/G	A/A	G/G	A/G	A/G	A/G	G/G
c.1444G>A (rs8192678)	G/A	G/A	G/G	G/A	G/A	G/A	G/G	G/A	A/A	G/A	G/A	G/A	G/A
c.3559A>G (rs7578597)	A/A	A/A	A/A	A/G	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A