

ELISA DE SOUZA ALVES

**HAPLÓTIPOS, NÍVEIS SÉRICOS E ATIVIDADE TOTAL DE DIPEPTIDIL
PEPTIDASE 4 (DPP4) EM IDOSOS PORTADORES OU NÃO DE DIABETES
MELLITUS TIPO 2**

BRASÍLIA-DF, 2022

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

ELISA DE SOUZA ALVES

**HAPLÓTIPOS, NÍVEIS SÉRICOS E ATIVIDADE TOTAL DE DIPEPTIDIL
PEPTIDASE 4 (DPP4) EM IDOSOS PORTADORES OU NÃO DE DIABETES
MELLITUS TIPO 2**

Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.

Orientador: Professor Doutor Otávio de Tolêdo Nóbrega

BRASÍLIA-DF

2022

ELISA DE SOUZA ALVES

**HAPLÓTIPOS, NÍVEIS SÉRICOS E ATIVIDADE TOTAL DE DIPEPTIDIL
PEPTIDASE 4 (DPP4) EM IDOSOS PORTADORES OU NÃO DE DIABETES
MELLITUS TIPO 2**

Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.

Aprovado em: 31 de janeiro de 2022.

BANCA EXAMINADORA

Dr. Otávio de Tolêdo Nóbrega (presidente)
Universidade de Brasília

Dra. Izabela Marques Dourado Bastos Charneau (membro)
Universidade de Brasília

Dr. Aparecido Pimentel Ferreira (membro)
Centro Universitário ICESP

Dr. Jorge Luis Zeredo Lopes (suplente)
Universidade de Brasília

Dedico este trabalho aos meus pais, ao meu irmão (in memoriam) e ao meu noivo, com todo meu amor e gratidão, por me ensinarem tanto e por caminharem comigo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por todo o seu cuidado comigo e com a minha família durante esse período, por ter me sustentado nos momentos difíceis e dado forças para continuar, sem deixar faltar nada. E também por cada pessoa que colocou no meu caminho, permitindo que eu chegasse até aqui. Agradeço a Nossa Senhora por seu colo de mãe sempre.

Agradeço aos meus pais, Elizabete e Helder, que sempre me incentivaram, torceram e lutaram pela minha educação e crescimento pessoal e profissional. Por serem meus exemplos e não medirem esforços pelos filhos. O que eu sou hoje, devo a vocês!

Agradeço de forma muito especial ao meu irmão, Fernando Augusto, por ter me ensinado tanto sobre a vida sem dizer muitas palavras. Por sua luta, fé, doação e sorriso sincero que nunca o abandonaram mesmo diante das maiores dores e dificuldades. Ele foi e continuará sendo minha inspiração para ser melhor a cada dia em tudo o que faço.

Agradeço ao meu noivo, Gabriel, por todo o companheirismo, carinho e apoio, e por, além de me incentivar, sonhar e realizar junto comigo.

Agradeço ao meu orientador, Prof. Dr. Otávio Nóbrega, com quem aprendi muito, pelas oportunidades que me concedeu, por todos os ensinamentos, paciência e direcionamento desde a graduação.

Agradeço a minha amiga Dra. Audrey Cecília, por toda a disponibilidade e boa vontade em me ensinar e me ajudar no laboratório. Sua ajuda foi essencial para esse trabalho.

Agradeço à Prof. Dra. Izabela Marques, por, prontamente, disponibilizar os materiais e me ajudar nos ensaios de atividade enzimática no Laboratório de Interação Patógeno-Hospedeiro, na Universidade de Brasília.

Agradeço a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) pelo financiamento que viabilizou a realização desse trabalho. A Universidade Católica de Brasília que me permitiu desenvolver este trabalho em suas dependências.

Agradeço de coração a todas as pessoas que, direta ou indiretamente, contribuíram para que esse trabalho fosse concluído.

*“Nada do que é feito por amor é pequeno”
(Chiara Lubich)*

RESUMO

Introdução: A dipeptidil peptidase 4 (DPP4) regula vários processos fisiológicos e tem um papel fundamental na homeostase da glicose por meio da rápida inativação proteolítica dos hormônios incretinas. **Objetivo:** Verificar a associação de um haplótipo constituído por dois polimorfismos de nucleotídeo único (rs2268894 e rs6741949) no gene *DPP4* com diabetes mellitus tipo 2 (DM2) e variáveis relacionadas à glicemia de jejum em uma amostra de idosos brasileiros, levando em consideração os níveis séricos e a atividade enzimática de DPP4. **Métodos:** Características clínicas, bioquímicas e antropométricas, bem como níveis séricos de DPP4 e atividade enzimática foram determinados em 800 idosos. A análise de polimorfismos foi realizada por PCR em tempo real (qPCR) e os haplótipos foram derivados das frequências genotípicas utilizando o software Haploview. As análises estatísticas compararam medidas e proporções de acordo com o diagnóstico de DM2 e os grupos haplotípicos de DPP4. **Resultados:** O haplótipo mais comum consistiu na cadeia T-rs2268894/G-rs6741949, que foi 20% mais frequente entre os não diabéticos. Considerando apenas os pacientes não diabéticos, os portadores do haplótipo T/G apresentaram níveis significativamente mais baixos de glicemia, insulina, índice HOMA-IR e atividade DPP4. Entre os pacientes diabéticos, o haplótipo T/G foi associado a níveis mais baixos de DPP4, enquanto os escores glicêmicos não foram afetados por variantes alélicas. **Conclusão:** Estes resultados sugerem que a arquitetura genética da DPP4 afeta o perfil glicêmico e os níveis séricos e a atividade da enzima em idosos de acordo com a presença ou ausência de DM2, com possível implicação do haplótipo T/G para o risco de desenvolvimento de DM2.

Palavras-chave: dipeptidil peptidase 4; diabetes mellitus tipo 2; glicemia; genética; idosos.

ABSTRACT

Introduction: Dipeptidyl peptidase 4 (DPP4) regulates various physiological pathways and has a pivotal role in glucose homeostasis through rapid proteolytic inactivation of incretin hormones. **Objective:** To verify the association of a haplotype constituted by two single nucleotide polymorphisms (rs2268894 and rs6741949) in the *DPP4* gene with type 2 diabetes mellitus (T2DM) and fasting glycemia-related variables in a sample of Brazilian older adults, taking serum levels and enzymatic activity of DPP4 into account. **Methods:** Clinical, biochemical and antropometric characteristics as well as DPP4 serum levels and enzymatic activity were determined from 800 elderly individuals. Polymorphism analysis was performed by real-time PCR (qPCR) and haplotypes derived from the genotypic frequencies using the Haploview software. Statistical analyses compared measures and proportions according to T2DM diagnosis and to DPP4 haplotypic groups. **Results:** The most common haplotype consisted in the T-rs2268894/G-rs6741949 string, which was 20% more frequent among non-diabetics. Considering non-diabetic patients alone, carriers of the T/G haplotype had significantly lower levels of blood glucose, insulin, HOMA-IR index, and DPP4 activity. Among diabetic patients, the T/G haplotype was associated with lower DPP4 levels whereas glycemic scores were not affected by allelic variants. **Conclusion:** These results suggest that the genetic architecture of DPP4 affects the glycemic profile and DPP4 serum levels and activity among elderly individuals according to the presence or absence of T2DM, with a possible implication of the T/G haplotype to the risk of T2DM onset.

Key words: dipeptidyl peptidase 4; type 2 diabetes mellitus; glycemia; genetic; elderly.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Esquema representativo da via metabólica das incretinas e da DPP4. AMPc: adenosina monofosfato cíclico; ATP: adenosina trifosfato; DPP4: dipeptidil peptidase 4; Epac2: fator de troca de nucleotídeo guanina; GIP: polipeptídeo insulínico dependente de glicose; GIPR: receptor do GIP; GLP-1: peptídeo semelhante a glucagon 1; GLP-1R: receptor do GLP-1; PKA: proteína quinase A; tmAC: adenilil ciclase transmembranar.

Figura 2 – Representação esquemática da dipeptidil peptidase 4 (DPP4). (A) Estrutura primária de monômero de DPP4. (B) Estrutura quaternária de homodímero de DPP4.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Comparação de características clínicas e da bioquímica em jejum entre indivíduos não diabéticos e diabéticos.

Tabela 2 – Análise das variáveis relacionadas à glicemia em jejum na amostra de acordo com a condição clínica dos indivíduos e os haplótipos.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADB	Antidiabético
AHT	Anti-hipertensivo
AMC	7-amino-4-metilcumarina
AMPc	Adenosina monofosfato cíclico
ATP	Adenosina trifosfato
CC	Circunferência de cintura
CD26	<i>Cluster</i> de diferenciação 26
COVID-19	Coronavírus 2019
DHGNA	Doença hepática gordurosa não alcoólica
DL	Desequilíbrio de ligação
DM2	Diabetes mellitus tipo 2
DPP4	Dipeptidil peptidase 4
ELISA	Ensaio de imunoabsorção enzimática
Epac2	Fator de troca de nucleotídeo guanina
GIP	Polipeptídeo insulínico dependente de glicose
GLP-1	Peptídeo semelhante a glucagon 1
Gly-Pro	Glicil-prolil
HAS	Hipertensão arterial sistêmica
HbA1c	Hemoglobina glicada tipo A1c
HOMA-IR	Modelo de avaliação da homeostase da resistência à insulina
IMC	Índice de massa corporal
PAD	Pressão arterial diastólica
PAS	Pressão arterial sistólica
PC-R	Proteína C-reativa
PKA	Proteína quinase A
qPCR	Reação em cadeia da polimerase em tempo real
RI	Resistência à insulina
RNA _m	Ácido ribonucleico mensageiro
SNP	Polimorfismo de nucleotídeo único
SPSS	Pacote Estatístico para Ciências Sociais
tmAC	Adenilil ciclase transmembranar
TSH	Hormônio estimulante da tireóide

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
3 OBJETIVOS	20
3.1 OBJETIVO GERAL	20
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
4 MÉTODOS	21
4.1 AMOSTRA	21
4.2 AVALIAÇÃO CLÍNICA	21
4.3 ANÁLISES BIOQUÍMICAS	22
4.4 GENOTIPAGEM E CONSTRUÇÃO DE HAPLÓTIPOS E <i>DPP4</i>	22
4.5 NÍVEIS SÉRICOS E ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE <i>DPP4</i>	23
4.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	23
5 RESULTADOS	25
6 DISCUSSÃO	29
7 CONCLUSÃO	32
REFERÊNCIAS	33
APÊNDICE A - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	40
ANEXO A – COMPROVANTE DE APROVAÇÃO EM COMITÊ DE ÉTICA	41

1 INTRODUÇÃO

O envelhecimento acarreta inúmeras alterações fisiológicas subjacentes e um maior risco de doença crônicas (1). O diabetes mellitus tipo 2 (DM2) é um distúrbio metabólico crônico caracterizado por um estado de hiperglicemia resultante principalmente da combinação do comprometimento progressivo da secreção de insulina pelas células β das ilhotas pancreáticas e da ação da insulina nos tecidos-alvo (2,3). Essa condição clínica é modulada por uma grande variedade de contribuintes modificáveis (obesidade, comportamento sedentário, alimentação não saudável) e não modificáveis (idade, fatores metabólicos e genéticos) para o seu desenvolvimento (3,4).

A dipeptidil peptidase 4 (DPP4) é uma serina protease ubiquitária encontrada como uma glicoproteína transmembranar tipo II em muitos tipos celulares e também como uma proteína solúvel no plasma (5). A DPP4 remove dipeptídeos X-prolina e X-alanina N-terminais de diversos substratos peptídicos e regula uma grande variedade de processos fisiológicos (6-8). Essa enzima tem um papel fundamental na homeostase da glicose por meio da rápida inativação proteolítica de hormônios incretinas, chamados peptídeo semelhante a glucagon 1 (GLP-1) e polipeptídeo insulínico dependente de glicose (GIP), ambos responsáveis por aproximadamente 50% da secreção pós-prandial de insulina (9,10). Apesar da atividade e dos níveis séricos da DPP4 tenderem a estar aumentados em pacientes com DM2 (8,11,12), alguns estudos encontraram resultados opostos (13-15), o que traz uma inconsistência em torno dessa relação.

Desde a aprovação dos medicamentos inibidores de DPP4 para tratar DM2, o interesse em efeitos fisiológicos alternativos da enzima e na associação de características de DPP4 com diabetes e outras condições aumentou (9,11). Então, ficou claro que a DPP4 também possui funções não enzimáticas como proteína de ligação e sinalização, e que se destaca como uma adipocina cuja ação autócrina ou parácrina desencadeia a insensibilidade à insulina (16,17). Assim, os níveis de expressão e atividade de DPP4 têm sido encontrados alterados em cenários como obesidade (18), DM2 (19) e doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) (20), e tudo isso aponta para a necessidade de que análises sobre DPP4 considerem o contexto em questão.

O gene humano codificador de DPP4, localizado no cromossomo 2 (2q24.2), contém vários sítios polimórficos, alguns dos quais estão associados a DM2, infarto do miocárdio, dislipidemia e infecção pelo coronavírus 2019 (COVID-19) (16,21-23). Dado o papel fundamental da DPP4 no metabolismo da glicose ao regular os níveis circulantes de incretinas insulinoatrópicas e considerando que o DM2 é uma doença multifatorial com um claro componente genético (24), o presente estudo teve como objetivo verificar a associação de haplótipo constituído por dois polimorfismos de nucleotídeo único comuns (rs2268894 e rs6741949) em regiões não codificantes do gene *DPP4* com DM2 e variáveis relacionadas à glicemia de jejum em uma amostra de idosos brasileiros, levando em consideração os níveis séricos e a atividade enzimática da DPP4.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

O envelhecimento populacional tem imprimido importantes mudanças no perfil epidemiológico das populações, com alterações relevantes nos indicadores de morbimortalidade, como um aumento na prevalência de doenças crônicas em todo o mundo (25). Em nível biológico, o processo de envelhecimento está associado ao acúmulo gradual de ampla variedade de danos moleculares e celulares e ao comprometimento progressivo de muitas funções do corpo, levando a um aumento do risco de muitas doenças, como o diabetes (26).

O diabetes mellitus tipo 2, que representa 90% de todos os casos de diabetes, é reconhecido como uma epidemia global com considerável impacto na saúde individual e pública, tendo sido a nona principal causa de mortes e a sétima de incapacidade em todo o mundo em 2017 (27,28). A Federação Internacional do Diabetes estimou que o número de pessoas com idade de 65 a 99 anos vivendo com diabetes foi de 122,8 milhões em 2017, e, se as tendências atuais persistirem, estima-se que esse número será de 253,4 milhões em 2045 (29). Adultos com 65 anos ou mais e com DM2 representam cerca de metade de todos os indivíduos com diabetes (2).

A etiologia do DM2 é multifatorial e envolve, em graus variados, fatores ambientais, como sedentarismo, alimentação rica em carboidrato e gordura, obesidade e estresse, e fatores genéticos (30). Estes últimos têm se mostrado importantes determinantes predisponentes na suscetibilidade individual ao DM2 e um número crescente de estudos tem sugerido a possibilidade de muitos genes, principalmente envolvidos no metabolismo de carboidratos e lipídeos, serem responsáveis pelo desenvolvimento de DM2 juntamente com fatores ambientais e de estilo de vida (30-32).

O DM2 tem uma fisiopatologia complexa e os principais mecanismos que caracterizam essa condição são a resistência à insulina, especialmente nos tecidos muscular esquelético, adiposo e hepático, e uma inadequada secreção de insulina pelas células β pancreáticas (4,27). A insulina é um hormônio anabólico essencial produzido no pâncreas, responsável por promover o armazenamento de combustíveis metabólicos nas células (33). A falta de insulina ou a incapacidade das células de responder à mesma leva à hiperglicemia, que, se não for controlada a longo prazo,

pode causar danos a vários órgãos do corpo, levando ao desenvolvimento de complicações microvasculares, como neuropatia, nefropatia e retinopatia, e macrovasculares, como doença arterial coronariana e periférica (29).

Durante um estado de resistência periférica à ação da insulina, o pâncreas inicialmente aumenta a produção desse hormônio para reduzir os níveis crescentes de glicose no sangue. No entanto, a hiperinsulinemia a longo prazo incorre em estresse das células β (2). A progressão da doença é atribuída à diminuição gradual da massa e da capacidade secretória das células β pancreáticas (30), com até 50% de perda celular no momento do diagnóstico (34).

Pacientes com diabetes tipo 2 podem ter níveis de insulina normais ou elevados, mas a falha em normalizar a glicose no sangue reflete um defeito relativo na secreção de insulina estimulada pela glicose, que é insuficiente para compensar a resistência tecidual à mesma (35). Outros distúrbios glicorregulatórios geralmente estão presentes no DM2, como o descontrole da produção hepática de glicose, a hipersecreção de glucagon e uma resposta às incretinas prejudicada (2).

A ingestão de alimentos ativa uma resposta hormonal complexa com o intuito de estimular a captura de glicose pelos tecidos, e as ilhotas pancreáticas cumprem papel primordial nesta resposta (33). Embora o aumento da glicemia seja o principal estímulo para a secreção da insulina, os hormônios incretinas, denominados peptídeo semelhante a glucagon 1 (GLP-1) e polipeptídeo insulínico dependente de glicose (GIP), liberados por células do epitélio gastrointestinal durante a passagem dos nutrientes, atuam de forma considerável na potencialização do efeito da glicose sobre as células β pancreáticas e na modulação da secreção de glucagon pelas células α (36).

GLP-1, secretado pelas células L do intestino, e GIP, originado principalmente das células enteroendócrinas K, ligam-se a receptores específicos na superfície das células β acoplados à proteína Gs, o que promove o aumento dos níveis de adenosina monofosfato cíclico (AMPc) intracelular catalizado pela adenilil ciclase transmembranar (tmAC), levando à ativação de outras enzimas da cascata de sinalização, que culmina no aumento da exocitose de grânulos de insulina de maneira dependente da glicose (37,38). Em comum, ambas incretinas têm meia-vida na circulação extremamente curta devido à rápida degradação proteolítica que sofrem pela DPP4 (9).

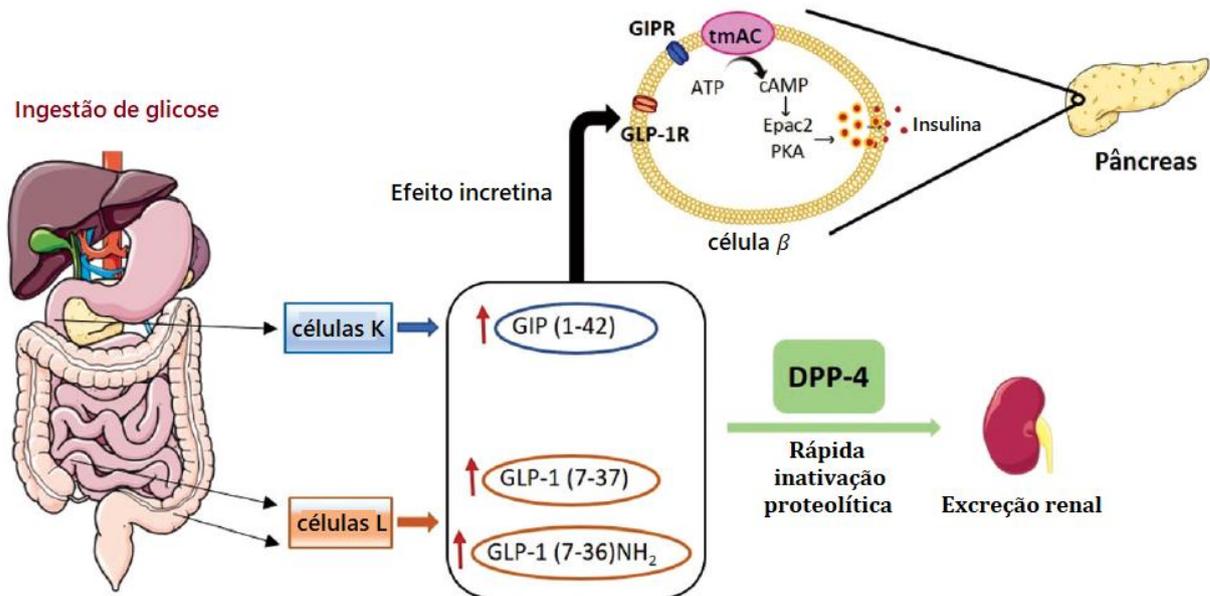


Figura 1 – Esquema representativo da via metabólica das incretinas e da DPP4. AMPc: adenosina monofosfato cíclico; ATP: adenosina trifosfato; DPP4: dipeptidil peptidase 4; Epac2: fator de troca de nucleotídeo guanina; GIP: polipeptídeo insulínico dependente de glicose; GIPR: receptor do GIP; GLP-1: peptídeo semelhante a glucagon 1; GLP-1R: receptor do GLP-1; PKA: proteína quinase A; tmAC: adenilil ciclase transmembranar. Adaptado de Proença C, et al. (37).

Na década de 1990, a descoberta do papel da DPP4 na inativação das incretinas a revelou como um possível alvo terapêutico para o tratamento do diabetes (39,40), o que foi concretizado com a aprovação dos inibidores de DPP4, as chamadas gliptinas, como medicamentos para controlar a glicemia de pacientes com DM2, por aumentarem a biodisponibilidade e prolongarem os efeitos insulínicos das incretinas, com baixo risco de hipoglicemia (41). Além disso, já foi relatada uma menor necessidade de intensificação do tratamento do diabetes, melhores preservação do controle glicêmico e manutenção da função das células β em diabéticos em uso de inibidor de DPP4, indicando que a inibição da enzima pode atenuar a progressão do DM2 (42).

A DPP4, também conhecida como *cluster* de diferenciação 26 (CD26), é uma glicoproteína transmembranar do tipo II de 110 kDa pertencente à subfamília S9B das serino peptidases (9). Ela consiste principalmente de 4 domínios: um domínio

citoplasmático curto (1-6 aminoácidos (aa)), um domínio transmembranar (7-28 aa), um segmento de haste flexível (29-39 aa) e o domínio extracelular (29-766 aa), que contém a região catalítica (5). A DPP4 é amplamente distribuída nos tecidos, como fígado, baço, pulmões, pâncreas, rins, intestino e medula óssea, e também em células sanguíneas e endoteliais (6), tendo sido descrita pela primeira vez em 1966 (43). O nível de expressão da DPP4 depende do tipo, estado de diferenciação e/ou ativação das células (38).

A DPP4 também é encontrada na forma solúvel em diversos fluidos corporais, como sangue, urina, fluidos seminal e torácico, devido à sua clivagem e remoção da membrana celular pela ação de proteases (metaloproteínases de matriz), podendo, dessa forma, agir de maneira parácrina e endócrina em diferentes células e tecidos (41). No entanto, a contribuição, regulação e especificidade celular dessas proteases para a regulação dos níveis circulantes de DPP4 ainda são desconhecidas (38) e as fontes de DPP4 solúvel em humanos ainda não foram esclarecidas (44).

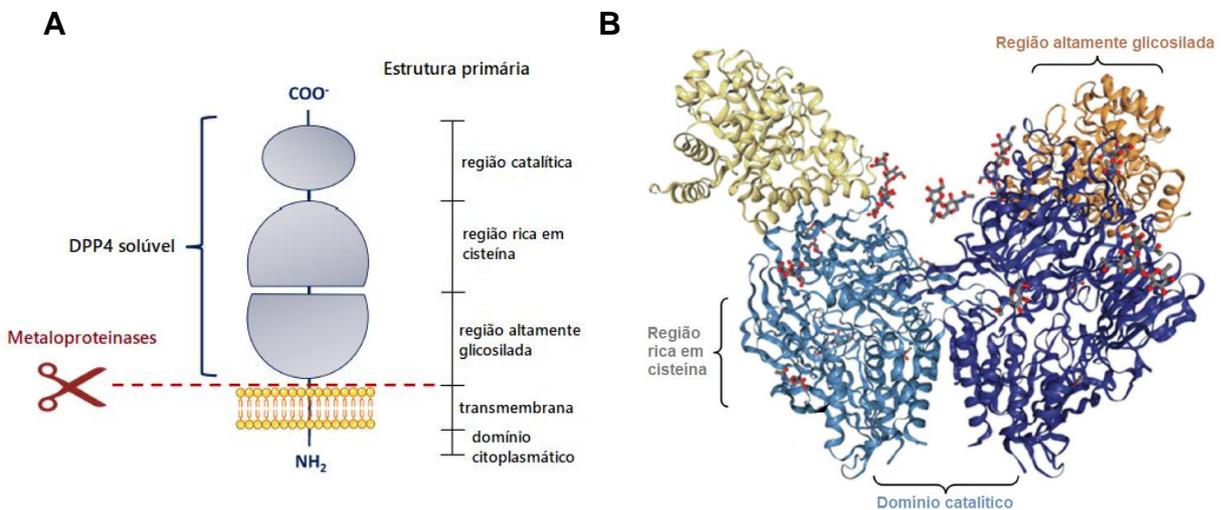


Figura 2 – Representação esquemática da dipeptidil peptidase 4 (DPP4). (A) Estrutura primária de monômero de DPP4, adaptado de Röhrborn D, et al (9). (B) Estrutura quaternária de homodímero de DPP4, adaptado de Zou H, et al (10).

Como uma exopeptidase altamente específica, a DPP4 cliva dipeptídeos N-terminais de diversos substratos além das incretinas, incluindo fatores de crescimento, neuropeptídeos e quimiocinas, preferencialmente com uma prolina na penúltima posição, mas também com alanina e glicina, embora menos rapidamente (10,17). A DPP4 pode ser encontrada como um monômero, homodímero ou como

homotetrâmero na superfície das células e necessita da dimerização para sua atividade enzimática, sendo essa a forma em que é predominante encontrada (9).

A ação proteolítica é apenas uma das múltiplas funções dessa proteína, uma vez que também já foram descritas atividades como receptora, funções coestimulatórias, ligação e interação com outras proteínas e um papel na apoptose (6). Por meio da sua região rica em cisteína e da região altamente glicosilada, a DPP4 interage com diferentes proteínas, como adenosina deaminase, caveolina-1 e proteínas de matriz extracelular (colágeno e fibronectina), ampliando ainda mais o seu espectro de ação em diferentes processos fisiológicos (41). A DPP4 também foi identificada como um potencial mediador da inflamação, muitas vezes associada ao desenvolvimento de resistência à insulina (45).

Estudos prévios relataram associação de elevados níveis séricos e atividade de DPP4 com DM2, resistência à insulina e obesidade (12,18,46,47). Um estudo longitudinal de 4 anos apontou uma maior atividade de DPP4 como um fator de risco independente para o desenvolvimento de pré-diabetes ou diabetes tipo 2 em indivíduos normoglicêmicos no início do estudo (48). Também foi relatada uma correlação positiva entre os níveis de DPP4 e a resistência à insulina, bem como elevados níveis séricos de DPP4 em indivíduos obesos quando comparados à indivíduos de peso normal (18). No entanto, a literatura não é homogênea nesse ponto, uma vez que alguns pesquisadores também reportaram níveis e/ou atividade de DPP4 reduzidas em pacientes com DM2 (13-15,49).

Diversos polimorfismos foram descritos no gene codificador da DPP4, e alguns estudos investigaram o impacto de suas variantes sobre parâmetros fisiológicos e a sua associação com doenças (23). Nesse sentido, Ahmed e colaboradores encontraram polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) do gene *DPP4* não apenas associados ao DM2, mas também aos níveis séricos de DPP4 em indivíduos da Malásia (16), e um estudo recente sugeriu que os alelos isolados de dois SNPs de *DPP4* poderiam ser marcadores genéticos protetores contra a resistência à insulina (IR) e hiperinsulinemia (50). Em linha, o polimorfismo rs6741949, localizado no íntron 2 do gene *DPP4*, demonstrou interagir com a adiposidade corporal e afetar negativamente os níveis de GLP-1 estimulados pela glicose, a secreção de insulina e a tolerância à glicose (51). Por outro lado, há achados contraditórios quanto à associação das variantes do polimorfismo rs2268894, que fica na região 3' não traduzida de *DPP4*, com a atividade da enzima (52,53). Em suma, um corpo de

evidências implica variações alélicas de DPP4 com a expressão ou atividade de seu produto, e poucos estudos investigaram a interação entre variações neste gene e DM2 em idosos (9).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Verificar a associação de haplótipo constituído por dois polimorfismos de nucleotídeo único comuns (rs2268894 e rs6741949) em regiões não codificantes do gene *DPP4* com diabetes mellitus tipo 2 e variáveis relacionadas à glicemia de jejum em uma amostra de idosos brasileiros, levando em consideração os níveis séricos e a atividade enzimática da dipeptidil peptidase 4.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o perfil clínico e bioquímico dos idosos participantes do estudo.
- Caracterizar os haplótipos dos idosos constituídos pelos polimorfismos de nucleotídeo único rs2268894 e rs6741949 do gene *DPP4*.
- Mensurar os níveis séricos e a atividade enzimática de DPP4 nos idosos.
- Relacionar os haplótipos de *DPP4* com o diabetes mellitus tipo 2, a atividade e os níveis séricos da enzima e variáveis glicêmicas.

4 MÉTODOS

4.1 AMOSTRA

A amostra do estudo incluiu 800 pacientes não institucionalizados e não aparentados com 60 anos ou mais, recrutados em dois ambulatórios de geriatria de universidades localizadas no Distrito Federal, Brasil, a saber: Serviço Geriátrico do Hospital da Universidade Católica de Brasília (HUCB) e o Centro Multidisciplinar do Idoso do Hospital Universitário de Brasília (HUB). O critério de inclusão foi a busca espontânea por atendimento primário ou secundário para eventos circulatórios. Com base na natureza do estudo, os critérios de exclusão incluíram terapia para DM2 com inibidor de DPP4 ou insulina, condição inflamatória ativa e/ou infecciosa, neoplasia de qualquer tipo (atual ou dentro dos últimos 2 anos) e disfunção renal significativa (*clearance* de creatinina $< 25 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1} \cdot (1,73 \text{ m}^2)^{-1}$). Não foi realizada busca ativa de pacientes com qualquer condição específica.

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília (UnB, 24943719.8.0000.5558) e registrado no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen, acesso A407626). Todos os participantes assinaram um termo de consentimento antes do início da coleta de dados.

4.2 AVALIAÇÃO CLÍNICA

A avaliação clínica dos pacientes foi realizada em ambos os ambulatórios seguindo um protocolo padronizado. Os valores da pressão arterial sistólica e diastólica foram medidos de acordo com as recomendações atuais das Diretrizes Brasileiras de Hipertensão (54). A hipertensão arterial sistêmica (HAS) foi definida por pressão arterial sistólica (PAS) ≥ 130 mmHg, pressão arterial diastólica (PAD) ≥ 85 mmHg ou uso de anti-hipertensivo relatado durante entrevista clínica. O diagnóstico de diabetes tipo 2 foi determinado pela presença de um dos três critérios a seguir:

hemoglobina glicada tipo A1c (HbA1c) $\geq 6,5\%$, glicemia de jejum ≥ 126 mg/dL ou uso de medicamento(s) antidiabético(s) (35). O índice de massa corporal (IMC, em kg/m²) e a circunferência da cintura (CC, em cm) foram avaliados com os pacientes com roupas leves e sem sapatos, com a altura medida com estadiômetro fixado na parede.

4.3 ANÁLISES BIOQUÍMICAS

Amostras biológicas foram coletadas do sangue periférico dos pacientes cadastrados em jejum de 8h até 12h, sendo o soro coletado e processado de acordo com protocolos analíticos de rotina laboratorial, com armazenamento a -20°C para análises posteriores. Os ensaios bioquímicos incluíram a determinação de glicose no sangue, Hb1Ac, insulina, proteína C-reativa (PC-R), creatinina e hormônio estimulante da tireóide (TSH). Os testes foram realizados segundo análises clínicas de rotina com reagentes da Boehringer Mannheim (Alemanha), e processados em equipamento AutoHumalyzer (Human GMBH, Alemanha) ou nefelômetro (DadeBehring, Alemanha). O *clearance* de creatinina foi determinado com a equação de Cockcroft-Gault enquanto o modelo de avaliação da homeostase da resistência à insulina (HOMA-IR) foi calculado como $\text{insulina de jejum} \times \text{glicemia de jejum} \div 22,5$.

4.4 GENOTIPAGEM E CONSTRUÇÃO DE HAPLÓTIPOS DE *DPP4*

O DNA genômico total foi obtido com o QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Brasil), de acordo com as recomendações do fabricante. As reações de genotipagem foram realizadas usando ensaios específicos TaqMan[®] de PCR em tempo real (qPCR) para os SNPs rs2268894 (T/C) e rs6741949 (C/G) do gene *DPP4* com um reagente master mix universal, todos da Thermo Fisher[®] (Massachusetts, EUA). As configurações para qPCR começaram com 50°C por 2 minutos e 95°C por 10 minutos, seguidos por condições de ciclagem de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto por 45 rodadas, usando o QuantStudio 3 Real-Time PCR System (Thermo Fisher[®], Massachusetts, EUA).

As forças do desequilíbrio de ligação (DL) entre os SNPs de *DPP4* foram determinadas usando o software Haploview, versão 4.2 (55), e os haplótipos foram derivados das frequências genotípicas entre os indivíduos.

4.5 NÍVEIS SÉRICOS E ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE DPP4

A DPP4 circulante total foi avaliada por um ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) específico (R&D Systems – DuoSet, lote P185646), usando uma diluição de 1:1 (1 parte de soro para 1 parte de solução salina) como amostra e realizado de acordo com as instruções do fabricante.

A atividade enzimática de DPP4 no soro foi determinada como a taxa de clivagem de 7-amino-4-metilcumarina (AMC) do substrato fluorogênico Glicil-Prolil-AMC (Gly-Pro-AMC, Sigma) em uma microplaca de 96 poços em espectrofluorímetro SpectraMax[®] M5 ROM v3.0.22, Molecular Devices, com excitação de 360 nm e emissão de 460 nm por 15 minutos e em duplicata. A taxa de fluorescência liberada foi calculada por minuto (U/min). Foi feita a padronização do teste com uma diluição seriada de amostra de soro a partir de 20 µL. Todas as reações enzimáticas foram realizadas com 10 µL de amostra de soro em tampão de atividade (HEPES 25 mM, pH 7,5) na presença de 20 µM do substrato em um volume final de 100 µL (56). Para confirmar a especificidade desse ensaio para determinar a atividade de DPP4, um inibidor de DPP4 altamente seletivo (sitagliptina; Sigma) foi adicionado a algumas amostras de soro antes de proceder à hidrólise do substrato fluorogênico, em triplicata, com sitagliptina a uma concentração final de 1 µM.

4.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As variáveis são apresentadas como média \pm desvio padrão ou mediana e intervalo interquartil de acordo com o perfil de distribuição dos dados avaliados pelo teste de Kolmogorov-Smirnov e gráficos de probabilidade normal. O teste *t* de Student ou ANOVA unidirecional foram usados para dados paramétricos, enquanto Mann-

Whitney ou Kruskal-Wallis foram usados para características não paramétricas. O teste do qui-quadrado foi usado para comparar proporções entre os grupos. Um modelo de regressão linear foi usado para testar até que ponto os haplótipos de *DPP4* estavam associados ao DM2, com o haplótipo sendo analisado como característica contínua ao representar sua presença como 0, 1 ou 2.

O poder do estudo foi calculado para detectar uma mudança líquida mínima de 0,4% nos níveis de HbA1c. Considerando que o desvio padrão global da variável foi na ordem de 1,2%, a diferença padronizada foi de 0,3. Assim, eram necessários 600 participantes para detectar tal diferença, com poder de 80%. Valores de $P \leq 0,05$ nos testes de hipóteses bilaterais foram considerados estatisticamente significantes. Todas as análises estatísticas foram realizadas usando o Pacote Estatístico para Ciências Sociais (SPSS) para Windows versão 18.0.

5 RESULTADOS

Neste estudo, foram determinados aspectos clínicos, bioquímicos, antropométricos e genômicos de uma amostra de 800 pacientes ambulatoriais atendidos em unidades de saúde geriátricas. O diabetes mellitus tipo 2 foi identificado em 172 indivíduos (21,5%) da população estudada, dos quais 97 (56,4%) estavam em uso de farmacoterapia antidiabética, sendo a metformina a droga mais prevalente. No geral, as análises inferenciais revelaram uma amostra de idosos com um padrão bastante homogêneo de características sociodemográficas e clínicas que não diferiram significativamente entre portadores e não portadores de DM2, principalmente no que diz respeito à idade, sexo e pressão arterial.

Por outro lado, maiores escores de adiposidade corporal (expressos pelo maior IMC e circunferência da cintura) e níveis aumentados de PC-R foram explícitos entre os pacientes com alteração da homeostase glicêmica (Tabela 1). Em suma, independentemente do diagnóstico de diabetes, houve alta prevalência de distúrbios metabólicos em toda a amostra, ilustrada, por exemplo, pelos valores médios ligeiramente suprafisiológicos da pressão arterial sistólica e do IMC (57).

A avaliação dos haplótipos dos sítios polimórficos de *DPP4* revelou que os SNPs investigados estavam em desequilíbrio de ligação moderado nesta amostra ($r^2 = 0,478$; $D' = 0,827$). Cada genótipo individual foi encontrado em equilíbrio de Hardy-Weinberg ($P > 0,05$) e a apresentação dos haplótipos é ordenada de acordo com sua localização genômica (rs2268894-rs6741949) no *locus*. O haplótipo mais comum em toda a amostra consistiu no T-rs2268894/G-rs6741949 (49,9%), enquanto os demais haplótipos identificados na amostra foram C/C (34,4%), C/G (12,2%) e T/C (3,5%). O haplótipo principal (T/G) foi 20% mais frequente em indivíduos não diabéticos quando comparados com os diabéticos (Tabela 1, $P = 0,004$). Uma análise de regressão linear sugere que este haplótipo apresenta uma relação consistente com o DM2 por mostrar que a ocorrência de qualquer outro haplótipo juntamente com idade e circunferência de cintura elevadas representou cerca de metade (~50%) da chance de diagnóstico de diabetes ($\beta = 0,32$, $P = 0,001$).

É importante ressaltar que a atividade sérica de DPP4 foi significativamente menor em diabéticos em comparação com indivíduos não diabéticos ($P = 0,015$), enquanto os níveis circulantes totais de DPP4 não diferiram entre os grupos ($P =$

0,072). Quanto à avaliação da especificidade do ensaio para medir a atividade de DPP4 no soro dos pacientes, uma inibição média de 94,3 % da atividade enzimática foi observada nas amostras de soro com o inibidor sitagliptina a 1 μ M; portanto, o ensaio foi considerado apropriado.

Dado que os níveis de expressão e atividade de DPP4 variam muito de acordo com a adiposidade e os níveis de resistência à insulina, os pacientes foram considerados separadamente de acordo com a presença ou ausência de DM2 (grupos que diferem significativamente na CC e no IMC) a fim de explorar uma possível influência da zigosidade do haplótipo T/G nas variáveis relacionadas à glicemia em cada um desses cenários (Tabela 2). Entre os pacientes euglicêmicos, não diabéticos, portadores do haplótipo principal de DPP4 apresentaram níveis significativamente mais baixos de glicose no sangue ($P = 0,003$), insulina ($P = 0,034$) e índice HOMA-IR ($P = 0,007$), enquanto a atividade de DPP4 ($P = 0,046$) foi muito reduzida. Um efeito notavelmente nulo foi observado entre os pacientes diabéticos, nos quais escores glicêmicos pareceram não ser afetados pelas variantes alélicas, enquanto os níveis de DPP4 foram significativamente afetados por haplótipos ($P = 0,015$).

Tabela 1 - Comparação de características clínicas e da bioquímica em jejum entre indivíduos não diabéticos e diabéticos

Variável	Não DM2 (n = 628)	DM2 (n = 172)	Valor de P
Idade, anos	73,8 ± 9,2	74,8 ± 9,1	0,206
CC, cm	92,4 ± 11,8	97,4 ± 9,8	< 0,001
Sexo, % masculino	33,0	32,6	0,920
IMC, kg.m ⁻²	26,6 ± 4,6	28,1 ± 4,6	< 0,001
PAS, mm Hg	140,6 ± 23,3	142,9 ± 22,8	0,279
PAD, mm Hg	80,1 ± 13,3	79,8 ± 12,2	0,819
HAS, % com	77,4	90,3	< 0,001
Uso de AHT, % com	48,4	64,5	< 0,001
Clearance de creatinina (ml.min ⁻¹)	61,5 ± 24,0	65,7 ± 26,3	0,106
TSH, mIU.l ⁻¹	2,1 [1,3; 3,4]	1,9 [1,5; 3,3]	0,603
PC-R, mg.dl ⁻¹	1,2 [0,5; 2,6]	1,6 [0,9; 4,0]	0,027
HbA1c, %	5,6 ± 0,6	6,9 ± 1,8	< 0,001
Glicose, mg.dl ⁻¹	95,6 ± 13,5	138,5 ± 54,1	< 0,001
Insulina, mUI.l ⁻¹	6,6 [4,1; 10,4]	10,2 [6,6; 16,6]	< 0,001
HOMA-IR, índice	1,5 [0,9; 2,5]	3,5 [1,9; 5,3]	< 0,001
Uso de ADB, % com	-	56,4	-
Nível de DPP4, ng/ml	2,4 [1,1; 4,4]	2,7 [1,4; 3,9]	0,072
Atividade de DPP4, 10 ² U/min	2,4 [1,5; 3,8]	2,0 [1,2; 3,3]	0,015
Haplótipo T/G de <i>DPP4</i> , % com	78,6	65,3	0,004

Dados expressos como média ± desvio padrão, proporção dentro do grupo (%) ou mediana [intervalo interquartil]. ADB: antidiabético; AHT: anti-hipertensivo; CC: circunferência de cintura; DM2: diabetes mellitus tipo 2; DPP4: dipeptidil peptidase 4; HAS: hipertensão arterial sistêmica; HbA1c: hemoglobina glicada tipo A1c; HOMA-IR: modelo de avaliação da homeostase da resistência à insulina; IMC: índice de massa corporal; PAD: pressão arterial diastólica; PAS: pressão arterial sistólica; PCR: proteína C-reativa; TSH: hormônio estimulante da tireoide. Limite de significância definido em $P \leq 0,05$.

Tabela 2 – Análise das variáveis relacionadas à glicemia em jejum na amostra de acordo com a condição clínica dos indivíduos e os haplótipos

Condição	Variável	Grupos haplotípicos			Valor de P
		T/G – T/G	T/G - outro	outro – outro	
	n	179	300	149	-
Não DM2	HbA1c, %	5,5 ± 0,6	5,7 ± 0,5	5,9 ± 0,5	0,053
	Glicose, mg.dl ⁻¹	93,7 ± 11,7	95,2 ± 11,8	98,6 ± 17,5	0,003
	Insulina, mUI.l ⁻¹	6,2 [3,9, 9,1]	6,5 [4,0, 10,3]	8,0 [4,8, 13,0]	0,034
	HOMA-IR, índice	1,3 [0,9, 2,3]	1,5 [1,9, 2,4]	1,9 [1,1, 3,8]	0,007
	Nível de DPP4, ng/ml	2,3 [1,2, 4,0]	2,4 [1,1, 4,4]	2,5 [1,2, 4,7]	0,808
	Atividade de DPP4, 10 ² U/min	215,0 [140,0, 360,0]	230,0 [155,0, 370,0]	260,0 [165,0, 402,5]	0,046
	n	30	81	61	
DM2	HbA1c, %	6,7 ± 2,3	6,8 ± 1,6	7,0 ± 1,7	0,734
	Glicose, mg.dl ⁻¹	131,7 ± 42,2	136,5 ± 58,1	145,1 ± 54,9	0,492
	Insulina, mUI.l ⁻¹	7,2 [2,9; 14,9]	10,4 [6,2; 16,5]	9,7 [7,4, 19,8]	0,154
	HOMA-IR, índice	2,2 [1,2; 4,0]	3,7 [1,9; 5,5]	3,5 [1,8, 5,7]	0,095
	Nível de DPP4, ng/ml	2,3 [1,5; 3,5]	2,6 [1,2; 3,1]	3,4 [1,8, 6,2]	0,015
	Atividade de DPP4, 10 ² U/min	215,0 [132,5; 297,5]	175,0 [125,0; 285,0]	210,0 [138,8, 395,0]	0,285

Dados expressos como média ± desvio padrão ou mediana [intervalo interquartil]. DM2: diabetes mellitus tipo 2; DPP4: dipeptidil peptidase 4; HbA1c: hemoglobina glicada tipo A1c; HOMA-IR: modelo de avaliação da homeostase da resistência à insulina.

6 DISCUSSÃO

O diabetes mellitus tipo 2 é determinado por uma interação complexa entre genética e ambiente (3), e variações genéticas comuns têm sido relacionadas a distúrbios no metabolismo da glicose e à patogênese do DM2 (32,58). Nesse sentido, variações de interesse também podem ser encontradas no gene da DPP4, proteína-chave na homeostase da glicose (59), mas a literatura a respeito da sua associação com o DM2 e características glicêmicas permanece inconclusiva (9,16).

Uma vez que SNPs combinados em haplótipos tendem a ser mais informativos do que variações individuais (60), optamos por investigar haplótipos de *DPP4* constituídos pelos alelos de rs2268894 e rs6741949 com base na suposição de que SNPs localizados nos extremos do *locus* e em desequilíbrio de ligação moderado atuam como marcadores para representar outros genótipos funcionais localizados ao longo do gene para fins epidemiológicos.

Em uma análise da amostra como um todo, os pacientes diabéticos do nosso estudo apresentaram atividade de DPP4 reduzida em comparação com os não diabéticos, independentemente de terem adiposidade corporal e escores de PC-R mais elevados, e apesar da tendência de níveis de DPP4 maiores entre os diabéticos. Nesse sentido, alguns autores também encontraram atividade de DPP4 significativamente menor em indivíduos com DM2, o que é sugestivo de uma resposta adaptativa do organismo diabético ao estado de responsividade à insulina prejudicada e a favor de uma atividade aumentada dos hormônios enteroinsulares (13,52,61). Esses achados também podem ser decorrentes do uso de medicamentos como metformina e glitazonas por pelo menos parte dos pacientes diabéticos, os quais podem promover diminuição da atividade da DPP4 por mecanismos ainda desconhecidos (7,12,62). Mais consistentemente, o haplótipo T/G mostrou-se mais frequente em indivíduos não diabéticos, possivelmente como fator de proteção contra o aparecimento de DM2.

Em consonância com tudo acima, nossos resultados mostraram que a influência dos haplótipos de *DPP4* nos escores glicêmicos foi sensível ao contexto, de acordo com a presença ou ausência de DM2 (incidentalmente combinado com adiposidade), e que o haplótipo T/G foi associado com melhores escores glicêmicos

em pacientes normoglicêmicos. Nesse cenário desprovido de condição metabólica importante e da influência de agentes que atuam na glicemia, a constatação de que os não portadores de T/G apresentam níveis elevados de insulina mesmo exibindo atividade aumentada de DPP4 não surpreende. A atividade enzimática de DPP4 correlaciona-se com sua estrutura quaternária e a sua estrutura dimérica é essencial para uma atividade catalítica ótima (9,63). É possível que isoformas não-T/G homodimerizem de forma mais eficiente, produzindo uma enzima mais ativa (12,64) que prejudica a(s) via(s) dependente(s) de incretina e promove o efeito insulínico por (uma) via(s) alternativa(s) mas menos efetiva(s). Os níveis de insulina podem não derivar das incretinas, uma vez que macronutrientes (especialmente aminoácidos e ácidos graxos) e outros hormônios pancreáticos produzidos pelas células α (por exemplo: peptídeos derivados do proglucagon) potencializam a secreção de insulina ativada por um aumento pós-prandial nas concentrações de glicose (65).

Até onde sabemos, este é o primeiro trabalho a avaliar os polimorfismos rs2268894 e rs6741949 de *DPP4* agrupados em haplótipos, mas outros estudos verificaram a repercussão desses SNPs individualmente. Em linha com nossos resultados, descobriu-se que o alelo C do SNP rs6741949 estava associado com elevados níveis de glicose em jejum em indivíduos com risco aumentado para DM2, sem diferença detectada nos níveis circulantes de DPP4 de acordo com os genótipos (atividade de DPP4 não foi avaliada) (51).

Em um contexto de DM2, elevados níveis circulantes de DPP4 já foram relatados (9,19), possivelmente secundários a um aumento da liberação de DPP4 de adipócitos e células mononucleares do sangue periférico (62). De acordo com nossos resultados, isso parece ser um fenômeno dependente dos haplótipos, uma vez que apenas os não portadores de T/G apresentaram níveis aumentados de DPP4. Um estudo anterior demonstrou que o tratamento com metformina reduziu consistentemente os níveis da proteína DPP4 circulante em humanos com DM2 e doenças cardiovasculares, mas é incerto se essa redução ocorre devido à modulação da síntese/liberação de DPP4 em tecidos específicos ou devido a um aumento de sua depuração (62). Portanto, também é possível que a metformina prejudique a liberação de DPP4 apenas nos portadores de T/G. Ainda assim, os níveis de DPP4 não impactaram a atividade da enzima ou as características glicêmicas, possivelmente devido à já mencionada influência farmacológica em usuários de antidiabéticos. Para

ilustrar a heterogeneidade na literatura, outro estudo mostrou que os genótipos do rs2268894 não foram significativamente associados à atividade ou à concentração de DPP4 em uma amostra de indivíduos com DM2 ou hipertensão e indivíduos saudáveis considerados em conjunto (52).

O mecanismo por trás da associação do haplótipo de *DPP4* aqui avaliado com variáveis relacionadas à glicemia (assim como níveis e atividade enzimática) ainda não está definido, uma vez que ambos os SNPs estão em regiões não codificantes do gene. O impacto funcional de variantes não codificantes é difícil de prever (66) e é mais provável que elas influenciem a expressão gênica ou a estabilidade, tradução, localização e acesso a reguladores do RNAm do que a função enzimática da proteína (51,67). Alterações desses mecanismos regulatórios são conhecidas por modificar vias moleculares e processos celulares, potencialmente provocando alterações fisiológicas e levando a processos de doença (67). No entanto, a hipótese de que o haplótipo T/G está em desequilíbrio de ligação com polimorfismos funcionais no *locus DPP4* ou sequências vizinhas é mais provável do que um efeito direto do mesmo. Mais estudos são necessários para identificar esses genótipos funcionais ligados.

Entre as limitações do estudo, heterogeneidades não consideradas (ex.: mistura genética) e interação gene-ambiente (ex.: nutrição e estilo de vida) podem ser, pelo menos em parte, responsáveis pelas inconsistências observadas aqui e na literatura (24). Apesar do efeito do exercício e da dieta no perfil glicêmico e no DM2, o estudo não avaliou os níveis de aptidão física e o padrão alimentar dos indivíduos. Também, marcadores de função hepática não foram avaliados, apesar de doenças hepáticas já terem sido implicadas com níveis e atividade de DPP4 alterados (14). Além disso, os níveis séricos de substratos ativos de DPP4 não foram medidos e os possíveis efeitos de medicamentos nas características glicêmicas e nos níveis e atividade de DPP4 não foram controlados em nossas análises.

7 CONCLUSÃO

Nossos resultados corroboram que a arquitetura genética da dipeptidil peptidase 4 afeta o perfil glicêmico, os níveis séricos e a atividade de DPP4 em idosos de forma sensível ao contexto, de acordo com a presença ou ausência de diabetes mellitus tipo 2. Além disso, o haplótipo T/G figurou como protetor contra o desenvolvimento de DM2 não apenas pela sua menor frequência entre os indivíduos diabéticos, mas também por favorecer os escores glicêmicos em não diabéticos, possivelmente por preservar o sistema de incretinas e, conseqüentemente, a secreção de insulina por essa via. Dado que a DPP4 é uma proteína multifuncional e ubiquitária com importância em inúmeros processos fisiológicos, sugerimos mais estudos com investigações funcionais para identificar o impacto fisiológico das variações alélicas da DPP4 consideradas à luz dos fatores ambientais com os quais interagem.

REFERÊNCIAS

1. World Health Organization (WHO). *Integrated care for older people: guidelines on community-level interventions to manage declines in intrinsic capacity*. Geneva: World Health Organization; 2017.
2. Bellary S, Kyrou I, Brown JE, Bailey CJ. Type 2 diabetes mellitus in older adults: clinical considerations and management. *Nat Rev Endocrinol* 2021; 17: 534–548.
3. Galicia-Garcia U, Benito-Vicente A, Jebari S, Larrea-Sebal A, Siddiqi H, Uribe KB, et al. Pathophysiology of Type 2 Diabetes Mellitus. *Int J Mol Sci* 2020; 21(17): 6275.
4. Zheng Y, Ley SH, Hu FB. Global aetiology and epidemiology of type 2 diabetes mellitus and its complications. *Nat Rev Endocrinol* 2018; 14(2): 88-98.
5. Nistala R, Savin V. Diabetes, hypertension, and chronic kidney disease progression: role of DPP4. *Am J Physiol Renal Physiol* 2017; 312(4): F661-F670.
6. Lee SA, Kim YR, Yang EJ, Kwon EJ, Kim SH, Kang SH, et al. CD26/DPP4 levels in peripheral blood and T cells in patients with type 2 diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab* 2013; 98(6): 2553-2561.
7. Silva Júnior WS, Godoy-Matos AF, Kraemer-Aguiar LG. Dipeptidyl Peptidase 4: A New Link between Diabetes Mellitus and Atherosclerosis? *Biomed Res Int* 2015; 2015: 816164.
8. Nargis T, Kumar K, Ghosh AR, Sharma A, Rudra D, Sen D, et al. KLK5 induces shedding of DPP4 from circulatory Th17 cells in type 2 diabetes. *Mol Metab* 2017; 6(11): 1529-1539.
9. Röhrborn D, Wronkowitz N, Eckel J. DPP4 in Diabetes. *Front Immunol* 2015; 6: 386.
10. Zou H, Zhu N, Li S. The emerging role of dipeptidyl-peptidase-4 as a therapeutic target in lung disease. *Expert Opin Ther Targets* 2020; 24(2): 147-153.

11. Sarkar J, Nargis T, Tantia O, Ghosh S, Chakrabarti P. Increased Plasma Dipeptidyl Peptidase-4 (DPP4) Activity Is an Obesity-Independent Parameter for Glycemic Deregulation in Type 2 Diabetes Patients. *Front Endocrinol* 2019; 10: 505.
12. Ahmed RH, Huri HZ, Al-Hamodi Z, Salem SD, Muniandy S. Serum Levels of Soluble CD26/Dipeptidyl Peptidase-IV in Type 2 Diabetes Mellitus and Its Association with Metabolic Syndrome and Therapy with Antidiabetic Agents in Malaysian Subjects. *PLoS One* 2015; 10(10): e0140618.
13. McKillop AM, Duffy NA, Lindsay JR, O'Harte FP, Bell PM, Flatt PR. Decreased dipeptidyl peptidase-IV activity and glucagon-like peptide-1(7-36)amide degradation in type 2 diabetic subjects. *Diabetes Res Clin Pract* 2008; 79(1): 79-85.
14. Firneisz G, Varga T, Lengyel G, Fehér J, Ghyczy D, Wichmann B, et al. Serum dipeptidyl peptidase-4 activity in insulin resistant patients with non-alcoholic fatty liver disease: a novel liver disease biomarker. *PLoS One* 2010; 5(8): e12226.
15. Korosi J, McIntosh CHS, Pederson RA, Demuth HU, Habener JF, Gingerich R, et al. Effect of Aging and Diabetes on the Enteroinsular Axis. *J Gerontol A* 2001; 56(9): M575–M579.
16. Ahmed RH, Huri HZ, Al-Hamodi Z, Salem SD, Al-Absi B, Muniandy S. Association of DPP4 Gene Polymorphisms with Type 2 Diabetes Mellitus in Malaysian Subjects. *PLoS One* 2016; 11(4): e0154369.
17. Lamers D, Famulla S, Wronkowitz N, Hartwig S, Lehr S, Ouwens DM, et al. Dipeptidyl peptidase 4 is a novel adipokine potentially linking obesity to the metabolic syndrome. *Diabetes*. 2011; 60(7):1917-1925.
18. Ahmed RH, Huri HZ, Muniandy S, Al-Hamodi Z, Al-Absi B, Alsalahi A, et al. Altered circulating concentrations of active glucagon-like peptide (GLP-1) and dipeptidyl peptidase 4 (DPP4) in obese subjects and their association with insulin resistance. *Clin Biochem* 2017; 50(13-14): 746-749.
19. Anoop S, Misra A, Bhatt SP, Gulati S, Pandey RM, Mahajan H, et al. High circulating plasma dipeptidyl peptidase- 4 levels in non-obese Asian Indians with type 2 diabetes correlate with fasting insulin and LDL-C levels, triceps skinfolds, total intra-

abdominal adipose tissue volume and presence of diabetes: a case–control study. *BMJ Open Diab Res Care* 2017; 5: e000393.

20. Zheng T, Chen B, Yang L, Hu X, Zhang X, Liu H, et al. Association of plasma dipeptidyl peptidase-4 activity with non-alcoholic fatty liver disease in nondiabetic Chinese population. *Metabolism* 2017; 73: 125-134.

21. Aghili N, Devaney JM, Alderman LO, Zukowska Z, Epstein SE, Burnett MS. Polymorphisms in dipeptidyl peptidase IV gene are associated with the risk of myocardial infarction in patients with atherosclerosis. *Neuropeptides*. 2012; 46(6): 367-371.

22. Xing X, Han Y, Zhou X, Zhang B, Li Y, Wang Z, et al. Association between DPP4 gene polymorphism and serum lipid levels in Chinese type 2 diabetes individuals. *Neuropeptides* 2016; 60: 1–6.

23. Posadas-Sánchez R, Sánchez-Muñoz F, Guzmán-Martín CA, Couder AHD, Rojas-Velasco G, Fragoso JM, et al. Dipeptidylpeptidase-4 levels and DPP4 gene polymorphisms in patients with COVID-19. Association with disease and with severity. *Life Sci* 2021; 276: 119410.

24. Staiger H, Schaeffeler E, Schwab M, Häring HU. Pharmacogenetics: Implications for Modern Type 2 Diabetes Therapy. *Rev Diabet Stud* 2015; 12(3-4): 363-376.

25. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), Coordenação de População e Indicadores Sociais (BR). *Indicadores sociodemográficos e de saúde no Brasil: 2009*. Rio de Janeiro: IBGE; 2009.

26. World Health Organization (WHO). *World report on ageing and health*. Geneva: World Health Organization; 2015.

27. Laakso M. Biomarkers for type 2 diabetes. *Mol Metab* 2019; 27: 139-146.

28. Khan MAB, Hashim MJ, King JK, Govender RD, Mustafa H, Al Kaabi J. Epidemiology of Type 2 Diabetes - Global Burden of Disease and Forecasted Trends. *J Epidemiol Glob Health* 2020; 10(1): 107-111.

29. International Diabetes Federation (IDF). *IDF Diabetes Atlas – 8th Edition*; 2017.

30. Sirdah MM, Reading NS. Genetic predisposition in type 2 diabetes: A promising approach toward a personalized management of diabetes. *Clin Genet* 2020; 98: 525–47.
31. Xue A, Wu Y, Zhu Z, Zhang F, Kemper KE, Zheng Z, et al. Genome-wide association analyses identify 143 risk variants and putative regulatory mechanisms for type 2 diabetes. *Nat Commun* 2018; 9: 2941.
32. Scott RA, Scott LJ, Mägi R, Marullo L, Gaulton KJ, Kaakinen M, et al. An Expanded Genome-Wide Association Study of Type 2 Diabetes in Europeans. *Diabetes* 2017; 66(11): 2888-2902.
33. Campbell JE, Newgard CB. Mechanisms controlling pancreatic islet cell function in insulin secretion. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2021; 22: 142–158.
34. Chatterjee S, Khunti K, Davies MJ. Type 2 diabetes. *The Lancet* 2017; 389: 2239–2251.
35. American Diabetes Association, Standards of Medical Care in Diabetes-2021. Chapter 2. Classification and Diagnosis of Diabetes. *Diabetes Care* 2021; 44(S1): S15–S33.
36. Nauck MA, Meier JJ. Incretin hormones: Their role in health and disease. *Diabetes Obes Metab* 2018; 20: 5–21.
37. Proença C, Freitas M, Ribeiro D, Tomé SM, Araújo AN, Silva AMS, et al. The dipeptidyl peptidase-4 inhibitory effect of flavonoids is hindered in protein rich environments. *Food Funct* 2019; 10(9): 5718-5731.
38. Trzaskalski NA, Fadzeyeva E, Mulvihill EE. Dipeptidyl Peptidase-4 at the Interface Between Inflammation and Metabolism. *Clin Med Insights Endocrinol Diabetes* 2020; 13: 1-10.
39. Deacon CF, Johnsen AH, Holst JJ. Degradation of glucagon-like peptide-1 by human plasma in vitro yields an N-terminally truncated peptide that is a major endogenous metabolite in vivo. *J Clin Endocrinol Metab* 1995; 80(3): 952–957.
40. Deacon CF, Danielsen P, Klarskov L, Olesen M, Holst JJ. Dipeptidyl peptidase IV inhibition reduces the degradation and clearance of GIP and potentiates its

insulinotropic and antihyperglycemic effects in anesthetized pigs. *Diabetes* 2001; 50(7): 1588–1597.

41. Gupta S, Sen U. More than just an enzyme: Dipeptidyl peptidase-4 (DPP-4) and its association with diabetic kidney remodelling. *Pharmacol Res* 2019; 147: 104391.

42. Leibowitz G, Cahn A, Bhatt DL, Hirshberg B, Mosenzon O, Jermendy G, et al. Impact of treatment with saxagliptin on glycaemic stability and β -cell function in the SAVOR-TIMI 53 study. *Diabetes Obes Metab* 2015; 17(5): 487-494.

43. Hopsu-Havu VK, Glenner GG. A new dipeptide naphthylamidase hydrolyzing glycyl-prolyl-beta-naphthylamide. *Histochemie* 1966; 7(3): 197–201.

44. Aso Y, Kato K, Sakurai S, Kishi H, Shimizu M, Jojima T, et al. Impact of dapagliflozin, an SGLT2 inhibitor, on serum levels of soluble dipeptidyl peptidase-4 in patients with type 2 diabetes and non-alcoholic fatty liver disease. *Int J Clin Pract* 2019; 73(5): e13335.

45. Baggio LL, Varin EM, Koehler JA, Cao X, Lokhnygina Y, Stevens SR, et al. Plasma levels of DPP4 activity and sDPP4 are dissociated from inflammation in mice and humans. *Nat Commun* 2020; 11(1): 3766.

46. Fadini GP, Albiero M, Menegazzo L, de Kreutzenberg SV, Avogaro A. The increased dipeptidyl peptidase-4 activity is not counteracted by optimized glucose control in type 2 diabetes, but is lower in metformin-treated patients. *Diabetes Obes Metab* 2012; 14: 518–522.

47. Yang F, Zheng T, Gao Y, Baskota A, Chen T, Ran X, et al. Increased Plasma DPP4 Activity Is an Independent Predictor of the Onset of Metabolic Syndrome in Chinese over 4 Years: Result from the China National Diabetes and Metabolic Disorders Study. *PLoS One* 2014; 9: e92222.

48. Zheng T, Gao Y, Baskota A, Chen T, Ran X, Tian H. Increased plasma DPP4 activity is predictive of prediabetes and type 2 diabetes onset in Chinese over a four-year period: result from the China National Diabetes and Metabolic Disorders Study. *J Clin Endocrinol Metab* 2014; 99(11): E2330-E2334.

49. Meneilly GS, Demuth H-U, McIntosh CHS, Pederson RA. Effect of ageing and diabetes on glucose-dependent insulinotropic polypeptide and dipeptidyl peptidase IV responses to oral glucose. *Diabet Med* 2000; 17: 346–350.
50. Vargas-Alarcón G, González-Salazar MC, Vázquez-Vázquez C, Couder AHD, Sánchez-Muñoz F, Reyes-Barrera J, et al. The rs12617336 and rs17574 Dipeptidyl Peptidase-4 Polymorphisms Are Associated With Hypoalbuminemia and Dipeptidyl Peptidase-4 Serum Levels: A Case-Control Study of the Genetics of Atherosclerotic Disease (GEA) Cohort. *Front Genet* 2021; 12: 592646.
51. Böhm A, Wagner R, Machicao F, Holst JJ, Gallwitz B, Stefan N, et al. DPP4 gene variation affects GLP-1 secretion, insulin secretion, and glucose tolerance in humans with high body adiposity. *PLoS One* 2017; 12(7): e0181880.
52. Wilson JR, Shuey MM, Brown NJ, Devin JK. Hypertension and Type 2 Diabetes Are Associated With Decreased Inhibition of Dipeptidyl Peptidase-4 by Sitagliptin. *J Endocr Soc* 2017; 1(9): 1168-1178.
53. Woodard-Grice AV. Genotypic variation in DPP4 modulates sensitivity to pharmacologic DPPIV inhibition. *FASEB J* 2010; 24(1).
54. Barroso WKS, Rodrigues CIS, Bortolotto LA, Mota-Gomes MA, Brandão AA, Feitosa ADM, et al. Brazilian Guidelines of Hypertension – 2020. *Arq Bras Cardiol* 2021; 116(3): 516-658.
55. Barrett JC, Fry B, Maller J, Daly MJ. Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics* 2005; 21: 263–265.
56. Garreto L, Charneau S, Mandacaru SC, Nóbrega OT, Motta FN, Araújo CN, et al. Mapping Salivary Proteases in Sjögren's Syndrome Patients Reveals Overexpression of Dipeptidyl Peptidase-4/CD26. *Front Immunol* 2021; 12: 686480.
57. World Health Organization (WHO). *Physical status: the use and interpretation of anthropometry*. Geneva: World Health Organization; 1995.
58. Scott RA, Lagou V, Welch RP, Wheeler E, Montasser ME, Luan J, et al. Large-scale association analyses identify new loci influencing glycemic traits and provide insight into the underlying biological pathways. *Nat Genet* 2012; 44(9): 991-1005.

59. Deacon CF. Physiology and Pharmacology of DPP-4 in Glucose Homeostasis and the Treatment of Type 2 Diabetes. *Front Endocrinol* 2019; 10: 80.
60. Thompson D, Stram D, Goldgar D, Witte JS. Haplotype tagging single nucleotide polymorphisms and association studies. *Hum Hered* 2003; 56(1-3): 48-55.
61. Meneilly GS, Demuth HU, McIntosh CHS, Pederson RA. Effect of ageing and diabetes on glucosedependent insulinotropic polypeptide and dipeptidyl peptidase IV responses to oral glucose. *Diab Med* 2000; 17: 346–350.
62. Baggio LL, Varin EM, Koehler JA, Cao X, Lokhnygina Y, Stevens SR, et al. Plasma levels of DPP4 activity and sDPP4 are dissociated from inflammation in mice and humans. *Nat Commun* 2020; 11(1): 3766.
63. Chien CH, Tsai CH, Lin CH, Chou CY, Chen X. Identification of hydrophobic residues critical for DPP-IV dimerization. *Biochemistry* 2006; 45(23): 7006-7012.
64. Nistala R, Savin V. Diabetes, hypertension, and chronic kidney disease progression: role of DPP4. *Am J Physiol Renal Physiol* 2017; 312(4): F661-F670.
65. Campbell JE, Newgard CB. Mechanisms controlling pancreatic islet cell function in insulin secretion. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2021; 22(2): 142-158.
66. Bocher O, Génin E. Rare variant association testing in the non-coding genome. *Hum Genet* 2020; 139(11): 1345-1362.
67. Steri M, Idda ML, Whalen MB, Orrù V. Genetic variants in mRNA untranslated regions. *Wiley Interdiscip Rev RNA* 2018; 9(4): e1474.

APÊNDICE A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO



Termo de Consentimento

O(A) senhor(a) está sendo convidado(a) a participar de um projeto em que nós, do Hospital Universitário de Brasília (HUB/UnB), buscamos por sinais clínicos e de laboratório que permitam identificar o desenvolvimento de doenças associadas ao envelhecimento, sobretudo aquelas doenças relacionadas a problemas importantes para saúde da pessoa idosa, como o diabetes por exemplo.

O objetivo desta pesquisa consiste em quantificar moléculas presentes no sangue, denominadas dipeptidil peptidase 4 (DPP4), com vistas a avaliar se poderão ajudar no diagnóstico precoce do diabetes mellitus do tipo 2. O(A) senhor(a) receberá todos os esclarecimentos necessários antes e no decorrer da pesquisa e lhe asseguramos que seu nome não aparecerá, sendo mantido o mais rigoroso sigilo através da omissão total de quaisquer informações que poderiam identificá-lo.

A sua participação será através de uma avaliação médica (com exame físico e entrevista para obtenção de informações) assim como por testes laboratoriais que não oferecerão riscos à sua saúde, pois consistirão em uma única coleta de um pequeno volume (20 mililitros) de sangue, onde será a assegurada utilização de agulhas descartáveis. Poderá ser solicitado que o(a) senhor(a) forneça pequena amostra de urina (cerca de 10 ml), colhida por ocasião da própria consulta médica. É assegurado que o(a) senhor(a) não realizará movimentos anormais, não terá mudança de rotina, não entrará em contato com quaisquer substâncias nocivas, nem terá qualquer instrumento introduzido em meu corpo, salvo pela agulha descartável para coleta do sangue. As visitas clínicas ocorrerão em datas a se combinar, conforme sua disponibilidade, com um tempo total estimado para os procedimentos de não mais que 100 minutos (cerca de 1 hora e meia) para sua realização: consulta médica e coleta de sangue. Informamos que o(a) senhor(a) pode se recusar a responder qualquer questão que lhe traga constrangimento ou a participar de qualquer procedimento, podendo inclusive desistir de participar da pesquisa em qualquer momento, sem nenhum prejuízo para o(a) senhor(a). Sua participação é voluntária, isto é, não há pagamento por sua colaboração.

Os resultados da pesquisa serão divulgados pela Universidade de Brasília podendo ser publicados posteriormente. Os dados e materiais utilizados na pesquisa ficarão sob a guarda do pesquisador por um período de no mínimo cinco anos, após isso serão destruídos ou mantidos na instituição. Se o(a) senhor(a) tiver qualquer dúvida em relação à pesquisa, por favor, entre em contato conosco a qualquer momento que necessitar.

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília. As dúvidas com relação à assinatura do TCLE ou os direitos do sujeito da pesquisa podem ser obtidos através do telefone: (61) 3107-1918 ou do e-mail cepfm@unb.br.

Este documento foi elaborado em duas vias, uma ficará com o pesquisador responsável e a outra com o sujeito da pesquisa.

Assinatura: _____

Nome do Paciente:

Assinatura: _____

Nome do Pesquisador Responsável:

Brasília, ____ de _____ de _____

ANEXO A – COMPROVANTE DE APROVAÇÃO EM COMITÊ DE ÉTICA

UNB - FACULDADE DE
MEDICINA DA UNIVERSIDADE
DE BRASÍLIA



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Variabilidade alélica e atividade sérica de dipeptidil peptidase IV em idosos portadores ou não de diabetes mellitus tipo 2

Pesquisador: Otávio de Toledo Nóbrega

Área Temática: Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP);

Versão: 2

CAAE: 24943719.8.0000.5558

Instituição Proponente: Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília - UNB

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.816.812

Apresentação do Projeto:

Trata-se de estudo analítico transversal a ser realizado no Centro Multidisciplinar do Idoso - CMI/UnB. Os pesquisadores propõe recrutar 500 participantes com idade acima de 60 anos, que responderão a questionário e serão submetidos a testes clínicos e laboratoriais, com armazenamento de amostras de soro e sangue em congelador -80 graus Celsius para análises posteriores.

Objetivo da Pesquisa:

Segundo os pesquisadores, o objetivo primário do estudo é "investigar a possível relação de polimorfismos gênicos da DPP IV e dos níveis séricos de atividade total da referida enzima com a ocorrência ou não do diabetes mellitus do tipo 2 em pacientes geriátricos residentes em comunidade". Os objetivos secundários são "investigar a associação dos níveis de atividade e dos polimorfismos de DPP IV com o perfil metabólico (sobretudo glicêmico), com a aptidão funcional aferida por testes físicos e com doença aterosclerótica nas artérias carótidas de indivíduos idosos diabéticos e não-diabéticos, em cenário clínico e experimental".

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os pesquisadores abordaram adequadamente os riscos associados a punção venosa, que serão minimizados seguindo um protocolo de coleta realizada em ambiente hospitalar por profissional

Endereço: Universidade de Brasília, Campus Universitário Darcy Ribeiro - Faculdade de Medicina
Bairro: Asa Norte **CEP:** 70.910-900
UF: DF **Município:** BRASÍLIA
Telefone: (61)3107-1918 **E-mail:** cepfm@unb.br

UNB - FACULDADE DE
MEDICINA DA UNIVERSIDADE
DE BRASÍLIA



Continuação do Parecer: 3.816.812

treinado. Eles abordam também riscos associados aos resultados dos exames genéticos em si, afirmando que "riscos individuais associados aos resultados gerados não existem uma vez que os dados biotecnológicos utilizados neste estudo não se destinam a fins diagnósticos". Há menção a riscos que a pesquisa representa a privacidade dos pacientes, ainda mais importantes por se tratar de pesquisa que envolve a coleta de material e informação genética. Sobre isso, os pesquisadores afirmam que "As informações e materiais biológicos serão armazenados na Universidade de Brasília, em biorepositório específico, para fim exclusivo de pesquisas, com sigilo de identidade, visando evitar a estigmatização ou discriminação de indivíduos ou grupos."

A análise dos benefícios cita exclusivamente: "O presente estudo tem por objetivo produzir conhecimento científico a ser compartilhado e utilizado para o bem-estar da sociedade."

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de estudo com metodologia bem desenhada e descrita, que busca entender fatores de risco associados a diabetes tipo 2 em idosos. A equipe de pesquisadores tem vasta experiência no tema e neste tipo de projeto de pesquisa.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os pesquisadores apresentam TCLE com linguagem adequada. As pendências relativas ao tempo de armazenamento das amostras biológicas e aos direitos do sujeito da pesquisa foram sanadas, com descrição adequada no TCLE.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O colegiado em reunião ordinária dia 29/01/2020 considerou que as pendências levantadas pelo CEP foram sanadas.

Considerações Finais a critério do CEP:

O colegiado em reunião ordinária dia 29/01/2020 considerou que as pendências levantadas pelo CEP foram sanadas.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_P ROJETO_1411952.pdf	11/01/2020 11:00:28		Acelto
Outros	9_Reencaminhamento_CEP_FM.pdf	11/01/2020	Otávio de Toledo	Acelto

Endereço: Universidade de Brasília, Campus Universitário Darcy Ribeiro - Faculdade de Medicina
 Bairro: Asa Norte CEP: 70.910-900
 UF: DF Município: BRASÍLIA
 Telefone: (61)3107-1918 E-mail: cepfm@unb.br

**UNB - FACULDADE DE
MEDICINA DA UNIVERSIDADE
DE BRASÍLIA**



Continuação do Parecer: 3.816.812

Outros	9_Reencaminhamento_CEP_FM.pdf	10:58:58	Nóbrega	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	9_TCLE_vpa.pdf	11/01/2020 10:57:41	Otávio de Toledo Nóbrega	Aceito
Outros	15_CV_Elisa.pdf	23/10/2019 19:10:27	Otávio de Toledo Nóbrega	Aceito
Outros	14_CV_Einstein.pdf	23/10/2019 19:10:00	Otávio de Toledo Nóbrega	Aceito
Outros	13_CV_Claudio.pdf	23/10/2019 19:09:19	Otávio de Toledo Nóbrega	Aceito
Outros	12_CV_Clayton.pdf	23/10/2019 19:07:46	Otávio de Toledo Nóbrega	Aceito
Outros	11_CV_Izabela.pdf	23/10/2019 19:07:20	Otávio de Toledo Nóbrega	Aceito
Outros	10_CV_Otávio.pdf	23/10/2019 19:05:58	Otávio de Toledo Nóbrega	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	4_Proposta.pdf	23/10/2019 19:05:33	Otávio de Toledo Nóbrega	Aceito
Orçamento	7_Orçamento.pdf	23/10/2019 19:04:37	Otávio de Toledo Nóbrega	Aceito
Cronograma	5_Cronograma.pdf	23/10/2019 19:04:05	Otávio de Toledo Nóbrega	Aceito
Outros	8_Termo_Uso_Dados.pdf	22/10/2019 17:09:00	Otávio de Toledo Nóbrega	Aceito
Declaração de Pesquisadores	3_Declaracao_Responsabilidade.pdf	22/10/2019 17:08:13	Otávio de Toledo Nóbrega	Aceito
Outros	0_Termo_ciencia_Instituicao_coparticipante.pdf	22/10/2019 17:06:48	Otávio de Toledo Nóbrega	Aceito
Outros	6_Resumo.pdf	22/10/2019 17:04:48	Otávio de Toledo Nóbrega	Aceito
Declaração de Pesquisadores	2_Carta_encaminhamento.pdf	22/10/2019 17:00:54	Otávio de Toledo Nóbrega	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	0_Termo_concordancia_institucional.pdf	22/10/2019 16:58:07	Otávio de Toledo Nóbrega	Aceito
Folha de Rosto	1_Folha_rosto_assinada.pdf	22/10/2019 16:52:30	Otávio de Toledo Nóbrega	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Endereço: Universidade de Brasília, Campus Universitário Darcy Ribeiro - Faculdade de Medicina
 Bairro: Asa Norte CEP: 70.910-900
 UF: DF Município: BRASÍLIA
 Telefone: (61)3107-1918 E-mail: cepfm@unb.br

UNB - FACULDADE DE
MEDICINA DA UNIVERSIDADE
DE BRASÍLIA



Continuação do Parecer: 3.816.812

BRASÍLIA, 31 de Janeiro de 2020

Assinado por:

Antônio Carlos Rodrigues da Cunha
(Coordenador(a))

Endereço: Universidade de Brasília, Campus Universitário Darcy Ribeiro - Faculdade de Medicina
Bairro: Asa Norte CEP: 70.910-900
UF: DF Município: BRASÍLIA
Telefone: (61)3107-1918 E-mail: cepfm@unb.br