

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

LUIZA CRISTINA GOBOR

ESTUDO DO 1,5 ANDROGLUCITOL E POLIMORFISMOS NOS GENES RAGE,
RANTES, CAT, MMP9 E EGFR EM UMA POPULAÇÃO BRASILEIRA COM
DIABETES

CURITIBA

2018

LUIZA CRISTINA GOBOR

ESTUDO DO 1,5 ANDROGLUCITOL E POLIMORFISMOS NOS GENES RAGE,
RANTES, CAT, MMP9 E EGFR EM UMA POPULAÇÃO BRASILEIRA COM
DIABETES

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Fabiane G. de Moraes Rego

Co-orientador: Prof^o. Dr^o. Geraldo Picheth

CURITIBA

2018

Gobor, Luiza Cristina

Estudo do 1,5 androglucitol e polimorfismos nos genes RAGE, RANTES, CAT, MMP9 e EGFR em uma população brasileira com diabetes [recurso eletrônico] / Luiza Cristina Gobor – Curitiba, 2018.

Tese (doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, 2018.
Orientador: Dr^a. Fabiane G. de Moraes Rego

1. Diabetes *mellitus*. 2. Polimorfismos. 3. Biomarcadores. I. Rego, Fabiane G. de Moraes. II. Universidade Federal do Paraná. III. Título.

CDD 616.462



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR CIÊNCIAS DA SAÚDE
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO CIÊNCIAS
FARMACÉUTICAS

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS FARMACÉUTICAS da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **LUIZA CRISTINA GOBOR** intitulada: **Estudo do 1,5 anidroglicitol e polimorfismos nos genes RAGE, RANTES, CAT, MMP9 e EGFR em uma população brasileira com diabetes**, após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de doutor está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

Curitiba, 23 de Novembro de 2018.

FABIANE GOMES DE MORAES REGO
Presidente da Banca Examinadora

PATRICIA MARIA STUECK CAMPELO
Avaliador Externo (PUC/PR)

GISELE KLASSEN
Avaliador Externo (UFPR)

MAUREN ISFER ANGHEBEM OLIVEIRA
Avaliador Externo (UFPR)

GLAUCIO VALDAMERI
Avaliador Interno (UFPR)

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela dádiva da vida e por me permitir realizar tantos sonhos nesta existência. Obrigado por me permitir errar, aprender e crescer, por Sua eterna compreensão e tolerância, por Seu infinito amor, pela Sua voz “invisível” que não me permitiu desistir e principalmente por ter me dado uma família tão especial, enfim, obrigado por tudo.

Estes agradecimentos também se estendem a minha orientadora, Professora Doutora Fabiane Gomes de Moraes Rego, pela sua orientação, total apoio, disponibilidade, pelo saber que transmitiu, pelas opiniões e críticas, especial colaboração no solucionar de dúvidas e problemas que foram surgindo ao longo da realização deste trabalho e por todas as palavras de incentivo.

Agradeço ao Professor Doutor Geraldo Picheth por toda sua paciência, empenho e sentido prático com que também me orientou neste trabalho. Muito obrigada por ter me corrigido quando necessário sem nunca me desmotivar.

Aos professores, funcionários e colegas do Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da UFPR, em especial à Prof.^a Dra. Mauren Isfer Anghebem-Oliveira, ao Prof^o Dr. Glaucio Valdameri, a Prof^a Dra. Dayane Alberton, a Prof^a Dra. Giseli Klassen e a Prof^a Dra. Edneia Cavalieri pela solicitude e solidariedade perante minhas dificuldades.

A TODOS OS PARTICIPANTES desse estudo, profissionais do SEMPR, Laboratório do Hospital de Clínicas da UFPR, aos pacientes, pela disposição em ajudar no que deles dependesse para a conclusão da pesquisa.

Agradeço pelos colegas e amigos que trilharam e ainda trilham os mesmos caminhos que eu, e foram importantes pela ajuda braçal, pela amizade, pelas conversas e piadas, ou simplesmente pela companhia.

Por último, tendo consciência que sozinha nada disto teria sido possível, dirijo um agradecimento aos meus pais, por serem modelos de coragem, pelo seu apoio incondicional, incentivo, amizade e paciência demonstrada e total ajuda na superação dos obstáculos que ao longo desta caminhada foram surgindo. A eles dedico este trabalho!

Por fim, a todos aqueles que contribuíram, direta ou indiretamente, para a realização desta dissertação, o meu sincero agradecimento. Amém!

*A sabedoria dos homens é
proporcional não à sua experiência, mas à
sua capacidade de adquirir experiências.*

George Bernard Shaw

RESUMO

O *Diabetes mellitus* (DM) é um grupo de doenças metabólicas caracterizadas por hiperglicemia crônica resultante dos defeitos na secreção da insulina, e/ou na sua ação, de alta e crescente prevalência global. A frequência do DM no Brasil se aproxima de 10%. O *diabetes mellitus* tipo 1 (DM1) reflete a destruição autoimune das células beta-pancreáticas produtoras de insulina e o diabetes mellitus tipo 2 (DM2) está majoritariamente associado à resistência a ação da insulina. A variabilidade genética, como os polimorfismos de único nucleotídeo (SNPs) e biomarcadores são relevantes como elementos para diagnóstico e prognóstico da patologia. O objetivo do trabalho foi investigar o efeito de biomarcadores na discriminação do DM2 e buscar associação entre a variabilidade genética (SNPs) em diferentes genes no DM1 de início na fase adulta e no DM2. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Setor de Ciências da Saúde da UFPR (CAAE 24676613.6.0000.0102). A amostra se constituiu de 790 indivíduos, classificados em pacientes com DM1 (n=143), pacientes com DM2 (n=293) e indivíduos saudáveis (grupo controle, n=354). Foram estudados biomarcadores de controle glicêmico como a glicemia em jejum, HbA1c e o 1,5-anidroglicitol (1,5-AG). Foram genotipados (PCR-RFLP) os polimorfismos -374T>A (rs1800624), Del 63pb (-407_-345pb), -429T>C (rs1800625) e Gly82Ser (rs2070600) do gene *RAGE*, -403G>A (rs2107538) e -28C>G (rs2280788) do gene *RANTES*, -262C>T (rs1001179) do gene *CAT*, -1562C>T (rs3918242) do gene *MMP9*, 142285G>A (rs2227983) do gene *EGFR*, em estudo caso-controle. Todas as variantes estudadas estavam em equilíbrio de *Hardy-Weinberg*. As concentrações séricas de 1,5-AG (>15 µg/mL) discriminam indivíduos com DM2 (AUC 0,573, P<0,001) de normoglicêmicos saudáveis com sensibilidade 65% e especificidade 91%. A hemoglobina glicada (≥5,8%) foi o biomarcador que melhor discriminou indivíduos com DM2 (AUC 0,815; P<0,001) com sensibilidade de 87% e especificidade de 94%, padrão similar observado para a glicemia em jejum (≥ 113 mg/dL). O polimorfismo -374T>A (rs1800624) do gene *RAGE* foi associado à proteção (P=0,023) do DM1 (O.R.; 0,69; 95%IC: 0,51–0,95), já para o polimorfismo -429T>C (rs1800625) o alelo C foi associado ao maior risco para o DM1 (O.R.;1,54; 95%IC:1,01–2,34). Os polimorfismos de *RAGE*, Del63 (-407_-345pb) e Gly82Ser (rs2070600) não foram associados ao DM1 e DM2 neste estudo. O polimorfismo -403G>A (rs2107538) do gene *RANTES* foi associado ao aumento do risco para DM1 (OR:1,55; 95%IC: 1,15–2,07), no entanto o alelo G do polimorfismo -28C>G (rs2280788) foi associado ao aumento do risco (P=0,003) para o DM2 (OR: 5,78, 95%IC, 3,37–10,22). O alelo T do polimorfismo -262C>T (rs1001179) do gene *CAT*, apresentou associação diferenciada quanto ao risco e o tipo de diabetes, para o DM1 foi associado ao risco (OR: 2,38; 95%IC:1,73–3,28) e para o DM2 como fator de proteção (OR: 0,60; 95%IC:0,43–0,60). O polimorfismo -1562C>T (rs3918242) do gene *MMP9* foi associado ao maior risco para DM1 (OR: 1,61; 95%IC:1,00–2,60) e o polimorfismo 142285G>A (rs2227983) do gene *EGFR* não foi associado ao diabetes na amostra em estudo. Foi encontrada associação à redução do colesterol total (-33%) e LDL-colesterol (-51%) somente com o DM1, com o alelo A em homozigose do polimorfismo -374T>A (rs1800624) do gene *RAGE* quando comparado aos portadores do alelo T (-374TT). No geral, em indivíduos saudáveis (grupo controle) as frequências do alelo menor foram similares às observadas em outras populações Caucásicas. Em síntese, o 1,5-AG tem potencial para discriminar o DM2 e contribuir para o diagnóstico, sem apresentar características superiores a marcadores clássicos como a HbA1c e a glicemia em jejum. Os polimorfismos nos genes estudados que mostraram associação com DM1 e DM2, e foi diferenciada corroborando com os diferentes componentes genéticos entre estas formas de diabetes. O estudo em tela confirma para a identificação dos componentes associados ao diabetes, e caracteriza o perfil da miscigenada população brasileira.

Palavras-chave: *Diabetes mellitus*, *diabetes tipo 1 de início adulto*; biomarcadores, polimorfismos, HbA1C, 1,5-AG, estudo caso-controle.

ABSTRACT

Diabetes mellitus (DM) is a group of metabolic diseases characterized by chronic hyperglycemia resulting from defects in insulin secretion, and / or its action, of high and increasing global prevalence. The frequency of DM in Brazil is close to 10%. Type 1 diabetes mellitus (DM1) reflects the autoimmune destruction of beta-pancreatic insulin-producing cells and type 2 diabetes mellitus (DM2) is mostly associated with insulin resistance. Genetic variability, such as single nucleotide polymorphisms (SNPs) and biomarkers are relevant as elements for diagnosis and prognosis of pathology. The objective of this study was to investigate the effect of biomarkers on the discrimination of DM2 and to search for association between genetic variability (SNPs) in different genes in DM1 from adult onset and in DM2. The project was approved by the Research Ethics Committee of the Health Sciences Sector of UFPR (CAAE 24676613.6.0000.0102). The sample consisted of 790 individuals, classified as patients with DM1 (n = 143), patients with DM2 (n = 293) and healthy individuals (control group, n = 354). Biomarkers of glycemic control such as fasting glycaemia, HbA1c and 1,5-anhydroglucitol (1,5-AG) were studied. The polymorphisms -374T> A (rs1800624), Del 63pb (-407_-345pb), -429T> C (rs1800625) and Gly82Ser (rs2070600) of the RAGE gene, -403G> A (rs2107538) were genotyped (PCR-RFLP) -28C> G (rs2280788) of the RANTES gene, -262C> T (rs1001179) of the CAT gene, -1562C> T (rs3918242) of the MMP9 gene, 142285G> A (rs2227983) of the EGFR gene, in a case-control study. All variants studied were in Hardy-Weinberg equilibrium. Serum concentrations of 1,5-AG (> 15 µg / mL) discriminated individuals with DM2 (AUC 0.573, P <0.001) from healthy normoglycemics with 65% sensitivity and 91% specificity. Glycated hemoglobin (≥5.8%) was the biomarker that best discriminated individuals with DM2 (AUC 0.815; P <0.001) with sensitivity of 87% and specificity of 94%, similar pattern observed for fasting glycaemia (≥ 113 mg / dL). The polymorphism -374T> A (rs1800624) of the RAGE gene was associated with the protection (P = 0.023) of DM1 (OR, 0.69; 95% CI: 0.51 ± 0.95), already for the -429T> C (rs1800625), the C allele was associated with a higher risk for DM1 (OR, 1.54; 95% CI: 1.01 ± 2.34). The polymorphisms of RAGE, Del63 (-407_-345pb) and Gly82Ser (rs2070600) were not associated with DM1 and DM2 in this study. The polymorphism -403G> A (rs2107538) of the RANTES gene was associated with increased risk for DM1 (OR: 1.55; 95% CI: 1.15-2.07), however the G-allele of the -28C polymorphism> G (rs2280788) was associated with increased risk (P = 0.003) for DM2 (OR: 5.78, 95% CI, 3.37-10.22). The T-allele of the -262C> T polymorphism (rs1001179) of the CAT gene, showed a different association with risk and type of diabetes, for DM1 was associated with risk (OR: 2.38; 95% CI: 1.73-3.28) and for DM2 as a protection factor (OR: 0.60; 95% CI: 0.43-0.80). The polymorphism -1562C> T (rs3918242) of the MMP9 gene was associated with increased risk for DM1 (OR: 1.61; 95% CI: 1.00-2.60) and the polymorphism 142285G> A (rs2227983) of the EGFR gene was not associated with diabetes in the study sample. It was found to be associated with the reduction of total cholesterol (-33%) and LDL-cholesterol (-51%) only with DM1, with the A allele in homozygous of the -374T> A polymorphism (rs1800624) of the RAGE gene when compared to the T allele (-374TT). In general, in healthy individuals (control group) the frequencies of the minor allele were similar to those observed in other Caucasian populations. In summary, 1,5-AG has the potential to discriminate DM2 and contribute to the diagnosis, without presenting characteristics superior to classic markers such as HbA1c and fasting glycaemia. The polymorphisms in the studied genes that showed association with DM1 and DM2, and was differentiated corroborating with the different genetic components between these forms of diabetes. The screen study confirms the identification of the components associated with diabetes, and characterizes the profile of the mixed Brazilian population.

Keywords: Diabetes mellitus, adult onset type 1 diabetes; biomarkers, polymorphisms, HbA1C, 1,5-AG, case-control study.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Distribuição global do diabetes..	24
Figura 2 – Representação esquemática do RAGE e seus principais domínios.....	38
Figura 3 – Ativação da sinalização via RAGE..	41
Figura 4 – Representação dos genes localizados na região do MHC e localização dos polimorfismos identificados no gene <i>RAGE</i>	43
Figura 5- Diagrama esquemático do gene <i>RANTES</i>	47
Figura 6- Funções do tecido adiposo visceral em situações saudáveis e de obesidade.	49
Figura 7- Interações entre os adipócitos e as células imune em diferentes estágios da doença metabólica e cardiovascular..	52
Figura 8-Citocinas pró-inflamatórias possuem efeitos diretos na imunogenicidade das ilhotas e sobrevivência das células β ..	56
Figura 9 – Vias que influenciam o diabetes em associação entre espécies reativas de oxigênio e antioxidantes.	58
Figura 10 – Representação esquemática do cromossomo humano 11 e localização do gene <i>CAT</i>	59
Figura 11 – Vias biológicas em que a MMP9 está envolvida..	62
Figura 12 – Representação esquemática do cromossomo humano 20 e localização do gene <i>MMP9</i>	63
Figura 13 – As principais vias de sinalização a jusante reguladas pelo EGFR..	65
Figura 14 – Representação esquemática da localização cromossomal do gene <i>EGFR</i> , estrutura dos exons e domínios proteicos.....	67
Figura 15. Curvas ROC para os biomarcadores de controle glicêmico HbA1c, glicemia, e 1,5-anidroglicitol (1,5-AG).	75
Figura 16 - Genotipagem por RFLP do polimorfismo -374T/A.	94
Figura 17 – Genotipagem por RFLP do polimorfismo Del 63 pb.	98
Figura 18 – Genotipagem por RFLP do polimorfismo -429T>C (rs1800625).	101
Figura 19 – Genotipagem por RFLP do polimorfismo G82S (rs2070600)..	104
Figura 20 – Genotipagem por RFLP do polimorfismo -403G>A (rs2107538) do gene <i>RANTES</i>	108

Figura 21 – Genotipagem por RFLP do polimorfismo -28C>G (rs2280788) do gene <i>RANTES</i>	113
Figura 22 – Genotipagem por RFLP do polimorfismo -262C>T (rs1001179).	119
Figura 23 – Genotipagem por RFLP do polimorfismo -1562C>T (rs3918242) do gene <i>MMP9</i>	123
Figura 24 – Genotipagem por RFLP do polimorfismo 142285G>A (rs2227983) do gene <i>EGFR</i>	127
Figura 25 - Relação entre genótipos do rs1800624 de RAGE e colesterol total e LDL-colesterol.....	130

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Critérios para o diagnóstico de DM e caracterização de risco para DM ..	30
Tabela 2 – Parâmetros bioquímicos, metodologias e intervalo de referência.	70
Tabela 3 – Parâmetros de genotipagem para as reações de PCR-RFLP.....	71
Tabela 4 – Condições utilizadas para PCR.....	72
Tabela 5 – Parâmetros antropométricos e bioquímicos para os grupos Controle e DM2.....	74
Tabela 6 – Dados antropométricos dos grupos Controles, DM1 e DM2.	78
Tabela 7 – Parâmetros bioquímicos para os grupos Controles, DM1 e DM2.....	88
Tabela 8 – Frequências genotípicas e alélicas do polimorfismo -374T>A (rs1800624) da região promotora do gene <i>RAGE</i> para os grupos Controle, DM1 e DM2.....	95
Tabela 9 – Comparações entre as frequências genotípicas e alélicas do polimorfismo -374T>A (rs1800624) da região promotora do gene <i>RAGE</i> com dados da literatura.	97
Tabela 10 – Frequências genotípicas e alélicas da deleção de 63 pb da região promotora do gene <i>RAGE</i> para os grupos Controle, DM1 e DM2.....	99
Tabela 11 - Comparações entre as frequências genotípicas e alélicas da deleção de 63 pb da região promotora do gene <i>RAGE</i> com dados da literatura.....	100
Tabela 12 – Frequências genotípicas e alélicas do polimorfismo -429T>C (rs1800625) da região promotora do gene <i>RAGE</i> para os grupos Controle, DM1 e DM2.....	102
Tabela 13 – Comparações entre as frequências genotípicas e alélicas do polimorfismo -429T>C (rs1800625) do gene <i>RAGE</i> com dados da literatura.	103
Tabela 14 – Frequências genotípicas e alélicas do polimorfismo G82S (rs2070600) da região do éxon 3 do gene <i>RAGE</i> para os grupos Controle, DM1 e DM2.	105
Tabela 15 – Comparações entre as frequências genotípicas e alélicas do polimorfismo G82S (rs2070600) da região do éxon 3 do gene <i>RAGE</i> com dados da literatura.	106
Tabela 16 – Frequências genotípicas e alélicas do polimorfismo -403G>A (rs2107538) da região promotora do gene <i>RANTES</i> para os grupos Controle, DM1 e DM2.....	109

Tabela 17 – Comparações entre as frequências genótípicas e alélicas do polimorfismo -403G>A (rs2107538) da região promotora do gene <i>RANTES</i> com dados da literatura.....	112
Tabela 18 – Frequências genótípicas e alélicas do polimorfismo -28C>G (rs2280788) da região promotora do gene <i>RANTES</i> para os grupos Controle, DM1 e DM2.	114
Tabela 19 – Comparações entre as frequências genótípicas e alélicas do polimorfismo -28C>G (rs2280788) da região promotora do gene <i>RANTES</i> com dados da literatura.....	116
Tabela 20 – Frequências genótípicas e alélicas do polimorfismo -262C>T (rs1001179) do gene <i>CAT</i> para os grupos Controle, DM1 e DM2.....	120
Tabela 21 – Comparações entre as frequências genótípicas e alélicas do polimorfismo -262C>T (rs1001179) da região promotora do gene <i>CAT</i> com dados da literatura.	122
Tabela 22 – Frequências genótípicas e alélicas do polimorfismo -1562C>T (rs3918242) da região promotora do gene <i>MMP-9</i> para os grupos Controle, DM1 e DM2.....	124
Tabela 23 – Comparações entre as frequências genótípicas e alélicas do polimorfismo -1562C>T (rs3918242) da região promotora do gene <i>MMP-9</i> com dados da literatura.....	126
Tabela 24 – Frequências genótípicas e alélicas do polimorfismo 142285G>A (rs2227983) da região do exon 13 do gene <i>EGFR</i> para os grupos Controles, DM1 e DM2.....	128
Tabela 25 - Comparações entre as frequências genótípicas e alélicas do polimorfismo 142285G>A (rs2227983) da região do exon 13 do gene <i>EGFR</i> com dados da literatura.....	129

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

1,5-AG	– 1,5 Anidroglucitol
ADA	– Sociedade Americana de Diabetes
ADRF	– Fator relaxante derivado do adventício
AGEs	– Produtos Finais de Glicação Avançada
Akt	– <i>Murine thymoma viral oncogene</i>
AUC	– Área sobre a curva
<i>BCL2</i>	– Linfoma de células B 2
<i>BCL-X_L</i>	– <i>B-cell lymphoma-extra large</i>
CAT	– Catalase
CCL-2	– Ligando de Quimiocina 2
CCL21	– Ligando de Quimiocina 21
CCL5/RANTES	– Regulada Ativação Células T Normal Expressada e Secreta
CCND1	– Gene que Codifica Ciclina D1
CCR1	– Receptor CC-quimiocina 1
CCR3	– Receptor CC-quimiocina 3
CCR5	– Receptor CC-quimiocina 5
CD	– Célula Dendrítica
CD11c	– Proteína da Cadeia Alfa da Integrina X
CD206	– Receptor da Manose
CD25	– Receptor de Interleucina 2
CD40	– Cluster de Diferenciação 40
CD40L	– CD40 Ligante
CDC42	– <i>Cell division control protein 42 homolog</i>
CDKN1A	– Gene que Codifica a Proteína p21
CEL	– N epsilon-(carboxietil)lisina
CMD	– Complicações Microvasculares Diabéticas
CML	– N épsilon-(carboximetil)lisina
CTLA-4	– Antígeno 4 Associado ao Linfócito T Citotóxico
CXCL10	– Chemokine (C-X-C motif) ligand 10

CXCL9	– Chemokine (C-X-C motif) ligand 9
DAC	– Doença arterial Coronariana
DAG	– Diacilglicerol
DCCT	– <i>Diabetes Control and Complications Trial</i>
Diáfano-1	– <i>Diaphanous-related Formin-1</i>
DM	– Diabetes Mellitus
DM1	– Diabetes Mellitus Tipo 1
DM2	– Diabetes mellitus Tipo 2
DMG	– Diabetes mellitus Gestacional
DNTs	– Doenças Não Transmissíveis
DOCK7	– <i>Dedicator of Cytokinesis 7</i>
EASD	– <i>European Association for the Study of Diabetes</i>
EGFR	– <i>Epidermal growth factor receptor</i>
EGR-1	– Proteína de resposta precoce ao crescimento 1
Enos	– Óxido nítrico sintase isoenzima endotelial
ERK	– Quinase regulada por sinal extracelular
ERK1/2	– <i>Extracellular signal–regulated kinase</i>
EROs	– Espécies Reativas de Oxigênio
FFA	– Ácidos Graxos Livres
FOXO	– <i>Forkhead Box O</i>
FOXO1	– <i>Orkhead Box Protein O1(forkhead in rhabdomyosarcoma)</i>
FoxP3	– <i>Forkhead Box P3</i>
GAD/GAD65	– Descarboxilase do ácido glutâmico
G-Gly	– Glicina
GLUT1	– Transportador de glicose 1
GPR75	– Receptor proteína G 75
GPx	– Glutationa Peroxidase
GRB2	– Proteína 2 Ligada ao Receptor de Fator de Crescimento
GST	– Glutationa S-transferase
GWAS	– Associação Genômica Ampla
HAS	– Hipertensão Arterial Sistêmica

H ₂ O	– Água
H ₂ O ₂	– Peróxido de Hidrogênio
HbA1c	– Hemoglobina glicada A1c
HDL-C	– Lipoproteína de Alta Densidade
HIF1 α	– Fator 1 α Induzível por Hipóxia
HLA	– Antígeno Leucocitário Humano
HMGB1	– Grupo de alta mobilidade 1
IA2 e IA2 β	– Proteína tirosina fosfatase
IAA	– Autoanticorpos Contra Insulina
IAM	– Infarto Agudo do Miocárdio
IDF	– Federação Internacional de Diabetes
IFN	– Interferon
Ig	– Imunoglobulina
IgGc	– Concentrações plasmáticas da pró-inflamatória
IKKb	- Quinase do Inibidor Kappa B
IL-10	– Interleucina-10
IL-12	– Interleucina-12
IL-13	– Interleucina-13
IL-17	– Interleucina-17
IL-1 β	– Interleucina-1 beta
IL-4	– Interleucina-4
IL-5	– Interleucina-5
IL-6	– Interleucina-6
INF- γ	– Inteferon Gama
IRS-1	– Substrato 1 do Receptor de Insulina
JAK	– Janus quinase
JANEX1	– [4-(4'-hydroxyphenyl)-amino-6,7-dimethoxyquiazoline]
JNK	– Quinase C-jun N-terminal
KLRG1	– Receptor Similar a Lecitina G1 de Célula Killer
LADA	– Diabetes autoimune Latente de Adultos
LDL-C	– Lipoproteína de Baixa Densidade

LPS	– Lipopolisacarídeo
M2	– Macrófagos M2
MAP	– Proteína Ativada por Mitógeno
MAPK	– Proteína quinase Ativada por Mitógeno
MCP-1	– Proteína Quimiotática de Monócitos-1
M-CSF-1	– Macrophage Colony-stimulating Factor 1
MEK1/2	– Mitogen-activated Protein kinase 1/2
MHC	– Complexo Principal de Histocompatibilidade
MKP1	– <i>mitogen-activated protein kinase phosphatase 1</i>
MMP	– Metaloproteases de Matriz
MMP9	– Metaloproteinase de Matriz 9
MODY	– <i>Maturity-onset diabetes of the young</i>
mTOR	– Proteína Alvo da Rapamicina
MYC	– <i>Oncogene Mielocitomatose (myelocytomatosis)</i>
NADP oxidase	– Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato Oxidase
ND	– Nefropatia Diabética
NEFA	– Ácidos Graxos Não Esterificados
NF-κB	– Fator Nuclear kappa B
NLRP3	– Proteína 3 contendo os domínios NACHT, LRR e PYD
NOD	– Ratos Diabéticos Não Obesos
NOS	– Óxido Nítrico Sintase
NSGP	– <i>National Glycohemoglobin Standardization Program</i>
O ₂	– Oxigênio
p38	– <i>Protein 38</i>
PAT	– Tecido Adiposo Pancreático
PH	– Domínio Homólogo à Plecstrina
PI3K	– Fosfoinositídeo 3-quinase
PKC	– Proteína quinase C
PKC – DAG	– Proteína quinase C – Diacilglicerol
PKCζ	– Proteína quinase C, zeta
PLC γ	– Fosfolipase C γ (<i>phospholipase C- γ</i>)

PPAR γ	– Receptores Ativados por Proliferadores de Peroxissoma
PRR	– Receptor de reconhecimento de padrão
PTEN	– Fosfatase Homóloga à Tensina
Rac1	– <i>Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1</i>
Raf	– Proto-oncogenes Serina/Treonina quinase
RAGE	– Receptor de Produtos Finais de Glicação Avançada
Ras	– Sistema Renina Angiotensina
Ras-MAPK	– Proteína quinase ativada por mitógeno
RD	– Retinopatia Diabética
Rho	– Família de genes homólogos <i>Ras</i>
ROS	– Espécies reativas de oxigênio
RSV	– Vírus sincicial respiratório
SAPK	– Proteína quinase ativada pelo estresse
SBD	– Sociedade Brasileira de Diabetes
SNC	– Sistema Nervoso Central
SNPs	– Polimorfismo de único nucleotídeo
SOD	– Superóxido Desmutase
SOS	– <i>Son of Sevenless</i>
SP-1	– <i>Specificity protein 1</i>
sRAGE	– <i>Soluble Receptor for Advanced Glycation End-products</i>
SRC	– Proto-oncogene Tirosina quinase
STAT1	– Ativadora de transcrição e transdutora de sinal 1
STAT3	– Ativadora de transcrição e transdutora de sinal 3
STAT5	– Ativadora de transcrição e transdutora de sinal 5
TA	– Tecido Adiposo
TAS	– Tecido Adiposo Subcutâneo
TAV	– Tecido Adiposo Visceral
TAVp	– Tecido Adiposo Perivascular
TGF- β	– Fator de crescimento transformante β
TIRAP	– <i>Toll-interleukin 1 receptor domain containing adaptor protein</i>
TK	– Tirosina quinase

TNF	– Fator de Necrose Tumoral
TNF- α	– Fatores de Necrose Tumoral Alfa
TOTG	– Teste de Tolerância Oral à Glicose
Treg	– T regulatórias
UTR 3'	– Região não traduzida
VC1	– Unidade estrutural formada entre os domínios V e C1
VCAM-1	– Proteína 1 de Adesão Celular
VEGF	– Fator de Crescimento Endotelial Vascular
WHO	– Organização Mundial de Saúde
ZnT8A	– Proteína transportadora de zinco

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	21
2	OBJETIVOS	22
2.1	OBJETIVO GERAL.....	22
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	22
3	REVISÃO DE LITERATURA	23
3.1	DIABETES MELITUS	23
3.1.1	Classificação do Diabetes mellitus	25
3.1.2	Diagnóstico do Diabetes Mellitus	30
3.2	NOVOS BIOMARCADORES DE DIAGNÓSTICO E RISCO PARA O <i>DIABETES MELLITUS</i>	31
3.2.1	Biomarcadores para diagnóstico do Diabetes mellitus	33
3.2.2	Biomarcadores genéticos de risco para o Diabetes mellitus	34
3.3	RECEPTOR DE PRODUTOS FINAIS DE GLICAÇÃO AVANÇADA (RAGE) 37	
3.4	RANTES.....	45
3.4.1	Disfunção do Tecido Adiposo.....	48
3.5	GENE CATALASE.....	56
3.6	GENE <i>MMP-9</i>	61
3.7	GENE <i>EGFR</i>	63
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	68
4.1	CARACTERIZAÇÃO E COLETA DAS AMOSTRAS.....	68
4.2	QUANTIFICAÇÃO DE PARÂMETROS BIOQUÍMICOS E DADOS ANTROPOMÉTRICO	69
4.3	EXTRAÇÃO DO DNA GENÔMICO	69
4.4	REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR).....	70
4.5	ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	72
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	74
5.1	VARIAÇÃO DO 1,5-AG NO DIAGNÓSTICO DO DM2	74
5.2	ANÁLISES DOS DADOS ANTROPOMÉTRICOS E PARÂMETROS BIOQUÍMICOS	77
5.2.1	Idade	77

5.2.2	Peso, IMC e Obesidade	78
5.2.3	Hipertensão (HAS)	79
5.2.4	Tabagismo.....	79
5.2.5	Doença tireoidiana	80
5.2.6	Doença arterial coronariana (DAC) e Dislipidemia	81
5.2.7	Tempo de diabetes e História familiar de diabetes.....	83
5.2.8	História familiar de Obesidade, DAC e DT	84
5.2.9	Terapia medicamentosa	85
5.2.10	Complicações do diabetes	86
5.2.11	Biomarcadores de controle glicêmico (glicemia jejum, 1,5-AG e HbA1c).....	88
5.2.12	Perfil lipídico	89
5.2.13	Creatinina e ureia	91
5.2.14	Ácido úrico.....	91
5.2.15	Proteínas (proteínas totais e albumina).....	92
5.2.16	Enzimas (AST, ALT e γ GT).....	92
5.3	ANÁLISES MOLECULARES	93
5.3.1	Polimorfismos no gene RAGE.....	93
5.3.2	Polimorfismos no gene RANTES	107
5.3.3	Polimorfismos no gene CAT	118
5.3.4	Polimorfismos no gene MMP9.....	123
5.3.5	Polimorfismos no gene EGFR.....	126
5.4	ASSOCIAÇÃO DOS POLIMORFISMOS COM BIOMARCADORES.....	129
6	CONCLUSÕES.....	132
	REFERÊNCIAS.....	134

1 INTRODUÇÃO

Diabetes mellitus (DM) é caracterizado por um distúrbio metabólico (hiperglicemia crônica) resultante de defeitos na secreção de insulina, resistência à ação da insulina, ou ambos (REAVEN, 1988, SACKS, MCDONALD, 1996, ADA, 2018). Diferentes classes de *Diabetes mellitus*, tipo 1, tipo 2, gestacional e outros tipos são comparados em termos de critérios diagnósticos, etiologia e genética. A genética molecular do diabetes tem recebido extensa atenção nos últimos anos. Um grande conjunto de mutações e polimorfismos de nucleotídeo único em genes que desempenham papel nas várias etapas e vias envolvidas no metabolismo da glicose e no desenvolvimento, controle e função das células pancreáticas têm sido estudados (KHARROUBI, DARWISH, 2015).

O DM está associado com hiperglicemia, a qual desencadeia inflamação crônica, contribuindo para a patogênese do DM e suas complicações associadas (LONTCHI-YIMAGOU *et al.*, 2013). O que precisa ser determinado é o mecanismo pelo qual o diabetes/hiperglicemia regula a resposta imune inflamatória. Foi demonstrado que o acúmulo e ativação de Produtos de glicação avançada (AGEs - *Advanced glycation endproducts*) e de seu receptor (RAGE – *Receptor for Advanced glycation endproducts*) em células/tecidos de pacientes diabéticos, podendo exercer potentes funções regulatórias imunes na patogênese da doença (ZONG *et al.*, 2010, JURANEK *et al.*, 2013, XIE *et al.*, 2013, OTT *et al.*, 2014).

Apesar do acúmulo de extensivos dados em nível celular e molecular, o mecanismo de desenvolvimento do DM e suas complicações não estão completamente compreendidos. Definitivamente, é necessária uma pesquisa mais extensa neste campo que acabará refletindo sobre o objetivo final de melhorar o diagnóstico, a terapia e minimizar a chance de desenvolvimento de complicações crônicas (KHARROUBI, DARWISH, 2015).

Neste contexto, a proposta desta tese é avaliar a variabilidade de genes no diabetes tipo 1 e tipo 2 e suas relações com outros biomarcadores (antropométricos, clínicos, laboratoriais, genéticos), com a finalidade de ampliar o conhecimento dos processos fisiopatológicos envolvidos nesta doença.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Investigar a associação entre os biomarcadores e as variantes genéticas no *Diabetes mellitus* tipo 1 e 2 e suas complicações.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Quantificar biomarcadores de controle glicêmico, perfil lipídico, biomarcadores inflamatórios e função renal em amostras de pacientes com diabetes tipo 1 (de início tardio) e diabetes tipo 2, bem como em controles saudáveis;
- Avaliar o poder discriminador da HbA1c, Glicemia e 1,5 Anidroglicitol no diabetes tipo 2;
- Genotipar os polimorfismos rs1800624, rs1800625 e rs2070600 do gene RAGE, rs2107538 e rs2280788 do gene RANTES, rs1001179 do gene CAT, rs3918242 do gene da *MMP9* e rs2227983 do gene EGFR, envolvendo pacientes com DM1 e DM2;
- Associar os polimorfismos em estudo com variáveis antropométricas, clínicas e laboratoriais.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 DIABETES MELITUS

O *Diabetes mellitus* (DM) é um grupo de doenças metabólicas caracterizadas por hiperglicemia crônica resultante dos defeitos na secreção da insulina, e/ou na sua ação (ADA, 2014). Anormalidades no metabolismo dos carboidratos, lipídeos e proteínas resultam da falha do papel da insulina como hormônio anabólico. Baixas concentrações de insulina para a obtenção de adequada resposta e/ou resistência dos tecidos (principalmente no músculo esquelético, tecido adiposo, e em menor extensão, fígado) no nível de receptores, transdução de sinal e/ou enzimas efetoras ou genes podem ser os responsáveis por estas anormalidades metabólicas (ADA, 2014, KHARROUBI, DARWISH, 2015). A severidade dos sintomas é dependente do tipo e duração do DM. Alguns pacientes diabéticos são assintomáticos, especialmente os *Diabetes mellitus* tipo 2 (DM2) durante os anos iniciais da doença, outros pacientes com marcada hiperglicemia e especialmente crianças com absoluta deficiência de insulina apresentam poliúria, polidipsia, polifagia, perda de peso e visão borrada. Diabetes descontrolado podem levar a estupor, coma e se não tratado morte, devido à cetoacidose diabética ou síndrome hiperosmolar não cetótica (CRAIG *et al.*, 2014, ADA, 2018). A hiperglicemia, se não for controlada em longo prazo, pode causar danos a vários órgãos do corpo, levando ao desenvolvimento de complicações de saúde incapacitantes e com risco de vida, como doença cardiovascular, neuropatia, nefropatia e doença ocular, levando a retinopatia e cegueira (IDF, 2017).

Estima-se que cerca de 425 milhões de pessoas em todo o mundo, ou 8,8% dos adultos entre 20 e 79 anos, tenham diabetes. Cerca de 79% vivem em países de baixa e média renda. O número de pessoas com diabetes aumenta para 451 milhões se a idade for ampliada para 18-99 anos. Se essas tendências continuarem, em 2045, 693 milhões de pessoas entre 18 e 99 anos, ou 629 milhões de pessoas entre 20 e 79 anos, terão diabetes. A Figura 1 ilustra a distribuição de DM entre os continentes. O Brasil é o país da América Central e do Sul que apresenta o maior número de pessoas com DM (12,5, 11,4-13,5 milhões) (IDF, 2017).

Em países de alta renda, estima-se que aproximadamente 87% a 91% de todos os DM2, 7% a 12% tenham DM1 e 1% a 3% tenham outros tipos de diabetes

(BOYLE *et al.*, 1999, EVANS *et al.*, 2000, BRUNO *et al.*, 2005, HOLMAN *et al.*, 2015).

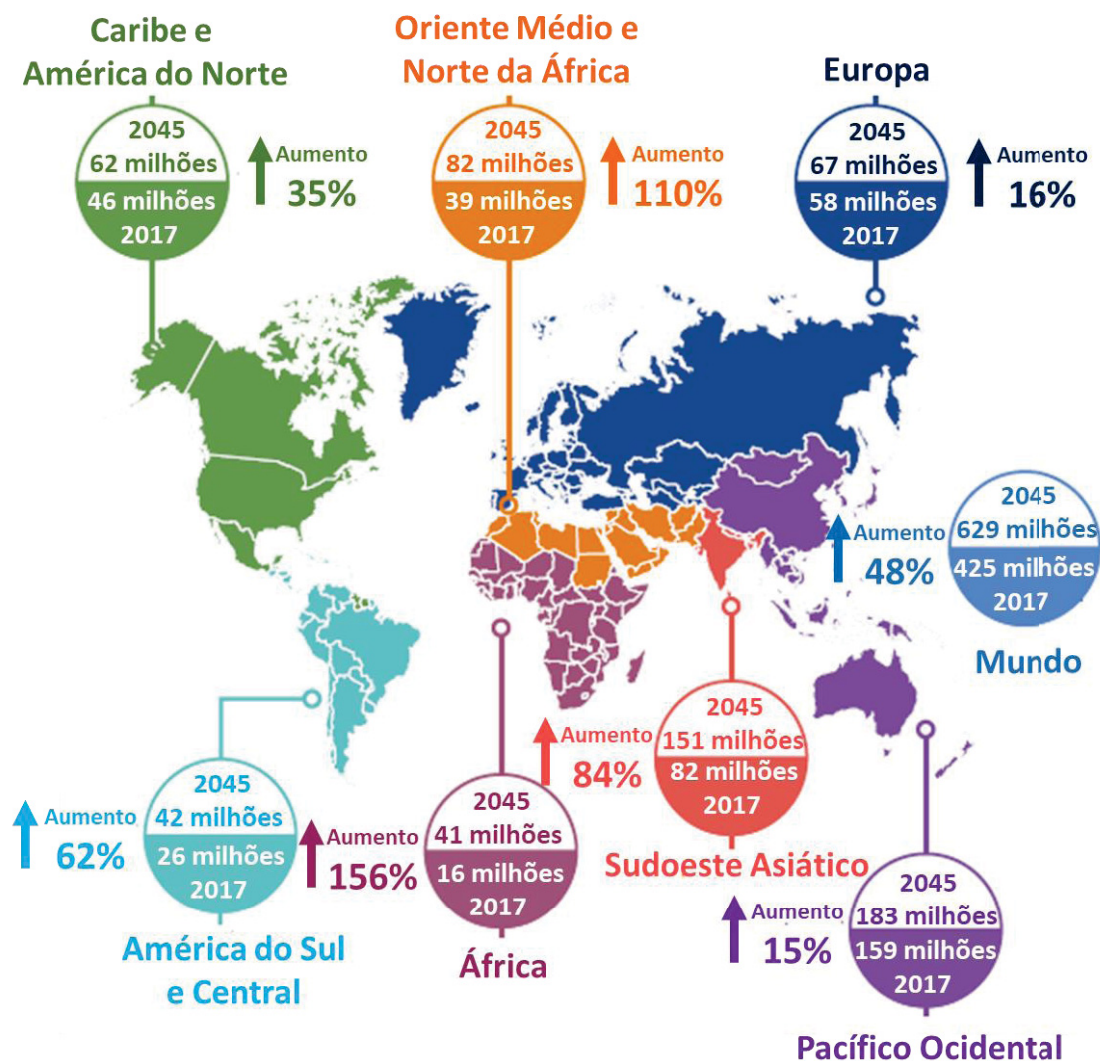


Figura 1 - **Distribuição global do diabetes.** Número de pessoas com diabetes por região em 2017 e 2045 entre 20 e 79 anos.

Fonte: Adaptado de *Internacional Diabetes Federation – IDF* (2017)

O maior contribuinte para o desafio do DM é que 30% a 80% das pessoas com DM não são diagnosticadas, com uma proporção de 37,3% em países de alta renda, 52,5% de média renda e 76,5% de baixa renda em 2017. No Brasil a proporção de DM não diagnosticado corresponde a 73,7%, correspondendo à aproximadamente 760mil pessoas (IDF, 2017).

O DM é um problema global, que mata e incapacita, atingindo pessoas em sua idade mais produtiva, empobrecendo famílias ou reduzindo a expectativa de vida de pessoas idosas. É uma ameaça comum que não respeita fronteiras ou

classe social (IDF, 2017). O diabetes é uma das maiores emergências globais de saúde do século XXI. Ele está entre as 10 principais causas de morte em todo o mundo e, juntamente com as outras três principais doenças não transmissíveis (DNTs), (doença cardiovascular, câncer e doenças respiratórias) são os responsáveis por mais de 80% de todas as mortes prematuras por DNT. Em 2015, 39,5 milhões das 56,4 milhões de mortes em todo o mundo foram devidas as DNTs (GBD, 2015).

O DM2 continua a ser um dos problemas de saúde globais mais desafiadores do nosso tempo e, com o aumento da prevalência a sobrecarga aumentará. O grau de mortalidade relacionada ao diabetes tende a ser menor em pacientes diagnosticados no final da década de 70 (47-51% são diagnosticados com 65 anos ou mais), quando comparados com da década de 40 (GATLING *et al.*, 2001, ROGLIC *et al.*, 2005). No entanto, o que se sabe é que 89% das pessoas diagnosticadas com DM2 têm um ou mais fatores de risco modificáveis, de modo que a proporção de mortes evitáveis não deve ser subestimada (MATSUSHIMA *et al.*, 1997). A morte por doença cardiovascular é um dos principais contribuintes para esse excesso de mortalidade (HU *et al.*, 2001, LOTUFO *et al.*, 2001). Nas populações diabéticas, a mortalidade geralmente exhibe padrões sociais, por todas as causas, como o risco de mortalidade aumentado em grupos mais carentes (ROBINSON *et al.*, 1998, ROPER *et al.*, 2001, DRAY-SPIRA *et al.*, 2010).

Mudanças no estilo de vida de toda a população, juntamente com detecção precoce, diagnóstico e tratamento de baixo custo do diabetes, são necessárias para salvar vidas e prevenir ou retardar significativamente as complicações devastadoras relacionadas ao DM. Somente respostas multissetoriais e coordenadas com políticas públicas e intervenções de mercado dentro e além do setor de saúde podem resolver este problema (ADA, 2018).

3.1.1 Classificação do Diabetes mellitus

O diabetes pode ser classificado nas seguintes categorias:

1. Diabetes mellitus tipo 1 (DM1): devido à destruição das células β pancreáticas, usualmente levando à deficiência absoluta de insulina;

2. Diabetes mellitus tipo 2 (DM2): devido à perda progressiva da secreção de insulina pelas células β pancreáticas frequentemente no contexto de resistência à insulina;

3. Diabetes mellitus gestacional (DMG): diabetes diagnosticado no segundo ou terceiro trimestre de gravidez que claramente não constitui diabetes manifesto previamente à gestação;

4. Tipos específicos de diabetes devido a outras causas, como por exemplo síndromes diabéticas monogênicas (tais como diabetes neonatal e diabetes juvenil de início na maturidade (*maturity-onset diabetes of the young* - MODY), doenças do pâncreas exócrino (como fibrose cística e pancreatite) e diabetes induzido por drogas ou produtos químicos (como uso de glicocorticoides no tratamento do HIV/AIDS, ou após transplante de órgãos).

Embora a classificação do diabetes seja importante e apresenta implicações para as estratégias de tratamento, não é uma tarefa fácil e muitos pacientes não se encaixam em uma única categoria, especialmente adultos jovens (ROSENBLOOM *et al.*, 2009, STONE *et al.*, 2010, THUNANDER *et al.*, 2012, ADA, 2018) e 10% dos pacientes classificados inicialmente podem requerer revisão (CAKAN *et al.*, 2012).

3.1.1.1 Diabetes mellitus tipo 1 (DM1)

O DM1 constitui uma das doenças crônicas mais comuns em crianças (ZYLKE, DEANGELIS, 2007). Existem 1,1 milhão de crianças e adolescentes com DM1 no mundo, e no Brasil, anualmente, 9.600 novos casos ocorrem entre jovens com idades entre 0-19 anos (IDF, 2017). Ele contribui para 98% do DM em crianças nas faixas etária entre 0-10 anos de idade e 87% dos casos entre 11-19 anos de idade (DABELEA *et al.*, 2014, MAYER-DAVIS *et al.*, 2017). Embora se acredite que o DM1 seja tipicamente diagnosticado durante a infância, estudos estimam que aproximadamente metade de todos os novos casos diagnosticados ocorre na fase adulta quando os indivíduos encontram-se entre os 20 e 30 anos de idade, contribuindo com cerca de 5% a 10% de todos os casos de diabetes entre adultos (MOLBAK *et al.*, 1994, VANDEWALLE *et al.*, 1997a, VANDEWALLE *et al.*, 1997b, THUNANDER *et al.*, 2008, MENKE *et al.*, 2013, ZHANG *et al.*, 2017).

O DM1 ocorre principalmente devido à destruição autoimune das células β pancreáticas através da resposta inflamatória (insulinite) mediada pelas células T

bem como pela resposta humoral mediada pelas células Beta (DEVENDRA *et al.*, 2004). A presença de autoanticorpos contra as células das ilhotas pancreáticas constitui a marca registrada do DM1, mesmo que o papel dos anticorpos na patogênese da doença não esteja claro. Este autoanticorpos incluem autoanticorpos contra células das ilhotas, e autoanticorpos contra insulina (IAA), descarboxilase do ácido glutâmico (GAD, GAD65), proteína tirosina fosfatase (IA2 e IA2 β) e proteína transportadora de zinco (ZnT8A) (VERMEULEN *et al.*, 2011). Podem ser detectados no soro destes pacientes meses ou anos depois do início da doença (COUPER,DONAGHUE, 2009). O aparecimento destes autoanticorpos é dependente da idade, o IAA e ZnT8A são mais frequentemente expressos em crianças com idade abaixo de 10 anos; e o GAD65 e o IA-2 estão relacionados com idade mais avançada; e GAD65, com o sexo feminino (HOWSON *et al.*, 2011).

A predisposição genética para a DM1 é complexa, implicando que múltiplos genes de susceptibilidade com diferentes efeitos desempenham um papel no desenvolvimento da doença. O DM1 é claramente um distúrbio poligênico, com aproximadamente 60 *loci* conhecidos por afetar a suscetibilidade a doenças (RAM,MORAHAN, 2017). Acredita-se que a maioria dos *loci* associados ao risco de DM1 envolva respostas imunes, sendo que aproximadamente 72 *loci* podem sustentar a noção de que as influências genéticas envolvem mecanismos que contribuem coletivamente para uma resposta imune aberrante, incluindo o desenvolvimento e manutenção da tolerância (CONCANNON *et al.*, 2009). Esse mecanismo pode ajudar a explicar as diferentes taxas de progressão para DM1 em adultos versus crianças, onde apenas pequenas variações na suscetibilidade genética foram observadas (HOWSON *et al.*, 2011). O DM1 autoimune possui forte associação com HLA, com ligação aos genes DR e DQ. Os alelos HLA-DR/DQ podem predispor como conferir proteção ao DM1 (ERLICH *et al.*, 2008).

Adicionalmente a importância da predisposição genética no DM1, vários fatores ambientais têm sido implicados na etiologia da doença (COUPER,DONAGHUE, 2009, CANIVELL,GOMIS, 2014) apesar de seu papel ser controverso (FORLENZA,REWERS, 2011). Evidências recentes suportam o efeito causativo das infecções virais no DM1 (FERREIRA *et al.*, 2014, KALLIONPAA *et al.*, 2014, RICHARDSON,HORWITZ, 2014)Os fatores virais incluem rubéola congênita (GINSBERG-FELLNER *et al.*, 1985, MCINTOSH,MENSER, 1992), infecção viral com enterovírus, rotavírus, herpes, citomegalovírus, retrovírus endógeno (STENE *et al.*,

2010, YEUNG *et al.*, 2011) e Ljungan vírus (Parechovirus B) (NILSSON *et al.*, 2015). Outros fatores incluem baixas concentrações de vitamina D (HYPPONEN *et al.*, 2001), exposição pré-natal a poluentes, hábitos de higienização e condições de vida que diminuem infecção nas crianças em países com alto padrão socioeconômico resultando no aumento de doenças autoimunes (hipótese de higiene), nutrição infantil precoce como uso de formulações constituídas de leite de vaca ao invés de amamentação (KNIP *et al.*, 2010) em adição à resistência à insulina no início da infância devido à obesidade ou aumento da velocidade de crescimento em altura.

O DM1 frequentemente se desenvolve repentinamente e pode produzir sintomas tais como polidipsia, poliúria, enurese, falta de energia, cansaço extremo, polifagia, perda súbita de peso, feridas de cicatrização lenta, infecções recorrentes e visão turva com severa desidratação e cetoacidose diabética em crianças e adolescentes (CRAIG *et al.*, 2014). Os sintomas são mais severos em crianças quando comparados aos adultos (CHIANG *et al.*, 2014). Esses pacientes também estão susceptíveis a outras doenças autoimunes, tais como doença de Graves, tireoidite de Hashimoto, doença de Addison, vitiligo, doença celíaca, hepatite autoimune, miastenia grave e anemia perniciosa (ADA, 2018).

3.1.1.2 Diabetes mellitus tipo 2 (DM2)

O DM2 é o tipo mais comum de diabetes, sendo conhecido como DM não insulino-dependentes ou DM do adulto (EVANS *et al.*, 2000, BRUNO *et al.*, 2005, HOLMAN *et al.*, 2015). Mais de 90%-95% dos pacientes com DM pertencem a este grupo e a maioria deles é adulta. O Brasil possuía 13 milhões de pacientes com DM com idades entre 20 a 79 anos em 2017 (IDF, 2017). Mas tem sido documentado um aumento de DM2 entre adolescentes no início do século XXI, particularmente na América do Norte e Ásia. Mudanças no estilo de vida e alteração de padrões de alimentação entre os adolescentes sustentam este prognóstico (COCKRAM, 2000, FAGOT-CAMPAGNA *et al.*, 2000, DABELEA *et al.*, 2014).

A resistência à insulina no DM2 aumenta a demanda de insulina nos seus tecidos alvos. Em adição a essa resistência, o aumento da demanda para insulina pode ou não ser atendido pelas células β pancreáticas devido a defeitos na função destas células (HALBAN *et al.*, 2014). Por outro lado, a secreção de insulina diminui com o aumento da sua demanda, com o passar do tempo devido à destruição

gradual de células β (DRUET *et al.*, 2006) o que pode transformar alguns pacientes DM2 independentes de insulina a dependente desse hormônio. A dependência da insulina constitui uma das maiores diferenças do DM1. Outra diferença inclui a ausência de corpos cetônicos na maioria dos DM2 e a ausência da destruição autoimune das células β pancreáticas. Tanto o DM1 como o DM2 possuem predisposição genética, contudo, é mais forte no DM2, mas os genes são mais caracterizados no DM1 (SAADI *et al.*, 2008).

Devido aos sintomas brandos do DM2 no início da doença, seu diagnóstico usualmente é atrasado por anos, especialmente em países em que não possuem a cultura de realizar a triagem regular sem sintomas. Este atraso no diagnóstico pode aumentar a incidência das complicações à longo prazo do DM2, uma vez que a hiperglicemia não é tratada durante este período sem o diagnóstico.

Em adição ao DM, a resistência à insulina apresenta várias manifestações que incluem a obesidade, nefropatia, hipertensão, dislipidemia (hipertrigliceridemia, baixo HDL-C, diâmetro diminuído da partícula de LDL-C, aumento da lipemia pós-prandial e acúmulo de lipoproteínas remanescentes), hiperandrogenismo ovariano e adrenarca prematura, fígado gorduroso não-alcóolico e inflamação sistêmica (ROSENBLOOM *et al.*, 2009, KRAEMER, GINSBERG, 2014).

A presença do DM2 em crianças e adolescentes que não são obesos (RAMACHANDRAN *et al.*, 2003, WEI *et al.*, 2003, SUGIHARA *et al.*, 2005), severa desidratação ocasional e presença de corpos cetônicos em alguns pacientes com DM2 (ADA, 2000), pode resultar na classificação errônea como DM1. Alguns pacientes com muitas características de DM2 também podem apresentar características do DM1, incluindo presença de autoanticorpos contra as células pancreáticas ou autoanticorpos contra GAD65 e são classificados como um grupo distinto de tipo de diabetes denominado diabetes autoimune latente no adulto (LADA) (POZZILLI, DI MARIO, 2001). Pessoas diagnosticadas com LADA não requerem tratamento com insulina. Um estudo reportou que 7,1% dos pacientes DM2 Europeus com idade média de 62 anos apresentaram positividade para autoanticorpos contra GAD e a prevalência do LADA foi maior em pacientes que foram diagnosticados com DM em idades mais jovens. A classificação do LADA com um tipo distinto de DM ainda é controversa (LESLIE *et al.*, 2008, ROSENBLOOM *et al.*, 2009, ROLANDSSON, PALMER, 2010, REDONDO, 2013).

3.1.2 Diagnóstico do Diabetes Mellitus

O diabetes pode ser diagnosticado baseando-se no critério da glicose plasmática, devido às alterações da glicose plasmática de jejum, ou glicemia 2 horas pós-sobrecarga de 75 g de glicose por via oral, ou hemoglobina glicada (HbA1c) (Tabela 1).

Tabela 1 - Critérios para o diagnóstico de DM e caracterização de risco para DM

	Diabetes	Risco para DM
Hemoglobina glicada (HbA1c) O teste deve ser realizado com método padronizado e certificado pelo NSGP e padronizado pelo ensaio do DCCT	$\geq 6,5\% \dagger$	5,7-6,4%
Glicemia em Jejum Jejum definido como ausência de ingestão de alimentos calóricos por no mínimo 8 horas	$\geq 126\text{mg/dL}$	100-125mg/dL
Glicemia 2h após TOTG O teste deve ser realizado conforme orientações do WHO, usando sobrecarga de glicose com 75g de glicose anidra dissolvida em água.	$\geq 200\text{mg/dL}$	140-199mg/dL
Glicemia ao acaso Este critério diagnóstico deve ser associado a sintomas clássicos de hiperglicemia ou crise hiperglicêmica.	$\geq 200\text{mg/dL}$	

LEGENDA: TOTG: Teste Oral de Tolerância a Glicose; HbA1c: hemoglobina A1c; NSGP: *National Glycohemoglobin Standardization Program*; DCCT: *Diabetes Control and Complications Trial*.

*Na ausência de uma glicemia inequívoca os resultados devem ser confirmados por repetição do teste. †O valor inferior à 6,5% não exclui o diagnóstico de diabetes utilizando teste de glicose.

Fonte: Modificado de SBD (2017) e ADA (2018).

É reconhecido um grupo intermediário de indivíduos nos quais as concentrações glicêmicas não preenchem os critérios para o diagnóstico de DM. Quando o indivíduo apresenta ausência de sintomas ou presença de sintomas brandos ou atípicos de diabetes ou até a detecção de hiperglicemia em condições de estresse causado por infecção aguda, trauma, alterações circulatórias ou outros, podendo ser transitória, pode apresentar um diagnóstico incorreto. Em situações de diagnóstico incerto não se deve basear apenas em uma única dosagem, mas sim observando a glicemia em jejum e a glicemia 2 h pós-prandial e/ou glicemia 2 h no

teste de tolerância a glicose com ingestão de 75g de glicose oral (SBD, 2017, ADA, 2018).

Os critérios utilizados para o diagnóstico do DM se baseiam na associação das concentrações glicêmicas, HbA1c e outras complicações associadas ao diabetes (WARREN *et al.*, 2017, ADA, 2018). A hiperglicemia acessada pela glicemia em jejum e glicemia do teste de tolerância oral à glicose (TOTG) apenas fornece a concentração plasmática de glicose de um único ponto temporal. Assim, há necessidade de testá-los mais de uma vez. Além disso, a complexidade da condição clínica não pode ser totalmente descrita pela concentração de glicose plasmática.

A dosagem de HbA1c é mais confiável que as concentrações plasmáticas em jejum, uma vez que indica as concentrações de glicose durante várias semanas e é melhor correlacionada com as complicações crônicas. A dosagem de HbA1c não requer jejum e possui uma melhor estabilidade analítica que a glicose plasmática. A hiperglicemia é o principal fenômeno associado ao DM, o qual posteriormente resulta na elevação das proteínas glicadas como a HbA1c. Contudo, existe um intervalo de tempo entre o estabelecimento de hiperglicemia e aumento da concentração da hemoglobina glicada, resultando no atraso do diagnóstico no início do DM utilizando as concentrações da HbA1c. A padronização da dosagem da HbA1c é requerida, enquanto que a dosagem de glicose é padronizada e de fácil implementação. Assim, estes biomarcadores utilizados correntemente possuem limitações. Além disso, estes biomarcadores clássicos são úteis apenas após o estabelecimento da doença e falham na predição da doença na condição pré-diabética. Prognóstico da doença nos estágios iniciais e predição populacional de maior risco requerem a identificação de marcadores específicos que sejam sensíveis o suficiente para detectar os estágios iniciais da doença. Biomarcadores que pudessem prever o risco da doença seriam úteis para o desenvolvimento de terapias preventivas e proativas para indivíduos que se encontram em alto risco de desenvolvimento do DM (VAISHYA *et al.*, 2018).

3.2 NOVOS BIOMARCADORES DE DIAGNÓSTICO E RISCO PARA O *DIABETES MELLITUS*

O desenvolvimento do DM envolve múltiplos fatores, sendo eles: genéticos, de resistência à insulina, glucotoxicidade, lipotoxicidade, liberação prejudicada de

incretina, acúmulo de amilina, inflamação, estresse oxidativo e diminuição da massa de células β pancreática que resulta na sua disfunção (FESTA *et al.*, 2004, ABDUL-GHANI *et al.*, 2006a, ABDUL-GHANI *et al.*, 2006b).

Existem várias maneiras pelas quais as variantes genéticas podem mecanicamente contribuir para traços e doenças humanas. O exemplo melhor compreendido envolve uma mudança na sequência de nucleotídeo de um gene que perturba a função gênica e resultam em fenótipos dramáticos com padrão de herança Mendeliana altamente preditiva. As variantes genéticas que causam doenças através da alteração da regulação da expressão de um gene também podem causar efeitos que recapitulam uma perda de função gênica. Alguns dos primeiros exemplos descritos de tais mecanismos reguladores de doenças humanas envolvem rearranjos genômicos em larga escala que alteram o acoplamento de elementos reguladores a promotores (KLEINJAN,LETTICE, 2008). Tais rearranjos podem causar tanto uma perda de regulação gênica como uma perda de função proteica, ou um ganho de regulação gênica devido ao acoplamento de novos alvos aos elementos regulatórios gênicos. Mudanças menos dramáticas, tais como polimorfismo de único nucleotídeo (*Single Nucleotide Polymorphisms* - SNPs) podem também perturbar a regulação dos genes e influenciar as características e doenças. Inclusive, as variantes genéticas têm sido associadas com alterações em quase todos os passos chave conhecidos na regulação gênica. Nesses casos, os efeitos sobre a regulação gênica e sobre o fenótipo ou doença são tipicamente quantitativos, alterando sutilmente um fenótipo ou modulando o risco para uma doença (CONSORTIUM, 2015).

Estudos têm mostrado que os mecanismos regulatórios que contribuem para doenças individuais têm potencial considerável para melhorar a saúde humana por permitirem o desenvolvimento de novos marcadores de diagnóstico, melhorando tomada de decisão clínicas e novas terapêuticas. Como os estudos de associação gênica podem identificar a localização de variantes genéticas causais para uma região estreita do genoma humano, eles são um ponto de partida excepcional para a investigação mecanística (VOCKLEY *et al.*, 2017).

Além disso, como a taxa na qual os estudos de associação genética foram concluídos ultrapassou por muito tempo a taxa na qual os mecanismos subjacentes foram determinados, há um acúmulo de milhares de associações genéticas sem um

mecanismo causal conhecido. Esse atraso cria um enorme potencial para entender e tratar doenças humanas (VOCKLEY *et al.*, 2017).

3.2.1 Biomarcadores para diagnóstico do Diabetes mellitus

Hemoglobina A1c (HbA1c) tem sido a dosagem padrão utilizada para monitorar o controle glicêmico na prática clínica e é rotineiramente ensaiado em pacientes com DM. Em adição à glicemia de jejum e glicemia 2 horas após sobrecarga com 75 g de glicose (TOTG), a Sociedade Americana de Diabetes (ADA), Associação Europeia para Estudo do Diabetes (EASD) a Organização Mundial de Saúde (WHO), e outras organizações do diabetes recomendam o uso da HbA1c para o critério diagnóstico do DM (WHO/IDF, 2006, RYDEN *et al.*, 2013, IDF, 2014, ADA, 2018, AMERICAN DIABETES, 2018)

A primeira recomendação foi em 2009 para a adição da HbA1c como critério diagnóstico foi controversa, principalmente por causa das limitações do seu ensaio (SACKS, 2011, INZUCCHI, 2012, SACKS, 2013).

Atualmente os ensaios já são mais padronizados e existe um crescente interesse em biomarcadores plasmáticos de hiperglicemia, incluindo frutossamina, albumina glicada e 1,5 Anidroglucitol (1,5-AG), para serem utilizados como alternativas ou em conjunto com os biomarcadores tradicionais (GOLDSTEIN *et al.*, 2004, TRUE, 2009, RASTOGI KALYANI,WALKER HARRIS, 2014). Estes biomarcadores podem superar as limitações da HbA1c em certos pacientes, poderiam complementar as dosagens tradicionais na clínica por fornecerem informação adicional no controle glicêmico à curto prazo, e poderiam melhorar a estratificação de risco para o DM e suas complicações (PARRINELLO,SELVIN, 2014).

O 1,5-AG, um monossacarídeo da dieta, tem sido sugerido como um marcador de diabetes. Como os túbulos proximais nos rins possuem maior afinidade pela glicose do que pelo 1,5-AG, altas concentrações de glicose impedem a reabsorção de 1,5-AG, resultando em sua elevada excreção urinária. Assim, as concentrações plasmáticas de 1,5-AG estão inversamente correlacionadas com as concentrações plasmáticas de glicose (BUSE *et al.*, 2003). Buse e colaboradores (2003) mostraram que a concentração plasmática de 1,5-AG foi maior no grupo controle, seguida pelo grupo de pré-diabéticos e pelo grupo diabético,

respectivamente. Alguns estudos, encontraram relação inversa do 1,5-AG com glicemia 2 horas após sobrecarga com 75 g de glicose (TOTG) (YAMANOUCI *et al.*, 1988, YAMANOUCI,AKANUMA, 1994). Estudos também demonstraram uma relação inversa entre o 1,5-AG com a HbA1c e com a glicemia em jejum (YAMANOUCI *et al.*, 1989).

Similarmente à frutossamina, o 1,5-AG pode ser um biomarcador útil para refletir as concentrações de glicose 10-14 dias que precedem a coleta da amostra (YAMANOUCI,AKANUMA, 1994). O 1,5-AG é estável, reprodutivo, e menos custoso quando comparado com outros testes glicêmicos de diagnóstico (YAMANOUCI,AKANUMA, 1994). Pode ser útil para identificar valores de glicemias pós-prandiais e indivíduos com risco de complicações, uma vez que 1,5-AG foi associado à retinopatia e eventos micro e macro vasculares no DM. Contudo, não está claro se 1,5-AG é superior à HbA1c. As concentrações plasmáticas de 1,5-AG podem mudar com a dieta e conforme o gênero (KIM,PARK, 2013, Y. WANG *et al.*, 2017) e raça (HERMAN *et al.*, 2009). As concentrações de 1,5-AG também são afetadas pela hemodinâmica renal e com tratamento com inibidores do co-transportador de glicose e sódio (BALIS *et al.*, 2014, HASSLACHER,KULOZIK, 2016).

Embora apenas estudos em Asiáticos tenham sido realizados para avaliar a eficácia do 1,5-AG para o diagnóstico do DM (YAMANOUCI *et al.*, 1991, TSUKUI,KOBAYASHI, 1995, GOTO *et al.*, 2011), parece que há limitações (ROBERTSON *et al.*, 1993).

3.2.2 Biomarcadores genéticos de risco para o Diabetes mellitus

As designações desatualizadas do DM1 como diabetes juvenil e DM2 como diabetes de início adulto refletem o paradigma categórico incorreto que tem impedido a capacidade dos clínicos de diagnosticar corretamente casos discrepantes, causando atrasos desnecessários na instituição da terapia apropriada. As distinções baseadas na idade entre as duas formas mais comuns de diabetes tornou-se cada vez mais desfocada, uma vez que o DM2 tem se tornado mais frequente em idades mais jovens e o diabetes autoimune na idade adulta já é bem reconhecida. No entanto, a identificação de diabetes autoimune (DM1 ou LADA) depende muito da astúcia dos clínicos e da disponibilidade de testes de

autoanticorpos. Assim, o diagnóstico do diabetes autoimune é muito frequentemente feito tardiamente, depois que um paciente com deficiência absoluta de insulina secundária à destruição autoimune das células β desenvolveu cetoacidose que causa risco à vida no paciente, enquanto inadequadamente manejado com drogas anti-hiperglicêmicas orais. Essa barreira histórica para o diagnóstico de diabetes autoimune na vida adulta é agravada pelo uso disseminado de insulina em diabetes grave ou avançado, o que pode mascarar a presença de um processo autoimune em pacientes adultos, os protegendo contra a cetoacidose. Além disso, o teste para autoanticorpos nem sempre é feito no momento do diagnóstico, devido ao seu baixo valor preditivo positivo no contexto da prevalência relativamente baixa de diabetes autoimune em adultos. Assim, a verdadeira prevalência do diabetes autoimune em adultos não é conhecida com certeza, porque muitos casos ocultos podem existir entre pacientes que se acredita terem DM2 (FLOREZ, 2018).

Thomas e colaboradores (2018) descreveram um método genético inovador para estimar a prevalência do diabetes autoimune em pessoas acima de 30 anos de idade. Sua abordagem foi beneficiada pela explosão da descoberta genética na última década, a qual resultou na identificação de mais de 50 *loci* robustamente associados ao DM1 (REDONDO *et al.*, 2017). As identificações destes loci permitiram a construção de escores de risco genéticos, os quais fornecem uma estimativa bastante precisa do risco genético global através da soma dos alelos de risco agregados do DM1 em um indivíduo (incluindo variantes correlacionadas com os haplótipos de risco HLA) (WINKLER *et al.*, 2014, ORAM *et al.*, 2016, REDONDO *et al.*, 2018). Inclusive, em um estudo prévio realizado por Oram e colaboradores foi demonstrado que o escore de risco genético para o DM1, dependendo onde o limiar for estabelecido ao longo da escala quantitativa, pode tanto excluir 95% das pessoas sem DM1 ou capturar 95% das pessoas com DM1. Mas, como em doenças complexas a carga genética tem penetrância incompleta, o escore de risco genético simplesmente serve como uma métrica de probabilidade (ORAM *et al.*, 2016).

Esta habilidosa aplicação genética possibilita o estabelecimento de uma aproximada estimativa do diabetes autoimune em adultos. No entanto, isso não sugere que o escore de risco genético para o DM1 possa ser usado dessa forma para diagnosticar diabetes autoimune em indivíduos, isto porque o DM2 é muito mais prevalente em adultos do que o autoimune, e a maioria dos adultos mais velhos com escore de risco genético para o DM1, ainda terá DM2. Entretanto, se o

escore de risco genético para o DM1 for baixo, é improvável que o paciente tenha diabetes autoimune, mostrando como uma ferramenta genética pode ajudar a excluir um diagnóstico de forma mais eficaz do que o uso de testes de autoanticorpos ou haplotipagem de HLA.

Mais genericamente, o estudo de Thomas e colaboradores (2018) mostra que um esforço em conjunto para promover a descoberta genética avançada de características complexas podendo traduzir-se em resultados úteis uma vez que estas descobertas atinjam massa crítica, que o material genético se torna cada vez mais disponível através de recursos clínicos, os dados estão sendo disponibilizados aos investigadores e, usuários inquisitivos e inteligentes são capacitados para testar hipóteses. Espera-se que este tipo de inquérito continue a facilitar progresso em muitas outras doenças complexas (FLOREZ, 2018).

O DM é uma doença complexa que envolve uma ampla variedade de fatores genéticos e ambientais. Nos últimos anos, muitos estudos se focaram na elucidação do largo espectro de genes que desempenham papéis no mecanismo molecular do desenvolvimento do DM (FRAYLING, 2007, OWEN, MCCARTHY, 2007, BRUNETTI *et al.*, 2014). Contudo, apesar do vasto fluxo de informação, incluindo identificação de mutação em vários genes e um grande número de polimorfismos em vários genes envolvidos nas vias metabólicas que afetam as concentrações de glicose, o exato mecanismo do DM permanece elusivo (DORIA *et al.*, 2008, AHLQVIST *et al.*, 2011). Evidentemente, a maior complicação é o fato que uma mutação em um único gene ou um polimorfismo não resultará no mesmo efeito entre diferentes indivíduos e dentro de uma mesma população ou diferentes populações. Esta variação é diretamente ou indiretamente afetada pelo contexto genético global do indivíduo, família ou níveis populacionais que são potencialmente mais complicados pela interação com fatores modificadores ambientais que são altamente variáveis (LYSSENKO *et al.*, 2008, STAIGER *et al.*, 2009).

Estudos de associação genômica ampla (GWAS) e metanálises subsequentes identificaram mais de 100 *loci* de suscetibilidade para DM2 (LANGENBERG, LOTTA, 2018) que coletivamente explicam 10% do risco de doença (MCCARTHY, 2010, SHU *et al.*, 2010, YAMAUCHI *et al.*, 2010, KOONER *et al.*, 2011, CHO *et al.*, 2012) e 61 *loci* associados ao DM1 (RAM, MORAHAN, 2017). Embora os GWAS tenham melhorado muito nossa compreensão da base genética, a maioria desses estudos em DM2 foi realizada em europeus (BUSTAMANTE *et al.*,

2011) e em DM1 em brancos não hispânicos (DABELEA *et al.*, 2014). Diferenças interpopulacionais nas frequências alélicas e tamanhos de efeito têm proporcionado a descoberta de novos *loci* em diferentes populações (MCCARTHY, 2011).

3.3 RECEPTOR DE PRODUTOS FINAIS DE GLICAÇÃO AVANÇADA (RAGE)

O receptor de produtos finais de glicação avançada (RAGE) é uma glicoproteína transmembrana que se apresenta como um membro da superfamília das imunoglobulinas (Ig) dos receptores de superfície celular devido a presença de múltiplos domínios similares às Igs na sua região extracelular (Figura 2) (NEEPER *et al.*, 1992).

A região extracelular contém três domínios das Igs, incluindo domínio tipo V, um domínio tipo C1 e um domínio tipo C2. Foi mostrado que a ligação dos ligantes ocorre predominantemente no domínio V (FRITZ, 2011). A região extracelular pode ser dividida em dois subdomínios principais, a unidade estrutural formada entre os domínios V e C1 (VC1) conectada ao domínio C2 por um conector constituído de sete aminoácidos. O domínio VC1 apresenta carga líquida positiva devido ao alto conteúdo de resíduos de lisina e arginina no domínio V. Isto forma um pequeno trecho positivo na superfície de VC1 (KOCH *et al.*, 2010). Inclusive, o domínio V de RAGE contém mais arginina e lisina que qualquer outro domínio V de Ig (KOCH *et al.*, 2010, FRITZ, 2011).

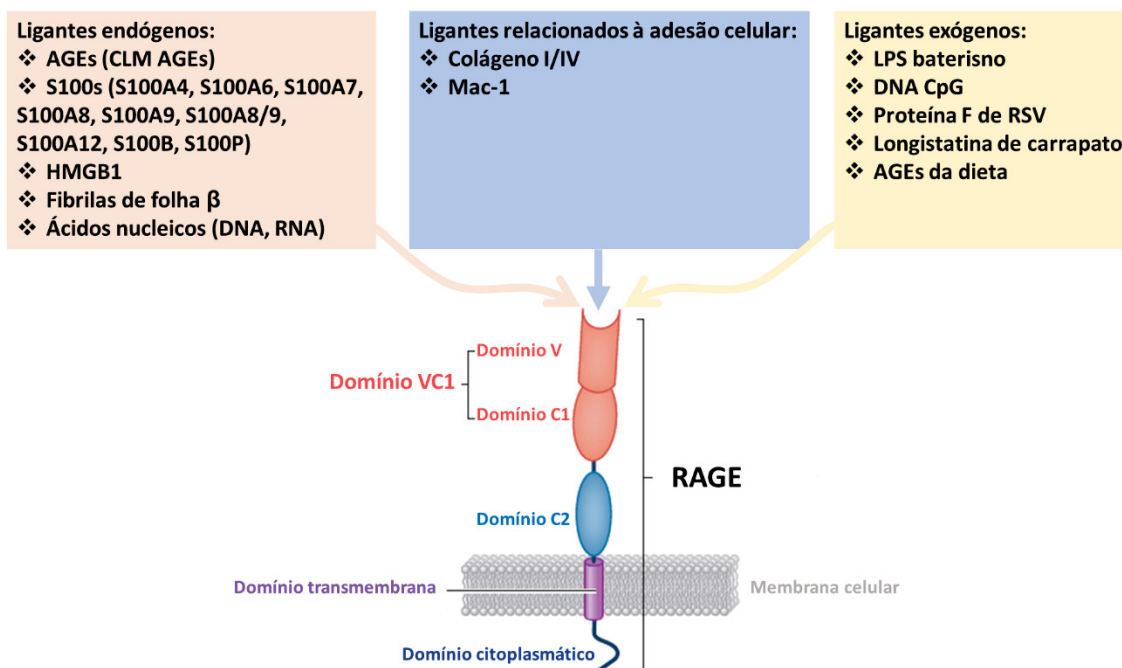


Figura 2 – **Representação esquemática do RAGE e seus principais domínios.** O RAGE é composto por uma região extracelular que contém três domínios das imunoglobulinas (Ig), um único domínio transmembrana, e um citoplasmático. Os domínios Ig são o domínio tipo V, tipo C1 e tipo C2. Estudos estruturais revelaram que os domínios V e C1 são conectados para forma o domínio VC1 (mostrado em vermelho claro) e conectados ao domínio C2 (mostrado em azul) por um curto segmento de aminoácidos que atuam como um ligante flexível. RAGE liga-se a diversas classes de ligantes, inclusive de natureza endógena (padrão molecular associado à dano e proteínas relacionadas a adesão) e exógena (padrão molecular proteínas associado à patógenos e AGEs da dieta). A maioria dos ligantes do RAGE liga-se no domínio extracelular V ou VC1.
Fonte: Adaptado de Hudson e Lioppman (2018)

Em contraste, a região do domínio C2 próximo à membrana é composta por aminoácidos ácidos e exibe carga negativa na sua superfície (KOCH *et al.*, 2010, FRITZ, 2011). A região extracelular é seguida por uma única região transmembrana e um curto e altamente carregado domínio citoplasmático, o qual é crítico para a sinalização (HUDSON *et al.*, 2008, KALEA *et al.*, 2009).

Estudos de homologia revelaram que RAGE está presente apenas em mamíferos e possui alta homologia com genes que codificam para as imunoglobulinas e moléculas de adesão celular (SESSA *et al.*, 2014). Estas moléculas possuem muitas funções, incluindo atuar como receptores para ligação dos ligantes sinalizadores (CAVALLARO, DEJANA, 2011).

AGE inicialmente foi identificado por sua capacidade de se ligar e mediar os efeitos subjacentes das complicações diabéticas dos produtos finais de glicação avançada (AGEs) (KALEA *et al.*, 2009). A formação dos AGEs ocorre durante o envelhecimento e em uma taxa acelerada em condições de hiperglicemia e estresse oxidativo, como no DM (KALEA *et al.*, 2009). Os AGEs são um grupo de moléculas

que são formadas através de uma reação não enzimática entre açúcares redutores e proteínas, lipídeos e DNA (BROWNLEE, 1995). Esta reação também é conhecida como reação de Maillard, glicação não enzimática que resulta na formação de produtos inicialmente reversíveis, denominados de bases de Schiff e produtos de Amadori (BROWNLEE, 1995). Os produtos de Amadori, subsequentemente, sofrem uma série de reações estruturais e oxidativas formando os AGEs, que são altamente estáveis e irreversivelmente ligados (BROWNLEE, 1995). Os AGEs são prevalentes na vasculatura diabética e contribuem para as complicações microvasculares e macro vasculares através da formação de reação cruzada com proteínas estruturais da membrana basal e pela ligação ao RAGE (NEEPER *et al.*, 1992, KALEA *et al.*, 2009). Enquanto estes AGEs extracelulares se formam em uma baixa taxa no colágeno da membrana basal e nas lentes do cristalino (BROWNLEE, 1995), os AGEs intracelulares que se originam de intermediários glicolíticos podem ser formados mais rapidamente (THORNALLEY *et al.*, 1999), e incluem o N epsilon-(carboximetil)lisina (CML) e N epsilon-(carboxietil)lisina (CEL). O CML é o mais prevalente AGE em pacientes diabéticos e foi demonstrado que se liga à RAGE (KISLINGER *et al.*, 1999). Inicialmente acreditava-se que RAGE era um receptor tipo *scavenger* de AGE, atuando como um mecanismo de eliminação e degradação (NEEPER *et al.*, 1992). Contudo, atualmente se aceita que RAGE atua como um receptor de sinalização causando alterações na expressão gênica e propriedades celulares (KALEA *et al.*, 2009, FRITZ, 2011).

RAGE caracteriza-se por ser um receptor multiligante sendo capaz de interagir não só com os AGEs, mas também com outras moléculas envolvidas na homeostase e em processos inflamatórios, com as proteínas de alta mobilidade Box-1 (HMG-box 1), fibrilas β -amilóides, S100/calgranulina, e com a anfoterina (NEEPER *et al.*, 1992, SCHMIDT *et al.*, 1992, LINDSEY *et al.*, 2009, VAN ZOELLEN *et al.*, 2009). Devido a sua habilidade de se ligar a diversas classes de moléculas endógenas e exógenas não relacionadas, RAGE recebeu a designação de receptor de reconhecimento de padrão (PRR) (CHAVAKIS *et al.*, 2003).

A principal característica que os ligantes de RAGE têm em comum é que estes ligantes contêm regiões de alta carga negativa e podem formar estruturas multiméricas. Portanto, não é surpresa que a maioria dos ligantes de RAGE se ligue ao domínio VC1 que é carregado positivamente (FRITZ, 2011). Parece que a forma multimérica de RAGE é a forma predominante para mediar ligação aos seus

ligantes, e ocorre predominantemente no domínio VC1, que facilita a ligação do ligante através da combinação dos resíduos carregados positivamente e o bolsão hidrofóbico criado pelo homodímero VC1 (Figura 3) (FRITZ, 2011). A dimerização de RAGE ocorre de maneira multimodal dependendo dos resíduos de aminoácidos nos domínios V e transmembrana (ZONG *et al.*, 2010, YATIME,ANDERSEN, 2013). Aparentemente RAGE é pré-montado para formar multímeros constitutivos na superfície celular que consistem de quatro ou mais moléculas RAGE, antes da presença e ligação do ligante (FRITZ, 2011, KIERDORF,FRITZ, 2013). Monômeros RAGE apresentam fraca afinidade por ligantes monoméricos, tem sido proposto que a multimerização de RAGE é necessária para ligação aos ligantes agregados observados na resposta inflamatória (FRITZ, 2011, KIERDORF,FRITZ, 2013).

Devido a forte natureza eletrostática dos multímeros de ligante-RAGE, foi proposto que esses complexos receptor-ligantes estejam fortemente ligados e levem à ativação sustentada da sinalização do ligante RAGE (FRITZ, 2011, KIERDORF,FRITZ, 2013).

Esse receptor é expresso em baixos níveis na maioria dos órgãos, exceto no pulmão (FEHRENBACH *et al.*, 1998). Em condições de inflamação crônica e sustentada, a sinalização através de RAGE é ativada, levando ao desenvolvimento e progressão de estados patológicos incluindo a complicação vascular diabética, doença cardiovascular, câncer, doença de Alzheimer e uma variedade de doenças inflamatórias induzidas pelo hospedeiro e por patógeno (KALEA *et al.*, 2009, KIERDORF,FRITZ, 2013). Também RAGE emergiu como reguladora chave da resposta de imunidade inata (YAMAMOTO *et al.*, 2011, SIROIS *et al.*, 2013, SURESH,MOSSER, 2013, TIAN *et al.*, 2013, ANISUZZAMAN *et al.*, 2014).

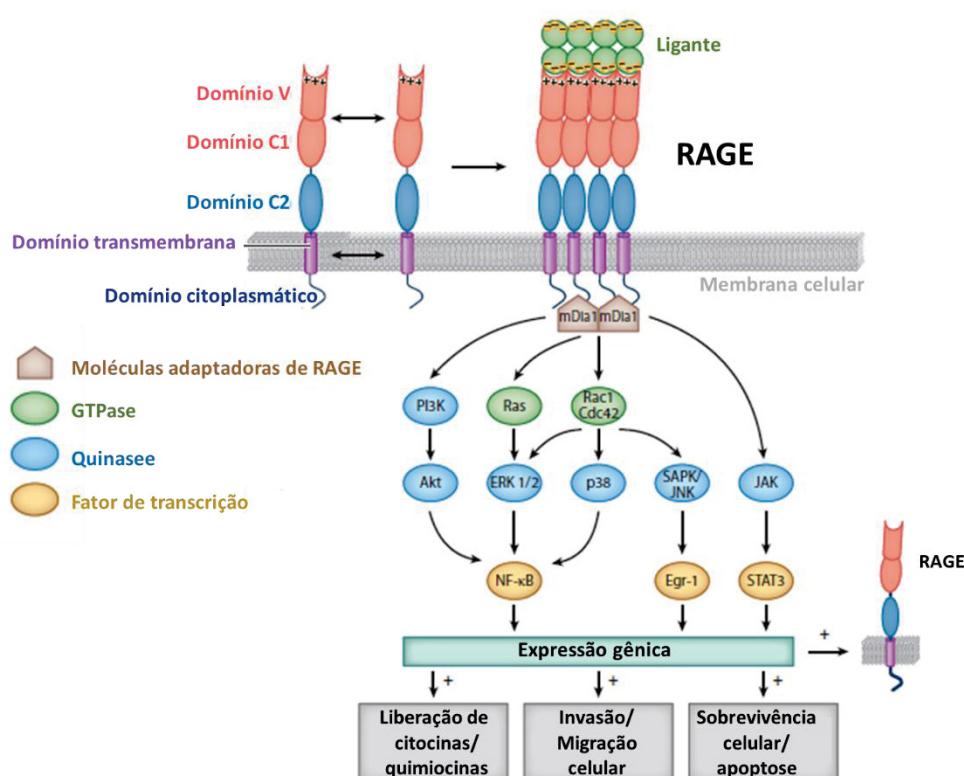


Figura 3 – **Ativação da sinalização via RAGE.** A pré-montagem de RAGE em dímeros ou multímeros é necessária para RAGE ativar as vias de sinalização levando a mudanças na expressão gênica e função celular. RAGE multimérico liga aos ligantes através da interação eletrostática entre o domínio VC1 carregado positivamente e as propriedades carregadas negativamente dos ligantes. Após a ligação do ligante, alterações conformacionais no domínio intracelular do RAGE permitem a interação com seus parceiros intracelulares, incluindo mDia1 (mostrado em marrom). A sinalização de RAGE ocorre através das GTPases Rho (mostrado em verde) e quinases (mostrado em azul) que ativa fatores de transcrição (mostrado em caramelo). A ativação por RAGE destas vias de sinalização resulta na mudança de expressão gênica e alteração da função celular, incluindo migração, sobrevivência, inflamação, e ativação da expressão de RAGE.
Fonte: Adaptado de Hudson e Lioppman (2018)

As vias de sinalização através de RAGE são governadas por muitos fatores, incluindo os ligantes e o tipo de célula envolvida, a concentração do ligante, formas multiméricas de ligantes, a presença de múltiplos ligantes de RAGE, e presença de outros receptores de reconhecimento de padrões (PRR) que possam também se ligar a estes ligantes (KALEA *et al.*, 2009, KIERDORF,FRITZ, 2013). RAGE ativa várias vias de sinalização intracelular, incluindo proteínas (MAP) quinases ativadas por mitógenos (ERK 1/2, p38, SAPK/JNK), STAT3 (*signal transducer and activator of transcription 3*), Akt (*murine thymoma viral oncogene*), Rho (*Ras homolog gene family, member*) GTPases (Rac1 - *Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1*, Cdc42 - *Cell division control protein 42 homolog*). Estes por sua vez ativam fatores de transcrição, incluindo NF-κB (*nuclear factor kappa-light-chain enhancer of activated B cells*), EGR-1 (*early growth response protein 1*), e SP-1 (*Specificity*

Protein 1) (KALEA *et al.*, 2009, KIERDORF,FRITZ, 2013, ROUHAINEN *et al.*, 2013). Estas vias resultam na expressão de genes inflamatórios, incluindo VCAM-1 (*vascular cell adhesion molecule 1*), IL-6 (*Interleucina 6*), TNF- α (*Tumor necrosis factor- α*), e outros moduladores imunes (Figura 3) (KALEA *et al.*, 2009, KIERDORF,FRITZ, 2013, ROUHAINEN *et al.*, 2013). O domínio citoplasmático de RAGE é uma região curta de 43 aminoácidos que não compartilha homologia com outros domínios citoplasmáticos de receptores e não ancora atividade de tirosina quinase endógena de receptor (HUDSON *et al.*, 2008). Parece que RAGE ativa a sinalização através de ligação de proteínas adaptadoras que incluem diáfano-1/mDia1 (*Diaphanous-related formin-1*), ERK1/2, PKC ζ (*Protein kinase C, zeta*), TIRAP (*toll-interleukin 1 receptor domain containing adaptor protein*), e DOCK7 (*Dedicator Of Cytokinesis 7*) (ISHIHARA *et al.*, 2003, HUDSON *et al.*, 2008, SAKAGUCHI *et al.*, 2011, YAMAMOTO *et al.*, 2013).

Atualmente, o único ligante direto descrito do domínio citoplasmático RAGE é o mDia1 (HUDSON *et al.*, 2008, RAI *et al.*, 2012). O domínio citoplasmático de RAGE pode ser fosforilado por PKC ζ , o que regula a ativação das proteínas quinases (SAKAGUCHI *et al.*, 2011). Contudo pouco é conhecido sobre as consequências funcionais desta modificação pós-traducional.

O gene *RAGE* localizado no cromossomo 6p21.3 na região do complexo principal de histocompatibilidade (*Major Histocompatibility Complex – MHC*) de classe III, consiste de 11 exons e 10 íntrons e uma UTR 3' (região não traduzida) e uma região franqueadora 5' (SUGAYA *et al.*, 1994, KALEA *et al.*, 2011) (Figura 4).

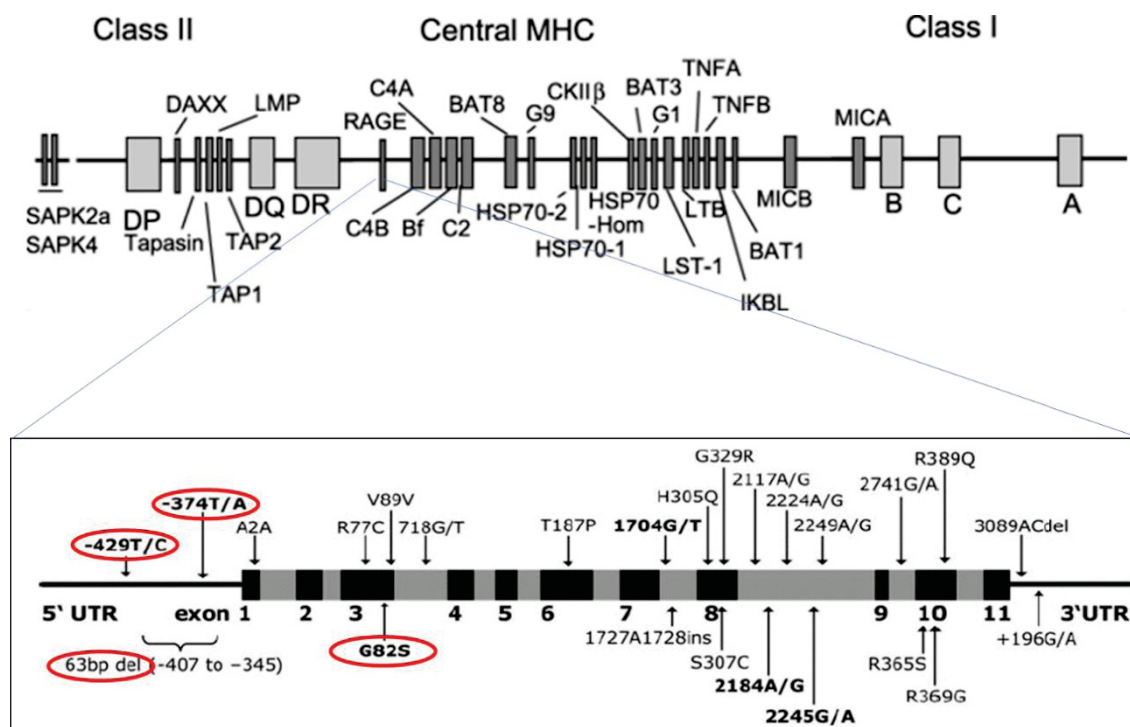


Figura 4 – Representação dos genes localizados na região do MHC e localização dos polimorfismos identificados no gene *RAGE*. Os círculos vermelhos indicam os polimorfismos estudados sendo estes na região promotora do gene

Fonte: Adaptado de Price e colaboradores (2001) e Kanková e colaboradores (2005).

Estudos têm demonstrado que ocorre extensiva variabilidade genética dentro do gene *RAGE*, com aproximadamente 30 polimorfismos (HUDSON *et al.*, 1998, HUDSON *et al.*, 2001a, KANKOVA *et al.*, 2001b). Tem se dado atenção particular aos quatro polimorfismos funcionais, a variante Gly82Ser (rs2070600) e três variantes na região promotora do gene *RAGE*, -374T>A (rs1800624), -429T>C (rs1800625) e Del 63 pb (-407 a -345 pb) (HUDSON *et al.*, 1998, HUDSON *et al.*, 2001a).

O polimorfismo G82S (rs2070600) está localizado no exon 3 e resulta da substituição de guanina (G) pela adenina (A) na posição 555 (GGC→AGC), gerando uma alteração não-sinônima do resíduo de aminoácido no códon 82, com a substituição de Glicina (G-Gly) por Serina (S-Ser). Essa ocorre próximo ao sítio de N-glicosilação na posição 81 e no domínio V de RAGE envolvido na interação com seus ligantes, sugerindo que esta variante pode afetar sua função (HUDSON *et al.*, 1998).

Foi demonstrado que os polimorfismos -429 T>C (rs1800625), -374 T>A (rs1800624) e a deleção de 63 pb (-407 a -345pb) alteram a expressão do gene *RAGE*, demonstrando exercer efeitos significativos sobre a atividade de transcrição

(HUDSON *et al.*, 2001a). Hudson e colaboradores (2001a) demonstraram que a variante -374A aparentemente previne a ligação de um fator nuclear de ligação aumentando a transcrição do promotor de RAGE *in vitro*.

Resultados conflitantes têm sido reportados em diferentes populações com relação à associação de polimorfismos no gene RAGE e complicações diabéticas (HUDSON *et al.*, 2001a, GLOBOCNIK PETROVIC *et al.*, 2003, JIXIONG *et al.*, 2003, LINDHOLM *et al.*, 2006, KANG *et al.*, 2012) e associados ao DM1 em alguns estudos (PETTERSSON-FERNHOLM *et al.*, 2003, PICHETH *et al.*, 2007c, FORBES *et al.*, 2011, GOMES *et al.*, 2015)

O polimorfismo G82S (rs2070600) tem sido associado ao DM1 (FORBES *et al.*, 2011) e DM2 (KANKOVA *et al.*, 1999, KANKOVA *et al.*, 2001a, YANG *et al.*, 2017) e suas complicações (KUMARAMANICKAVEL *et al.*, 2002, KANKOVA *et al.*, 2005, ZHANG *et al.*, 2009, BALASUBBU *et al.*, 2010, YANG *et al.*, 2013, TRIPATHI *et al.*, 2014), contudo alguns estudos não conseguiram replicar estas associações (HUDSON *et al.*, 1998, YOSHIOKA *et al.*, 2005a, b, NAKA *et al.*, 2006, GAO *et al.*, 2007, GOULART *et al.*, 2008, LU *et al.*, 2008, PENG *et al.*, 2009, UTHRA *et al.*, 2010, BANSAL *et al.*, 2013, KAMAL *et al.*, 2016).

Com relação ao polimorfismo -429T>C foi encontrado correlação com DM1 (PICHETH *et al.*, 2007c), DM2 (YANG *et al.*, 2017), com retinopatia diabética (HUDSON *et al.*, 2001a) e complicações micro e macro vasculares em pacientes DM2 (TRIPATHI *et al.*, 2014), taxa de mortalidade em pacientes em hemodiálise (KALOUSOVA *et al.*, 2010), e risco de doença cardíaca isquêmica (POON *et al.*, 2010), contudo vários estudos não conseguiram replicar as associações em outras populações (GLOBOCNIK PETROVIC *et al.*, 2003, JIXIONG *et al.*, 2003, PETTERSSON-FERNHOLM *et al.*, 2003, KIRBIS *et al.*, 2004, SANTOS *et al.*, 2005, RAMPRASAD *et al.*, 2007, YOON *et al.*, 2007, NG *et al.*, 2012, YANG *et al.*, 2013, GOMES *et al.*, 2015, FRANKO *et al.*, 2016, ZULFIQAR *et al.*, 2018).

O Polimorfismo -374 foi associado com retinopatia diabética não proliferativa (RAMPRASAD *et al.*, 2007, HALDAR *et al.*, 2015), DM2 (TRIPATHI *et al.*, 2014), em pacientes hipertensos com DM2 (YANG *et al.*, 2017). O genótipo AA da variante funcional -374 T>A foi associado com proteção para o desenvolvimento e severidade da doença cardiovascular em indivíduos DM1 (PETTERSSON-FERNHOLM *et al.*, 2003), não diabéticos (FALCONE *et al.*, 2004, FALCONE *et al.*, 2005, FALCONE *et al.*, 2008) e indivíduos DM2 (PICHETH *et al.*, 2007a, TRIPATHI

et al., 2014), redução de risco de isquemia em Afro-Brasileiros com DM2 (SANTOS *et al.*, 2005), restenose após implante de *stent* coronário (FALCONE *et al.*, 2007), desenvolvimento precoce de IAM (infarto agudo do miocárdio) (BOIOCCHI *et al.*, 2011) e maior prevalência de DM, bem como, menor estimativa da taxa de filtração glomerular (KAWAI *et al.*, 2013). Contudo, também foi observado que o alelo A do polimorfismo -374 T>A constitui um fator de risco para nefropatia em DM1 (LINDHOLM *et al.*, 2006, FRANKO *et al.*, 2016) e retinopatia diabética em pacientes DM1 (LINDHOLM *et al.*, 2006) e este resultado foi suportado por outros. Na presença do alelo A foi observado aumento na atividade transcricional na expressão de RAGE em três vezes (HUDSON *et al.*, 2001a) e superexpressão de RAGE em camundongo diabético transgênico duplo que resultou em aumento da albuminúria e glomeruloesclerose (YAMAMOTO *et al.*, 2001).

A deleção de 63 pares de bases na região promotora do gene RAGE (-407 a -354pb) foi associada com nefropatia diabética na população alemã (KARAVANAKI *et al.*, 2009).

3.4 RANTES

Estudos clínicos e experimentais demonstraram que os mecanismos imunológicos e inflamatórios desempenham papéis fundamentais na patogênese do diabetes (BRADLEY *et al.*, 1999, FESTA *et al.*, 2000, HERDER *et al.*, 2005). A expressão de citocinas e quimiocinas alteradas tem sido observada em uma ampla gama de doenças inflamatórias e autoimunes e acredita-se que pode afetar a susceptibilidade, progressão e gravidade da doença (RICHARDSON, CARPENTER, 2007, JAMALI *et al.*, 2013). Além disso, um aumento na síntese de citocinas, quimiocinas e outros mediadores inflamatórios têm sido relatados em condições hiperglicêmicas (MIRHAFEZ *et al.*, 2015).

As quimiocinas são moléculas de baixo peso molecular, caracterizadas pela presença, como um padrão estrutural, de quatro resíduos de cisteína e são divididas em quatro famílias principais (CXC, CC, C e CX3C) de acordo com o número de aminoácidos entre os resíduos das duas cisteínas mais amino-proximais (MACKAY, 1997, YOSHIE *et al.*, 2001). As quimiocinas são conhecidas por induzir a migração, o crescimento e a ativação de leucócitos através de sete receptores de superfície celular hepática, transmissíveis da membrana celular e regulam o tráfico de

leucócitos durante a inflamação (VEILLARD, MACH, 2002). Elas são produzidas por uma variedade de tipos de células, incluindo macrófagos, linfócitos, neutrófilos, células endoteliais vasculares, fibroblastos e queratinócitos (ROSSI, ZLOTNIK, 2000). A ligação de quimiocinas aos seus receptores provoca uma variedade de respostas celulares, incluindo um aumento na concentração de cálcio livre intracelular, ativação da integrina e migração de leucócitos (MURDOCH, FINN, 2000). Isso inclui as quimiocinas como CCL-2 (ou *Monocyte Chemoattractant Protein-1*, MCP-1) e CCL-5 (também conhecido como Regulada em Ativação, T-Cell Normal Expressada e Secreta, ou RANTES) (TELER *et al.*, 2017) e seus respectivos receptores, CCR2, CCR5.

A quimiocina CCL5 ou RANTES é uma proteína de 8 kDa, secretada por muitos tipos de células diferentes, como ECs, SMCs, células T ativadas, macrófagos e plaquetas (VEILLARD, *et al.*, 2004). CCL5 é um potente quimiotático para células T de memória, monócitos e eosinófilos e sua função não é mediada apenas por CCR5, mas também CCR1, CCR3 e outros receptores (YOSHIE *et al.*, 2001). Constatou-se que CCL5 é altamente expresso em linfócitos T ativados, macrófagos, fibroblastos, plaquetas, células mesangiais, células epiteliais, megacariócitos e alguns tumores (YOSHIE *et al.*, 2001, NAVRATILOVA, 2006).

O DM2 é caracterizado pela intercomunicação entre os fatores que mediam tanto a aterosclerose como a inflamação. As concentrações plasmáticas de RANTES são elevadas sistemicamente em indivíduos DM2 em comparação com indivíduos saudáveis e tem sido sugerido que esta elevação seria resultado da hiperglicemia (HERDER *et al.*, 2005).

Alteração da expressão das quimiocinas e seus receptores têm sido observados em uma grande variedade de doenças inflamatórias e autoimunes e acredita-se que pode afetar a susceptibilidade, a progressão e a severidade destas doenças. Recentemente tem sido demonstrado que vários polimorfismos são responsáveis pela alteração da regulação das quimiocinas *in vitro* e *in vivo* (LIU *et al.*, 1999b, AN *et al.*, 2002, HLADIK *et al.*, 2005, MCDERMOTT *et al.*, 2005).

O gene *CCL5* ou *RANTES* humano mapeado no cromossomo 17 (17q11.2-q12) (Figura 8) (YOSHIE *et al.*, 2001) consiste em três exons e dois íntrons (CHU *et al.*, 2007). O gene *RANTES* possui vários polimorfismos conhecidos, incluindo dois polimorfismos funcionais na região promotora do gene, nas posições -403 (G/A; rs2107538) e -28 (C/G; rs2280788), ambos associados com aumento da sua

expressão (LIU *et al.*, 1999a, NICKEL *et al.*, 2000, AN *et al.*, 2002). Estas variantes foram associadas com várias doenças, incluindo DM1 (ZHERNAKOVA *et al.*, 2006).

RANTES



Figura 5- Diagrama esquemático do gene *RANTES*. Localização relativa das regiões codificantes (■), regiões não traduzidas (▨) e polimorfismos. A posição dos polimorfismos funcionais na região promotora de *RANTES* estão representados na figura indicados por flechas, -403 (G/A) e -28 (C/G).
Fonte: Adaptado de Thio e colaboradores (2008)

Segundo Zhernakova e colaboradores 2006 algumas hipóteses podem ser postuladas para explicar a proteção conferida pelo polimorfismo rs2107538 ao DM1 (ZHERNAKOVA *et al.*, 2006). A ligação de RANTES ao seu receptor resulta na ativação de Janus quinases (JAK) (RODRIGUEZ-FRADE *et al.*, 1999, WONG *et al.*, 2001, ZHERNAKOVA *et al.*, 2006), sendo que foi reportado que após administração do inibidor de JAK3, JANEX1, há um retardo no aparecimento de diabetes autoimune em ratos diabéticos não obesos (NOD) (CETKOVIC-CVRLJE *et al.*, 2003). Além disso, RANTES é um dos fatores de ativação dos membros da família da MAPK, Erk e p38, os quais estão envolvidos na diferenciação e proliferação celular (BRILL *et al.*, 2001, WONG *et al.*, 2001, WONG, FISH, 2003, KONDOH *et al.*, 2005), e p38 é considerado o principal regulador entre insulinite benigna e destrutiva e, portanto, provoca o desenvolvimento de DM1 (ANDO *et al.*, 2004). A inibição de p38 resulta na inibição da imunidade desencadeada por Th1, impedindo ratos NOD de desenvolver diabetes (ANDO *et al.*, 2004). É possível conceber então que baixas concentrações de RANTES poderia conferir proteção contra o desenvolvimento de DM1 através da redução de ativação destas vias (ZHERNAKOVA *et al.*, 2006).

Além disso, Herder e colaboradores (2006) relataram que as concentrações plasmáticas de RANTES ou CCL5 estavam elevadas em pacientes com tolerância à glicose diminuída, e que a progressão do DM2 foi significativamente maior em indivíduos com maiores concentrações de RANTES.

3.4.1 Disfunção do Tecido Adiposo

Disfunção do tecido adiposo é caracterizada por inflamação crônica de baixo grau e são observados na obesidade e distúrbios metabólicos, como resistência à insulina e diabetes (SUN *et al.*, 2013, NOSALSKI, GUZIK, 2017). Embora classicamente tenha sido identificado pelo aumento da expressão de citocinas ou quimiocinas, tais como aumento de MCP-1, RANTES, IL-6, interferon (IFN) gama ou TNF α , mecanicamente, a infiltração de células imunes é uma característica proeminente da disfunção do tecido adiposo.

O tecido adiposo (TA) branco é distribuído como visceral (JANKOWICH *et al.*) e subcutâneo (TAS) (IBRAHIM, 2010). Estes compartimentos diferem na importância no metabolismo e suas propriedades imunometabólicas. TAV é metabolicamente mais ativo que TAS e abriga significativamente mais células imunes em situações fisiológicas normais e patológicas (NOSALSKI, GUZIK, 2017). Isto está fortemente relacionado ao aumento da captação de glicose e geração de ácidos graxos no TAV e maior inervação adrenérgica, os quais são importantes para a regulação da sensibilidade à insulina (IBRAHIM, 2010). Mais recentemente, tem se dado atenção em um compartimento muito específico do TAV, o tecido adiposo perivascular (TAVp), devido à sua proximidade dos vasos sanguíneos e sua origem embriogênica única a partir dos precursores das células da musculatura lisa SM22+. A interação dinâmica entre os adipócitos brancos e bege/marrom no âmbito do TAVp resulta em propriedades metabólicas e pró-inflamatórias únicas que tornam o TAVp um importante regulador da função vascular (NOSALSKI, GUZIK, 2017). Os adipócitos coronários perivasculares humanos exibem diferenciação reduzida, forma mais irregular e tamanho menor do que no TAV ou TAV típico peri-renal. Isso se traduz em menor acúmulo de gotículas lipídicas e maior capacidade sintética (CHATTERJEE *et al.*, 2013). O TAVp fornece um microambiente para recrutamento e ativação de células imunes que, em conjunto com as adipocinas, afetam o tônus vascular e outros aspectos da homeostase vascular (BROWN *et al.*, 2014). Todos os compartimentos do TA: TAS, TAV bem como TAVp possuem funções fisiológicas na homeostase vascular e metabólica. Quando estas funções de proteção são perturbadas, a disfunção do tecido adiposo promove o desenvolvimento de doença metabólica e vascular (Figura 5) (GUZIK *et al.*, 2017).

O TA saudável contém numerosos tipos celulares, incluindo não apenas adipócitos, mas também células endoteliais, fibroblastos, pré-adipócitos, células tronco, e células imunes reguladoras/imaturas (KANNEGANTI,DIXIT, 2012). As células imunes, incluindo macrófagos M2 (anti-inflamatórios ou ativação alternativa) e células T regulatórias (Treg), liberam citocinas anti-inflamatórias, tais como IL-10 (*Interleucina 10*) e fator de crescimento transformante β (*Transforming Growth Factor beta* - TGF- β), o que aumenta a sensibilidade à insulina e inibição da inflamação e disfunção do tecido adiposo (Figura 5) (HONG *et al.*, 2009).

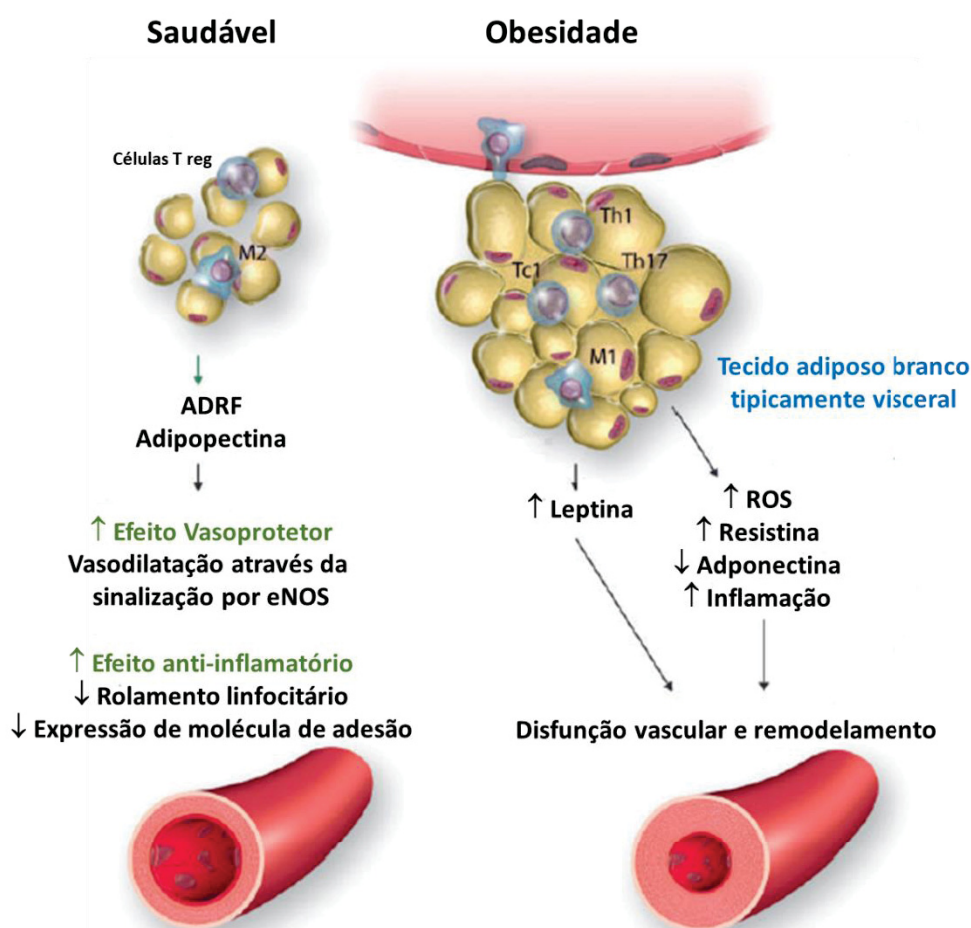


Figura 6- Funções do tecido adiposo visceral em situações saudáveis e de obesidade. Os compartimentos de tecido adiposo diferem quanto suas características de células autoimunes infiltrativas, características dos adipócitos e perfil de citocinas. Em condições saudáveis, citocinas e adipocinas protetoras são importantes na manutenção da homeostasia vascular. Na obesidade, adipócitos grandes produzem leptina e não liberam adonectina e aumenta o acúmulo dos macrófagos M1 em estruturas semelhantes a coroa, bem como células T efetoras.

Fonte: Adaptado de Guzik e colaboradores (2017)

Em condições de magreza, as células M2 são caracterizadas pela falta de CD11c e presença de CD206 e arginase 1 (LUMENG *et al.*, 2007a). A polarização de M2 e Treg é reciprocamente aumentada e condições fisiológicas pela liberação de adiponectina do TA (WOLF *et al.*, 2004). A IL-10 modula a sinalização da insulina através do receptor/substrato do receptor de insulina 1-2(IRS1-IRS2), fosfatidilinositol, 3 -quinase(PI3K), proteína quinase B (PKB ou Akt), FOXO1(*Orkhead Box Protein O1* também denominado *forkhead in rhabdomyosarcoma*), no contexto de gluconeogênese hepática e síntese de lipídeos. Estas ações são parcialmente diretas e parcialmente indiretamente através da modulação de fator de necrose tumoral (*Tumor Necrosis Factor* - TNF), IL- 6, IL-1 β , e polarização de macrófagos M1 (CINTRA *et al.*, 2008).

Os macrófagos M2 controlam a lipólise no adipócito (NGUYEN *et al.*, 2011). Na exposição ao frio, os macrófagos M2 secretam catecolaminas, que estimulam a lipólise no adipócito, e em associação com os eosinófilos, podem orquestrar a geração de tecido adiposo marrom (QIU *et al.*, 2014). Assim, na magreza, as células T no TA sensíveis à insulinas são primariamente células T reg que secretam IL-10 e TGF β e células Th2 produzem citocinas anti-inflamatórias, tais como as IL-4, IL-5 , IL-13 e IL-10, desempenhando papel importante na homeostasia do TA (FEUERER *et al.*, 2009). As células Treg tem um perfil de expressão característico de sua função regulatória, tais como CD25, receptor do fator de necrose tumoral induzido por glicocorticoides (*Glucocorticoid-Induced Tumor Necrosis Factor Receptor* - GITR), antígeno 4 associado ao linfócito T citotóxico (*Cytotoxic T Lymphocyte Antigen-4* - CTLA-4), receptor similar a lecitina G1 de célula killer (Killer Cell Lectin-Like Receptor G1 – KLRG1) e receptor OX40 (também denominado de *Tumor Necrosis Factor Receptor Superfamily, Member 4* - TNFRSF4 ou CD134) em adição à clássica FoxP3 (*Forkhead box P3*) (FEUERER *et al.*, 2009). As células Treg também exibem sensibilidade à citocinas como evidenciado pela alta expressão de receptores de quimiocinas CC (FEUERER *et al.*, 2009). Outras células imunes no tecido adiposo magro incluem eosinófilos potencialmente protetores e em menor extensão neutrófilos, sendo que seus papéis até o momento não estão bem definidos (GUZIK *et al.*, 2017). Da mesma forma, o papel das células imunes presentes no TAVp saudável na regulação da função vascular ainda não foi claramente definido, além dos potenciais efeitos sobre a liberação de adipocinas protetoras dos adipócitos. O conteúdo de células imunes no TA subcutâneo magro

também foi descrito, mas é muito baixo. Alterações dinâmicas de células imunes neste tecido sustentam seu envolvimento em patologias associadas à sua disfunção (GUZIK *et al.*, 2017).

A disfunção do TA é caracterizada pela diminuição de liberação dos fatores protetores homeostáticos, tais como adiponectina, óxido nítrico, ou prostaglandinas protetoras e aumento da ativação de vias relacionadas ao estresse, resultando na liberação de adipocinas (resistina, visfatina, leptina) e desenvolvimento de um baixo grau de inflamação (Figura 5) (SUN *et al.*, 2013) o que não é característica apenas da disfunção do TA, mas também promove disfunção metabólica e vascular. Enquanto este fenômeno é particularmente evidente na TAVp, também foi bem definido em outros depósitos de TAV (GUZIK *et al.*, 2006, GUZIK *et al.*, 2007) e na obesidade (NOSALSKI, GUZIK, 2017). As interações entre as células imunes e o adipócito são, portanto, bidirecionais e dependem de mecanismos nutricionais, vias neuro-hormonais e fatores humorais secretados localmente (GUZIK *et al.*, 2006, GUZIK *et al.*, 2007, NOSALSKI, GUZIK, 2017). Em condições patológicas, os adipócitos produzem citocinas inflamatórias e proteínas da matriz extracelular, suportando a infiltração e ativação de células imunes, criando um microambiente ideal para a inflamação (RONTI *et al.*, 2006). Ao mesmo tempo, as células imunes ativadas secretam citocinas que influenciam a função dos adipócitos e a diferenciação e a secreção de adipocinas. As características das respostas inflamatórias do TA diferem entre doenças inflamatórias clássicas, como doença de Crohn e câncer ou doença cardiovascular. A característica comum, no entanto, é a disfunção do TA, o TA inflamado fornece um microambiente permissivo para o desenvolvimento da patologia. Estes efeitos podem ser localizados, como por exemplo, a ligação do TAVp à disfunção de vasos adjacentes na hipertensão ou aterosclerose (MIKOLAJCZYK *et al.*, 2016, SKIBA *et al.*, 2017) ou sistêmicos, tais como os efeitos da disfunção do TAV no desenvolvimento de diabetes, câncer, doenças autoimunes ou sinalização dentro do SNC.

Aumento do tamanho do adipócito desencadeia uma resposta ao estresse e liberação de proteínas quimioatrativas, tais como MCP-1, M-CSF-1, ou RANTES (SKURK *et al.*, 2007) levando a recrutamento de monócitos e acúmulo de macrófagos (WEISBERG *et al.*, 2003, XU *et al.*, 2003, MCEVER, 2015). Existe uma correlação entre o acúmulo de macrófagos no TA e tamanho do adipócito (WEISBERG *et al.*, 2003). O fluxo de lipídio local também regula o recrutamento de

macrófagos residentes do TA (KOSTELI *et al.*, 2010). Elevadas concentrações de ácidos graxos livres eleva a secreção de quimiocinas do adipócito induzindo a quimiotaxia dos macrófagos para o TAV. Hipóxia e estresse oxidativo no TAV são característicos para obesidade e podem promover inflamação crônica através de mecanismos metabólicos e clássicos dependentes de quimiocinas (YE *et al.*, 2007, O'ROURKE *et al.*, 2011). Obesidade e resistência à insulina são caracterizadas pela predominância de macrófagos M1 no TAV (LUMENG *et al.*, 2007b, OH *et al.*, 2012), contudo o mecanismo da polarização dos macrófagos M1 na obesidade não está claro. Ácidos graxos não esterificados são produzidos no TA e estão sistematicamente aumentados em indivíduos obesos, os quais induzem a expressão de IL-6, e reduzem a IL-10 (Figura 6) (NGUYEN *et al.*, 2007). Em contraste, os receptores ativados por proliferadores de peroxissoma (*Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ* – PPAR γ) direcionam os macrófagos para o fenótipo M2 pela regulação dos estoques de ácidos graxos e, fazendo isso, reduzem a obesidade e melhoram a resistência à insulina (ODEGAARD *et al.*, 2007).

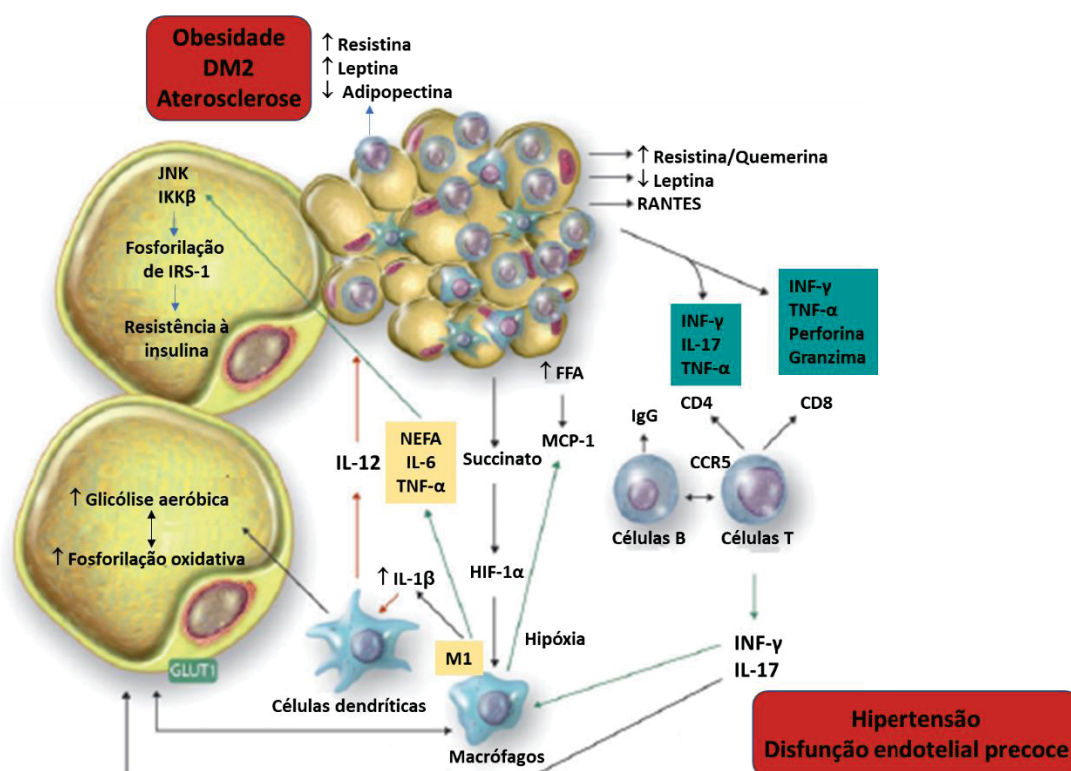


Figura 7- Interações entre os adipócitos e as células imune em diferentes estágios da doença metabólica e cardiovascular. Estas interações envolvem importante regulação imunometabólicas. Fonte: Adaptado de Guzik e colaboradores (2017)

Enquanto os macrófagos são quantitativamente as células imunes mais abundantes na obesidade, as células T também possuem papel regulatório crítico (WU *et al.*, 2007). Estão aumentados significativamente no TA na obesidade e tendem a se localizar em volta dos adipócitos grandes (RAUSCH *et al.*, 2008). As células T podem interagir com os macrófagos residentes do TA regulando respostas inflamatórias e disfunções metabólicas (MONNEY *et al.*, 2002). São importantes as células T CD8⁺ citotóxicas que secretam TNF- α , IL-2, IFN- γ e quimiocina RANTES e células CD4⁺ Th1 que secretam TNF- α , IL-12 e IFN- γ . Estas citocinas afetam diretamente a função do adipócito e promovem a polarização de macrófagos M1 (HARFORD *et al.*, 2011). O recrutamento de células T na obesidade é parcialmente mediado pelo eixo RANTES-CCR5 (WU *et al.*, 2007, RAUSCH *et al.*, 2008). A infiltração das células T no TA pode preceder a inflamação macrófago-dependente uma vez que está presente 4-5 semanas após alimentação com alto conteúdo de gordura, e o influxo de macrófagos só é observado após 10 semanas. A infiltração das células T no TA está fortemente associada com redução precoce de sensibilidade à insulina e intolerância à glicose (KINTSCHER *et al.*, 2008) e as citocinas das células T são essenciais para a polarização dos macrófagos no cenário de inflamação clássica (MESHKANI,VAKILI, 2016). Células T CD4⁺ produtoras de osteopontina no TA são reguladas pelo inflamassoma de NLRP3, o qual sensora sinais de perigo associado à obesidade e contribui para a inflamação associada à obesidade e resistência à insulina (VANDANMAGSAR *et al.*, 2011, JOURDAN *et al.*, 2013).

Outras células imunes também estão aumentadas no TA na obesidade. A infiltração das células B está associada à produção de IgG no TA. Concentrações plasmáticas da pró-inflamatória IgGc e TAV estão elevadas em ratos obesos. Mais importantes células β de ratos obesos transferidos para ratos magros deficientes de células B induz resistência à insulina (WINER *et al.*, 2011). Além dos mecanismos mediados por anticorpos, células B de ratos obesos secretam citocinas pró-inflamatórias (IL-6 e INF- γ) e podem regular células T e macrófagos (DEFURIA *et al.*, 2013).

A infiltração das células imunes no TA fornece uma importante ligação entre obesidade, resistência à insulina e diabetes. O número de macrófagos infiltrados no TA em pacientes obesos com resistência à insulina é maior do em pacientes com obesidade sensível à insulina, independentemente da massa gorda. As

concentrações de insulina afetam a inflamação no tecido adiposo durante dieta de alto conteúdo de gordura (XU *et al.*, 2003). A infiltração progressiva de macrófagos no TAV precede o aumento da concentração plasmática de insulina, sugerindo que a inflamação no TA é a causa ao invés da consequência da resistência à insulina. Um número de evidências suporta o papel da imunidade adaptativa na resistência à insulina e diabetes através da indução de citocinas pró-inflamatórias nos órgãos metabólicos, tais como TA, fígado, músculo e pâncreas (XIA *et al.*, 2017). A mutação do receptor de CCL-5 ou RANTES em ratos causa proteção contra resistência à insulina induzida por dieta com alto conteúdo de gordura e este efeito é mediado pela redução do acúmulo de células T efetoras, com subsequente redução de macrófagos no TA e polarização M2 dos macrófagos persistentes (KITADE *et al.*, 2012). Estudos clínicos confirmam que células Th1 estão positivamente reguladas no TA e circulação periférica de pacientes com pré-diabetes ou DM2 (MCLAUGHLIN *et al.*, 2014). Além disso, dietas com alto conteúdo de gordura e resistência à insulina estão associadas ao acúmulo de células Th1, Th17, e linfócitos efetores CD8+ no TA, enquanto que as células anti-inflamatórias Th2 e Treg estão diminuídas (HARFORD *et al.*, 2011). O tratamento combinado de anti-CD3 e glucosilceramida induz IL-10 e TGF- β , reduzindo a inflamação no TAV no rato obeso e melhorando as concentrações plasmáticas de glicose em jejum (ILAN *et al.*, 2010). A ativação das células imunes, envolvendo a molécula co-estimulatória CD40 e seu ligante CD40L, é particularmente importante na ligação entre a inflamação do tecido adiposo e o DM (SEIJKENS *et al.*, 2013). A interação CD40-CD40L promove inflamação pancreática, TA e vascular (POGGI *et al.*, 2011, DONATH, 2014) aumentando a expressão de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-6, MCP-1), leucotrieno B4 e ao mesmo tempo aumentando o acúmulo de gotículas de lipídeos e adipogênese (POGGI *et al.*, 2009, MISSIOU *et al.*, 2010, DE HOOG *et al.*, 2015). Estes efeitos são mediados pela expressão reduzida do substrato do receptor de insulina (IRS-1) e transportador de glicose tipo 4 (GLUT-4) (MISSIOU *et al.*, 2010, POGGI *et al.*, 2011). A expressão de CD40L nas células T pode induzir inflamação no tecido adiposo e prejudicar a sensibilidade à insulina (GUZIK *et al.*, 2017).

As concentrações de RANTES são maiores em indivíduos com DM2 do que em indivíduos saudáveis (HERDER *et al.*, 2005). O aumento da expressão de RANTES e dos respectivos receptores no TA ocorre na obesidade humana e está associada ao aumento da inflamação sistêmica (HUBER *et al.*, 2008), podendo

desempenhar um papel na mediação da resistência à insulina (MATTER, HANDSCHIN, 2007, DWORACKA *et al.*, 2014).

O tecido adiposo pancreático (PAT) exerce efeitos sistêmicos e locais (parácrino) na função do pâncreas e sensibilidade à insulina. Shao e colaboradores (2016) sugerem que citocinas pró-inflamatórias alteram o equilíbrio imune no pâncreas. Primeiramente porque citocinas pró-inflamatórias têm efeitos diretos na imunogenicidade das ilhotas e sobrevivência das células β pancreáticas e auto antígenos são apresentados no contexto de ambiente pró-inflamatório (HOGLUND *et al.*, 1999, AKIRAV *et al.*, 2008). Em segundo lugar, quimiocinas são induzidas nas células das ilhotas em resposta a estímulo pró-inflamatório. Foi reportado que RANTES ao se ligar aos seus receptores podem contribuir para o DM1 (CARVALHO-PINTO *et al.*, 2004). Foi mostrado que citocinas pró-inflamatórias do tecido adiposo pancreático aumentam significativamente a expressão de RANTES (e outras citocinas: CCL2, CCL21, CXCL9 e CXCL10) nas ilhotas adjacentes, as quais são responsáveis por recrutamento de células imunes. Precisa ser investigado se RANTES e outras citocinas contribuem diretamente para o DM1, e caso contribuam, precisa ser avaliado este mecanismo (ZHANG *et al.*, 2012). Em terceiro lugar, citocinas pró-inflamatórias têm efeitos diretos sobre vários tipos celulares imunes, particularmente células T. Estas células imunes posteriormente liberam mais citocinas inflamatórias inatas, as quais danificam as células β e quebram a tolerância através da ativação de respostas adaptativas. Tem sido reportadas que muitas citocinas atuam diretamente nas células T regulatórias, influenciando sua diferenciação e estabilidade, e função. Em rato, inflamação persistente resulta na instabilidade de Foxp3, perda da supressão e aquisição das funções de IFN- γ produzindo células Th1. IL-6 e IL-1 β faz com que as células T regulatórias específicas de auto antígenos de ilhotas percam sua função supressora e tornem-se células Th17 inflamatórias (ZHANG *et al.*, 2012) (Figura 7). Estes dados sugerem uma forte ligação mecanística entre citocinas pró-inflamatórias secretadas pelo tecido adiposo e o DM1 (SHAO *et al.*, 2016).

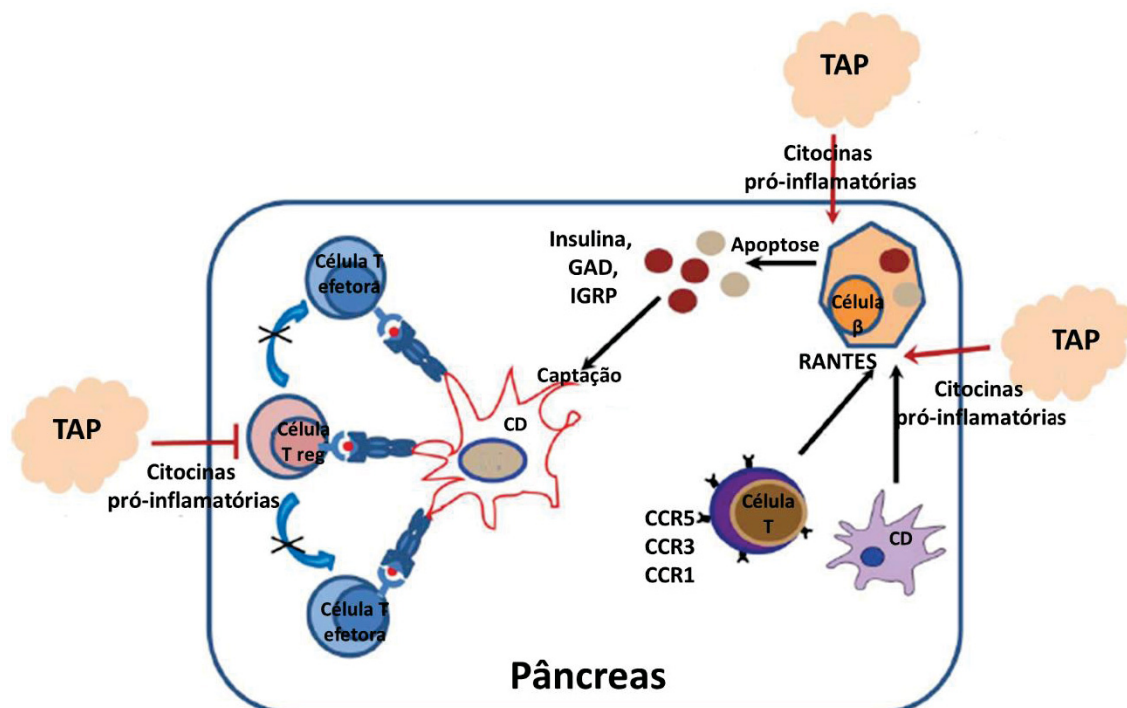


Figura 8-Citocinas pró-inflamatórias possuem efeitos diretos na imunogenicidade das ilhotas e sobrevivência das células β . Altas concentrações de citocinas derivadas do TAP induzem diretamente a expressão de RANTES (CCL5) e outras quimiocinas (tais como CCL2, CCL21, CXCL9 e CXCL10) nas ilhotas pancreáticas adjacentes, que são responsáveis pelo recrutamento de células imunes. Além disso, citocinas pró-inflamatórias possuem efeito direto sobre várias células imunes, especificamente células T que posteriormente liberam mais citocinas inflamatórias inatas, as quais causam danos às células β e quebram a tolerância através da ativação de respostas adaptativas. Esta resposta compreende a expansão dos subgrupos Th1 e Th17 das células T efetoras e concomitante redução do subgrupo de células T regulatórias nos linfonodos pancreáticos. E ainda, as citocinas inflamatórias possuem efeitos citotóxicos diretos nas células β . Citocinas pró-inflamatórias e células T citotóxicas desencadeia o turnover das células β , resultando na liberação de auto antígenos e "sinais de perigo" endógenos capazes de promover apresentação patológica de auto antígenos, sugerindo uma forte ligação mecânica entre citocinas pró-inflamatórias secretadas pelo tecido adiposo e DM1.

Fonte: Adaptado de Shao e colaboradores (2016)

3.5 GENE CATALASE

Várias linhas de evidências sugerem que o estresse oxidativo desempenha papel pivô na patogênese de uma grande variedade de desordens, incluindo diabetes (FATEHI-HASSANABAD *et al.*, 2010) e suas complicações (GIACCO,BROWNLEE, 2010) e o papel patogênico crítico do estresse oxidativo no início e desenvolvimento das complicações do DM já foi determinado (RAHIMI *et al.*, 2005).

A geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) secundária à hiperglicemia pode levar ao aumento do estresse oxidativo nas células β , o que causa disfunção

das células β e outras complicações de longo termo do DM por causa do prejuízo da secreção e/ou função da insulina (FATEHI-HASSANABAD *et al.*, 2010, KARUNAKARAN,PARK, 2013).

O estresse oxidativo é definido como uma ruptura do equilíbrio entre ROS e a produção de antioxidantes em consequência do dano oxidativo (RAHIMI *et al.*, 2005, DA COSTA *et al.*, 2012, KARUNAKARAN,PARK, 2013, RASHID *et al.*, 2013, SAEIDNIA,ABDOLLAHI, 2013). ROS refere-se a uma série de intermediários de oxigênio, tais como ânion superóxido, peróxido de hidrogênio, radical hidroxila, e ácido hipocloroso (YANG *et al.*, 2012). Embora, sobre condições normais, ROS poderia auxiliar na defesa celular, a síntese de hormônios, transdução de sinal, regulação de fatores transcricionais, e expressão gênica, em condições patológicas aberrantes de dano tecidual, inflamação, fibrose, e morte das células β podem ocorrer (KARUNAKARAN,PARK, 2013).

Existem quatro principais vias ativadas quando ocorre o aumento intracelular de estresse oxidativo como resultado da hiperglicemia, sendo eles: (1) Via dos polióis; (SUGIHARA *et al.*) (SUGIHARA *et al.*) produtos finais de glicação avançada (AGE); (3) proteína quinase C (PKC) e diacilglicerol (LONG,DAGOGO-JACK); e (4) via da hexosamina (GIACCO,BROWNLEE, 2010, MADONNA,DE CATERINA, 2011) (Figura 9).

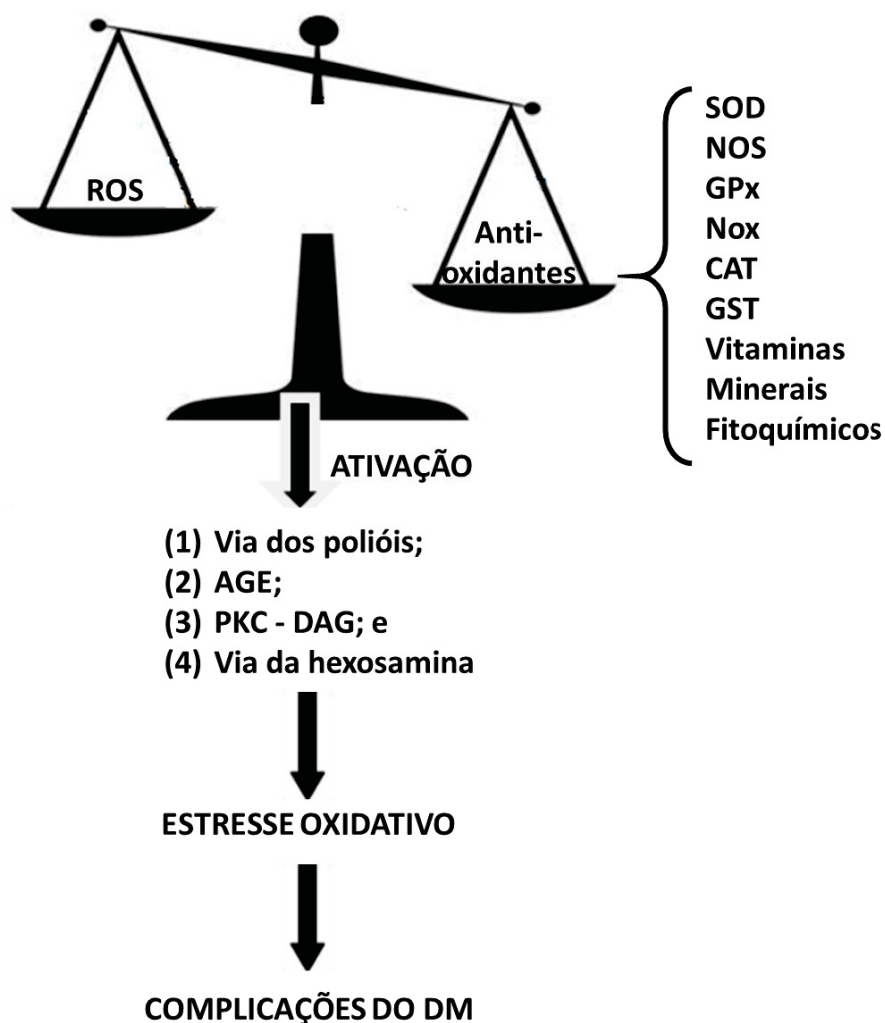


Figura 9 – Vias que influenciam o diabetes em associação entre espécies reativas de oxigênio e antioxidantes.

Fonte: Adaptado de Tabatabaei-Malazy e colaboradores (2017)

Os efeitos de ROS podem ser modificados por antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos. As enzimas antioxidantes são: superóxido dismutase (FORBES *et al.*), catalase (CAT), glutaciona peroxidase (GPx), glutaciona S-transferase (GST), óxido nítrico sintase (NOS), e nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidase ((*NADPH*) oxidase - NOX) (RAHIMI *et al.*, 2005, CRAWFORD *et al.*, 2011, DA COSTA *et al.*, 2012, GOTH,NAGY, 2012, KARUNAKARAN,PARK, 2013, BANERJEE,VATS, 2014), e os antioxidantes não enzimáticos consistem de vitaminas, minerais, carotenoides, polifenóis, e algumas outras moléculas (JOHANSEN *et al.*, 2005, TABATABAEI-MALAZY *et al.*, 2012, TABATABAEI-MALAZY *et al.*, 2014).

Foi mostrado que polimorfismos em enzimas antioxidantes estão envolvidos na patogênese do diabetes e suas complicações (CRAWFORD *et al.*, 2011, BANERJEE,VATS, 2014). A enzima catalase tem papel predominante na eliminação de peróxido de hidrogênio em eritrócitos humanos (GAETANI *et al.*, 1996, MASUOKA *et al.*, 1996, MASUOKA *et al.*, 2003, KIRKMAN,GAETANI, 2007, VEAL,DAY, 2011) e mutações que resultam em baixa atividade ou acatalasemia foram associadas ao diabetes (GOTH,EATON, 2000, GOTH, 2008, TAKEMOTO *et al.*, 2009, KIKUMOTO *et al.*, 2010, GOTH,NAGY, 2012).

A enzima catalase é uma hemoproteína tetramérica que catalisa a quebra do peróxido de hidrogênio (H₂O₂) em oxigênio (O₂) e água (H₂O) (MATES,SANCHEZ-JIMENEZ, 1999, LIU *et al.*, 2015). O gene responsável pela transcrição da catalase está localizado no braço curto do cromossomo 11 (11p13) e consiste de 13 éxons (KITTUR *et al.*, 1985) (Figura 10).

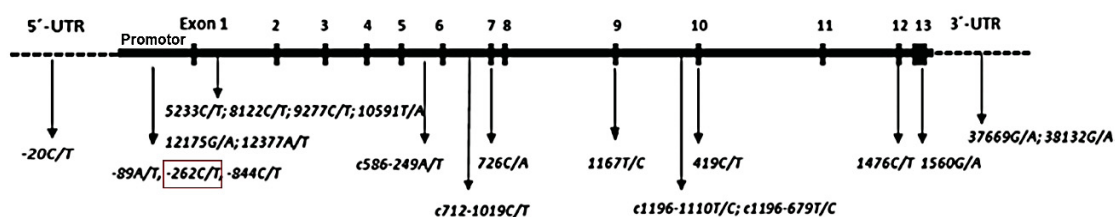


Figura 10 – Representação esquemática do cromossomo humano 11 e localização do gene **CAT**. Estão indicados os polimorfismos presentes nas regiões não codificantes (5'UTR e 3'UTR), nos íntrons e exons do gene **CAT** localizado no cromossomo humano 11 (11p13). Destacado em uma caixa vermelha encontra-se o polimorfismo de interesse neste trabalho (rs1001179) localizado na região promotora do gene **CAT**.

Fonte: Adaptado de Kodydkova e colaboradores (2014)

Diversos polimorfismos estão associados a este gene, os quais podem alterar a função ou expressão da enzima. Dentre os polimorfismos do gene da catalase, o mais estudado é o rs1001179 (CAT -262C>T), onde ocorre uma troca de bases de Citosina (C) para a Timina (T) na posição -262, sendo responsável pela diminuição da atividade enzimática da catalase (WENTEN *et al.*, 2009, ESIH *et al.*, 2016, GOULAS *et al.*, 2017).

O polimorfismo rs1001179 é o mais investigado em relação aos diferentes tipos de DM, incluindo o DM1, DM2, DMG e as complicações relacionadas ao DM, tais como retinopatia, nefropatia, doença cardíaca isquêmica, e doença cardiovascular (CRAWFORD *et al.*, 2011, BANERJEE,VATS, 2014). Ainda, o polimorfismo rs1001179 foi associado à hipertrigliceridemia em indivíduos chineses

com DM2 e pacientes DM2 com doença cardiovascular (CHEN *et al.*, 2012). Também um estudo de Santos e colaboradores encontrou associação entre este polimorfismo e retinopatia diabética, nefropatia diabética e doença cardíaca isquêmica com DM2 em uma população Caucasoide (DOS SANTOS *et al.*, 2006). Foi mostrado que deficiência da catalase causa risco aumentado para o DM2 e que hipocatalasemia, que resulta em baixas concentrações de SOD e GPx, pode aumentar o estresse oxidativo (GOTH,NAGY, 2012).

Embora em alguns estudos não foram encontradas associação entre o polimorfismo rs1001179 e o DM1 (PASK *et al.*, 2006, CRAWFORD *et al.*, 2012), foi encontrada associação entre o alelo C com risco para nefropatia diabética (ZOTOVA *et al.*, 2004, CHISTIakov *et al.*, 2006, CRAWFORD *et al.*, 2012). Está bem estabelecido que o estresse oxidativo exerça um papel importante no desenvolvimento das complicações diabéticas no DM1 (GIUGLIANO *et al.*, 1996, BONNEFONT-ROUSSELOT, 2002). E algumas evidências sugerem também que o estresse oxidativo pode estar envolvido no desenvolvimento do DM1, especialmente através da apoptose das células β -pancreáticas, que são bem caracterizadas por baixa concentração das enzimas antioxidantes comparada a outros tecidos (LENZEN *et al.*, 1996, TIEDGE *et al.*, 1997, LIPINSKI, 2001). Múltiplos estudos bioquímicos sugerem que o DM1 está correlacionado com a baixa eficiência das defesas antioxidantes de eliminação, tanto enzimáticas (superóxido dismutase, catalase, glutathione peroxidase) quanto não enzimáticas (vitamina A, C e E, sequestradores de radicais livres) (LIU *et al.*, 1999b, BONNEFONT-ROUSSELOT *et al.*, 2000, WEST, 2000). Além disso, na hiperglicemia pode ocorrer uma glicação não enzimática da catalase e outras enzimas antioxidantes, resultando na inativação de enzimas glicadas e subsequente reforço do estresse oxidativo (YAN,HARDING, 1997). Estas observações sugerem que a catalase e outras enzimas antioxidantes desempenham um papel protetor contra o estresse oxidativo no DM1 e seus genes poderiam contribuir para a suscetibilidade a esse distúrbio autoimune (LENZEN *et al.*, 1996, TIEDGE *et al.*, 1997, CHISTIakov *et al.*, 2004). E finalmente, entre as espécies reativas de oxigênio (ROS), o peróxido de hidrogênio contribui para a sinalização do receptor de insulina, e pode ter papel chave na modulação da transdução de sinal das vias reguladas por insulina através de receptores acoplados (HOUSLAY, 1991, CAVARAPE *et al.*, 2001). Consequentemente, a inativação do peróxido de hidrogênio pela catalase poderia representar um passo crucial na

remoção intracelular de espécies reativas de oxigênio nas células produtoras de insulina e sua proteção contra o estágio inicial do DM1 (TIEDGE *et al.*, 1997).

3.6 GENE *MMP-9*

As complicações microvasculares diabéticas (CMD), principalmente retinopatia diabética (RD) e nefropatia diabética (ND), têm aumentado ao redor do mundo (REUSCH, 2003, NATHAN, 2010, ROSENSON *et al.*, 2011, ESTACIO *et al.*, 2012, LI *et al.*, 2015). Embora o mecanismo preciso da patogênese das CMD ainda estar indefinido, muitos fatores de risco, como duração do DM, grau de glicemia e controle da pressão sanguínea, foram identificados como causais das CMD (ADLER *et al.*, 2000, RAMAN *et al.*, 2012).

Além disso, vários polimorfismos em genes, tais como das metaloproteases de matriz (MMP) têm sido indicados como fatores contribuintes em alguns estudos (NAZIR *et al.*, 2014, FENG *et al.*, 2016, SINGH *et al.*, 2017). Assim, a identificação de marcadores genéticos para CMD é importante na identificação de pacientes que se beneficiariam de um tratamento preventivo (ZHANG *et al.*, 2015).

Alterações na estrutura da parede microvascular induzidas pela hiperglicemia contribuem para o processo patológico das CMD, que é caracterizada pelo espessamento das membranas basais dos capilares e deposição de componentes da matriz extracelular, ocorrendo a perda dos microvasos e subsequente neovascularização, predominantemente nos olhos, rins e nervos periféricos (PFEIFFER, SCHATZ, 1995).

As MMPs são endopeptidases zinco dependentes coletivamente capazes de degradar essencialmente todos os componentes da matriz extracelular (CHADZINSKA *et al.*, 2008, NAVRATILOVA *et al.*, 2016). As MMPs são importantes enzimas proteolíticas que estão envolvidas no remodelamento do tecido conjuntivo e na degradação da matriz extracelular, e têm função na degradação fisiológica da matriz extracelular na angiogênese, reparo tecidual e morfogênese tecidual (FREIJE *et al.*, 2003). Elas também participam de vários outros processos importantes para homeostase pulmonar, incluindo inflamação, hipersecreção de muco, proliferação, apoptose e vias profibróticas (SEGURA-VALDEZ *et al.*, 2000, MOLET *et al.*, 2005, GOSSELINK *et al.*, 2010, CHAUDHURI *et al.*, 2012).

A metaloproteinase de matriz 9 (MMP9), também conhecida como gelatinase B, é uma colagenase do tipo IV de 92kDa, que pode degradar colágeno tipo IV e elastina. É principalmente expressa pelos macrófagos alveolares, leucócitos polimorfonucleares, osteoclastos e células malignas (FANJUL-FERNANDEZ *et al.*, 2010). Como a MMP9 degrada proteína da matriz extracelular e processa um número de moléculas bioativas, desempenha papel importante na inflamação e dano tecidual. A MMP9 está envolvida em várias vias biológicas, tais como migração celular (YAN *et al.*, 2008), angiogênese (NGUYEN *et al.*, 2001), inflamação (HU *et al.*, 2007), remodelamento celular (PAGE-MCCAW *et al.*, 2007) e fibrose (KIM *et al.*, 2005). Como resultado, a MMP9 é um alvo atrativo para numerosas patologias, de autoimune e doenças inflamatórias às doenças fibróticas e cânceres metastáticos (Figura 11).

A MMP9 que degrada proteínas da matriz extracelular tem papel importante no remodelamento microvascular e a sua expressão está aumentada nas lesões da parede vascular durante o processo das CMD, e a sua elevada expressão está associada à recrutamento de leucócitos para a parede microvascular lesionada e fibrosada (VAN GIESON,SKALAK, 2001, ZHANG *et al.*, 2015).

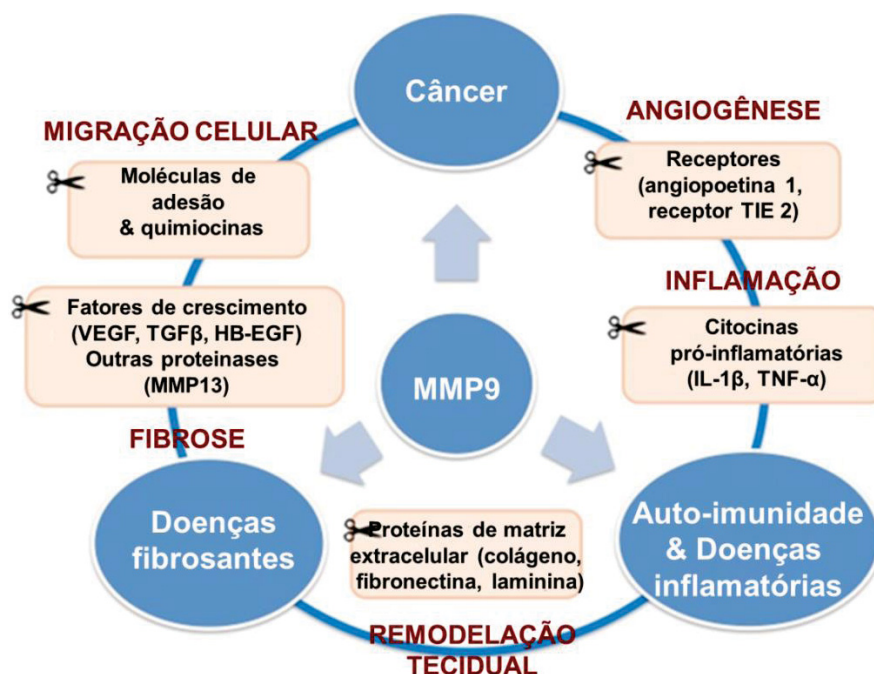


Figura 11 – Vias biológicas em que a MMP9 está envolvida. A MMP9 está envolvida em várias vias biológicas, tais como migração celular, angiogênese, inflamação, remodelamento celular e fibrose, constituindo um alvo atrativo para numerosas patologias, tais como doenças autoimunes, doenças inflamatórias, doenças fibróticas e cânceres metastáticos.

Fonte: <http://www.calypsobiotech.com/site/en/science-a-medicine/mmp-9-in-ibd-and-metastatic-cancers/>.

O gene da MMP9 está localizado no cromossomo 20q11.1-13.1 (Figura 12). Polimorfismos na região promotora de *MMP9* foram implicados na regulação da transcrição gênica (SINGH *et al.*, 2014). O polimorfismo funcional -1562C> T (rs3918242) localizado na região promotora do gene *MMP9* resulta na perda da ligação de uma proteína nuclear e aumento da atividade transcricional (VAN DEN STEEN *et al.*, 2002).

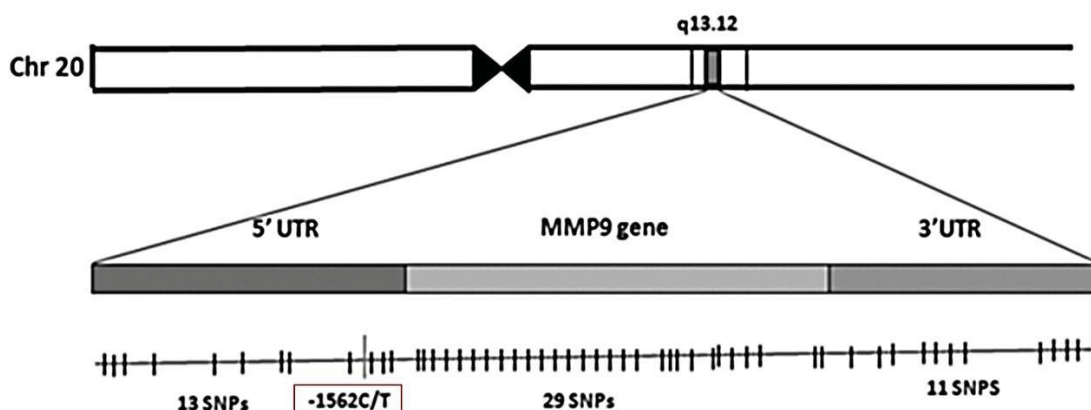


Figura 12 – Representação esquemática do cromossomo humano 20 e localização do gene *MMP9*. Estão indicados os 24 polimorfismos presentes nas regiões não codificantes (5'UTR e 3'UTR) e os 29 nos íntrons e exons do gene *MMP9* localizado no cromossomo humano 20q13.12. Destacado em uma caixa vermelha encontra-se o polimorfismo de interesse (rs3918242) localizado na região promotora do gene *MMP9*.

Fonte: Adaptados de Sugreev e colaboradores (2015)

O polimorfismo rs3918242 é caracterizado pela troca de citosina por timina na posição -1562 (YE, 2006). A presença do alelo T resulta na maior atividade do promotor em torno de 1,5 vezes em relação ao alelo C, porque constitui o sítio de ligação para de uma proteína repressora (ZHANG *et al.*, 1999). Vários estudos epidemiológicos têm avaliado a associação entre variantes genéticas no gene *MMP9* e o risco para o desenvolvimento das CMD (BERANEK *et al.*, 2008, AHLUWALIA *et al.*, 2009, SINGH *et al.*, 2013, FENG *et al.*, 2016). A variante rs3918242 foi associada com as CMD em alguns estudos (SINGH *et al.*, 2013, ZHANG *et al.*, 2015), contudo não foi confirmado em outros (BERANEK *et al.*, 2008).

3.7 GENE *EGFR*

O receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR) é um receptor transmembrana codificado pelo proto-oncogene *c-erbB1* (ULLRICH *et al.*, 1984, WELLS, 1999, YARDEN, 2001). Pertence a uma família de quatro tirosinas quinases receptoras intimamente relacionadas que foram reconhecidas como ponto de

convergência e mudança para diversas vias de transdução de sinal envolvidas na comunicação celular (HACKEL *et al.*, 1999, MOGHAL, STERNBERG, 1999). As respostas biológicas aos sinais transduzidos pelo EGFR são pleiotróficos e incluem mitogênese, secreção de proteínas, aumento da motilidade celular, proliferação, invasão, adesão celular, e angiogênese (WELLS, 1999, LAFKY *et al.*, 2008).

A figura 13 mostra simplificadamente as vias de sinalização que são ativadas por EGFR, mas não incluindo todos os componentes conhecidos nem a interligação entre as vias. As vias de sinalização apresentadas na figura regulam a atividade de muitos alvos citoplasmáticos. Além disso, também regulam a atividade de fatores transcricionais direta ou indiretamente. A fosforilação do EGFR pode direta ou indiretamente ativar o transdutor de sinal e ativador de transcrição 1 (STAT1), STAT3 e STAT5. As proteínas STAT ativadas translocam para o núcleo e regulam diretamente a expressão gênica crucial para sobrevivência, proliferação e transformação celular e oncogênese (BOWMAN *et al.*, 2000). EGFR ativa a fosfatidilinositol 3 quinase (PI3K) que fosforila o fosfatidilinositol 4,5 bifosfato para formar fosfatidilinositol 3,4,5 trifosfato (PIP3), o qual ativa Akt pela ligação ao seu domínio homólogo à plecstrina (*pleckstrin homology* - PH). Akt fosforilada possui vários efeitos, que incluem inibição de fatores pró-apoptóticos tais como BAD (*BCL2 antagonist of cell death*), pró-caspase 9 e fatores de transcrição da família cabeça de garfo (*Forkhead box O* - FOXO).

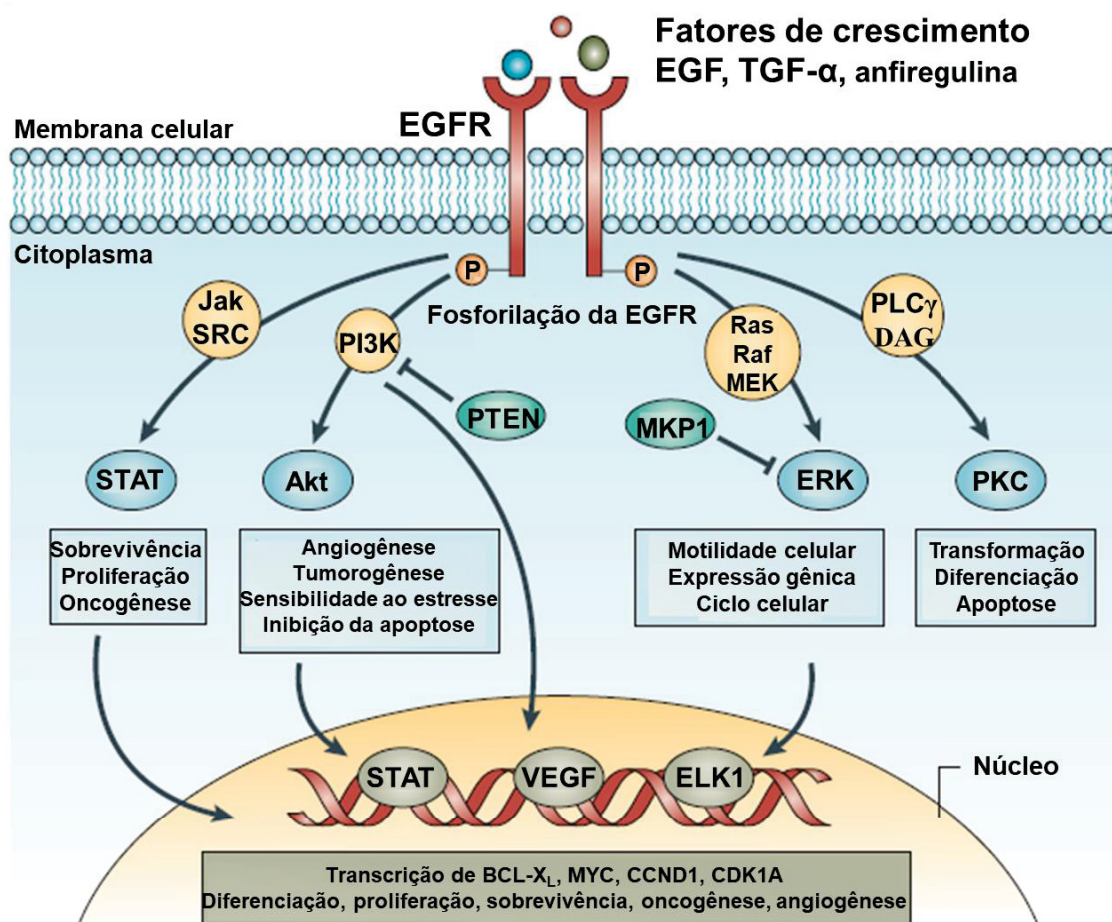


Figura 13 – **As principais vias de sinalização a jusante reguladas pelo EGFR.** A figura mostra as vias de sinalização que são ativadas pelo EGFR, vias importantes de sinalização, regulados pelo EGFR, estão representados com importantes funções destacadas em caixas coloridas. A cascata de sinalização não inclui todos os componentes conhecidos de uma determinada via. Exemplos de sinais inibitórios também são mostrados, tais como PTEN, que pode desfosforilar PI3K e MKP1, que pode desfosforilar as vias de sinalização ERK1/2. Os círculos em cinza apresentados na figura são vias de sinalização que regulam a atividade de muitos alvos citoplasmáticos. Além disso, essas vias de sinalização também regulam a atividade de fatores transcripcionais direta ou indiretamente.

Fonte: Adaptado de Nyati e colaboradores (2006)

Ativação mediada por Akt da proteína Alvo da Rapamicina (mTOR) é também importante no estímulo da proliferação celular, e ativação de fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e fator 1 α induzível por hipóxia (HIF1 α) que são importantes na angiogênese (WENDEL *et al.*, 2004, HENNESSY *et al.*, 2005). A via da proteína quinase ativada por mitógeno - Ras-MAPK é ativada por EGFR através de dois mecanismos, ou por recrutamento direto da proteína 2 ligada ao receptor de fator de crescimento (GRB2) no domínio SH1 ou através do recrutamento de GRB2 através do adaptador SHC. Ras é ativada pela fosforilação que é mediada pelos fatores trocadores de nucleotídeo guanina (SOS). A Ras ativada liga-se a Raf, que resulta na fosforilação de MAP quinase 1/2 (MEK1/2) e a quinase regulada por sinal

extracelular ERK1/2. ERK1/2 fosforilada transloca para o núcleo e ativa vários fatores de transcrição, tais como ELK1. Várias proteínas do citoesqueleto são ativadas por ERK1/2 (NISHINAKA, YABE-NISHIMURA, 2001, SEBOLT-LEOPOLD, HERRERA, 2004). A fosfolipase C γ (PLC γ) para se tornar ativa liga-se através do domínio SH2 da tirosina quinase fosforilada de EGFR. A PLC γ ativa hidrolisa fosfatidilinositol 4,5 bifosfato à diacilglicerol (LONG, DAGOGO-JACK) e inositol trifosfato (IP3). O IP3 medeia liberação de íons cálcio dos estoques intracelulares, afetando enzimas cálcio-dependentes, enquanto que DAG é um cofator para ativação da PKC. A ativação de PKC resulta na progressão do ciclo celular, transformação, diferenciação e apoptose (OLIVA *et al.*, 2005).

Muitos estudos mostraram evidências que suportam o papel da ativação de EGFR e sinalização na patogenicidade de malignidades (LIN *et al.*, 2001, YARDEN, 2001, ARTEAGA, 2002, JORISSEN *et al.*, 2003, BIANCO *et al.*, 2007). E numerosos estudos tem sugerido uma ligação entre o fenômeno auto-imune e câncer (CHAKRAVARTY, GENOVESE, 2005). Além disso, o aumento intracelular de ROS mediado pela interação de AGE com RAGE aumenta a fosforilação de EGFR e proteínas ERK1/2, induzindo mitogênese (CHEN *et al.*, 2010). Estudos têm mostrado a interconexão entre diabetes e câncer, principalmente câncer de mama, cólon e pâncreas, através da geração de AGEs e sua interação com RAGE (HU, CHENG, 2013, SHARAF *et al.*, 2015, MATOU-NASRI *et al.*, 2017, TAKATA *et al.*, 2017). Assim é possível que polimorfismos no gene *EGFR* possam estar associados ao risco para o desenvolvimento do DM.

O EGFR é codificado por um gene localizado no braço curto do cromossomo 7p12.3-p.1 (HALEY *et al.*, 1987). Consiste de 28 éxons e 27 íntrons e codifica uma glicoproteína de 170 kDa que compreende três domínios: um extracelular (éxons 1 ao 16); domínio intracelular (éxons 18 ao 28) e região transmembrana (éxon 17). O domínio extracelular possui quatro subdomínios (I ao IV). O domínio intracelular possui um domínio regulatório C-terminal e tirosina quinase (TK) (PETRA MARTIN *et al.*, 2006) (Figura 14).

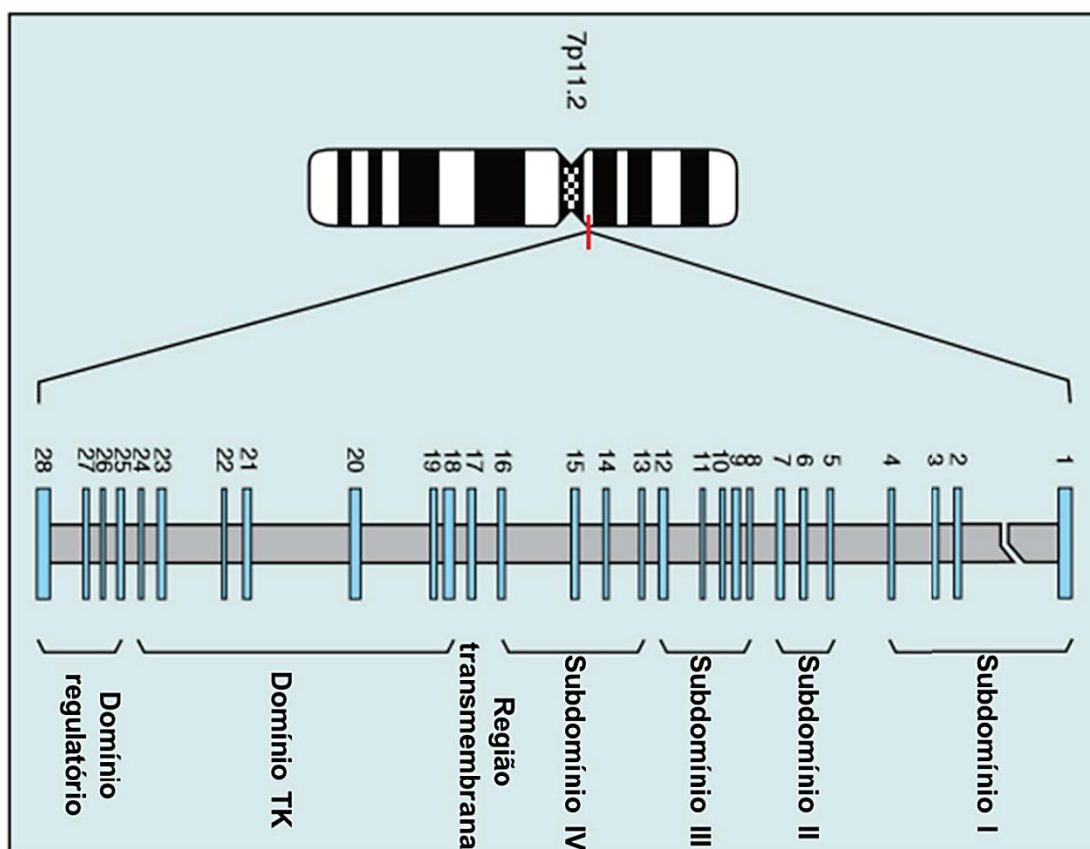


Figura 14 – Representação esquemática da localização cromossômica do gene *EGFR*, estrutura dos exons e domínios proteicos.. O gene *EGFR* consiste de 28 exons e 27 introns e codifica uma glicoproteína de 170 kDa que compreende três domínios: um extracelular (éxons 1 ao 16); domínio intracelular (éxons 18 ao 28) e região transmembrana (éxon 17). O domínio extracelular possui quatro subdomínios (I ao IV). O domínio intracelular possui um domínio regulatório C-terminal e tirosina quinase.

Fonte: Adaptado de Martin e colaboradores (2006).

Diversos polimorfismos não sinônimos foram identificados na sequência codificadora de EGFR. Entre eles, o polimorfismo R521K (previamente denominado de R497K; rs2227983; rs11543848 ou 142285G>A) com a troca de G por A no exon 13, resultando na substituição da arginina pela lisina no códon 521. A variante 521K mostrou capacidade significativamente reduzida de ligação com TGF- α e sinalização induzida pelo ligante de EGFR. Estudo *in vitro* mostrou que o genótipo Lys/Lys apresenta atenuação das funções de ligação do ligante, estimulação do crescimento, ativação da tirosina quinase e indução de proto-oncogenes (*myc*, *fos* e *jun*) (MORIAL *et al.*, 1994). Este polimorfismo foi associado com síndrome coronariana (GAO *et al.*, 2008), prognóstico de carcinoma coloretal (WANG *et al.*, 2007) e câncer avançado de pulmão (SASAKI *et al.*, 2009). Contudo, não foi associado com artrite reumatoide (LO *et al.*, 2012).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 CARACTERIZAÇÃO E COLETA DAS AMOSTRAS

Após aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Setor de Ciências da Saúde da UFPR – CEP HC/UFPR (número CAAE 24676613.6.0000.0102), amostras de soro e sangue total de 790 indivíduos (n=790), classificados em pacientes com DM1 (n=143), pacientes com DM2 (n=293) e indivíduos saudáveis sem diabetes (grupo controle, n=354), foram estudados. O grupo controle foi obtido no Banco de Sangue do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná (HC-UFPR) e os pacientes com DM na Unidade de Diabetes do Serviço de Endocrinologia e Metabologia do HC-UFPR (SEMPR). Os pacientes que aceitaram participar da pesquisa assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido autorizado pelo CEP HC/UFPR.

O grupo DM1 foi composto por pacientes com idade de diagnóstico acima de 18 anos e de pacientes com DM foram caracterizados conforme classificação proposta pela ADA (ADA, 2018).

Foram coletadas 3 amostras de cada paciente: 1 em tudo com gel separador de 8mL, 1 em tubo com fluoreto de sódio de 4mL e outra em tubo com anticoagulante EDTA_{K2}. Em seguida, os dois primeiros tubos foram submetidos à centrifugação a 3500 rotações por minuto (rpm) por 15 minutos. Os tubos contendo anticoagulante EDTA_{K2} (BD) foram homogeneizados por 15 minutos e foi obtida uma alíquota de 500 µL para análises de HbA1c. Posteriormente foi centrifugado a 3500 rotações por minuto (rpm) por 15 minutos para obtenção do *buffy coat* para extração do DNA genômico. As amostras que apresentaram hemólise ou lipemia foram excluídas. As amostras de soro e plasma com EDTA foram alíquotadas e estocadas em freezer a -20°C e a -80°C.

Os dados antropométricos e clínicos foram obtidos dos prontuários dos pacientes do Serviço do Hospital de Clínicas, dispensando assim a necessidade de entrevista.

4.2 QUANTIFICAÇÃO DE PARÂMETROS BIOQUÍMICOS E DADOS ANTROPOMÉTRICO

Os ensaios laboratoriais foram realizados em sistema automatizado Architect Ci8200 (Abbott Laboratórios do Brasil) ou Labmax 400 (Labtest SA), empregando o uso de reagentes, calibradores e controles recomendados pelos fabricantes.

O colesterol da fração LDL foi calculado pela equação de Friedewald, onde $LDL-C = \text{Colesterol total} - HDL-C - TG/5$ (XAVIER *et al.*, 2013).

O histórico familiar de diabetes, doenças da tireóide e obesidade foram caracterizados pela presença de pelo menos um dos parentes de 1º grau apresentando a patologia. A dislipidemia foi caracterizada pelo uso de hipolipemiantes.

A Tabela 2 descreve os principais parâmetros laboratoriais quantificados e suas características.

4.3 EXTRAÇÃO DO DNA GENÔMICO

O DNA genômico foi extraído do sangue total utilizando a metodologia de *Salting out* (LAHIRI, NURNBERGER, 1991). A qualidade e quantificação do DNA foram avaliadas utilizando o equipamento *Nanodrop* (Thermo Scientific), sendo critério de exclusão amostras com concentração inferior a 20 ng/μL e razão 260/280nm menor que 1,8 ou superior a 2,0, o que caracteriza contaminação e baixa qualidade da amostra. As amostras de DNA foram diluídas à concentração final de 100 ng/μL com água ultrapura estéril e armazenadas em freezer a -20°C.

Tabela 2 – Parâmetros bioquímicos, metodologias e intervalo de referência.

Exame	Princípio do Método	Intervalo de Referência
1,5-AG	Enzimático colorimétrico (Glycomark)	>10 µg/mL
Ácido úrico	Enzimático (urease) - Trinder	Homens – 2,5-7,0 mg/dL Mulheres – 1,5-6,0 mg/dL
Albumina	Verde de bromocresol	3,5-5,0 g/dL
ALT	Cinético – UV	< 40 U/L
AST	Cinético – UV	< 57 U/L
Colesterol Total	Colorimétrico (Enzimático - Trinder).	<190 mg/dL
Creatinina	Colorimétrico (Picrato alcalino cinético).	0,6-1,1 mg/dL
Gama-GT	Cinético - colorimétrico	H < 58 U/L M < 43 U/L
Glicose	Hexoquinase UV	<100 mg/dL
HbA1c	Imunoturbidimétrico	4,0-6,0%
HDL-C	Homogêneo Surfactante Seletivo	Desejável: >60 mg/dL Baixo: <40 mg/dL
LDL-C	Equação de Friedewald LDL-c = Col – HDL-c – (TG/5)	<130 mg/dL
PCR-us	Imunoturbidimétrico	Risco baixo <1,0 mg/dL Moderado 1,0-3,0 mg/dL Elevado >3,0 mg/dL
Proteínas Totais	Colorimétrico	6,0-8,0 g/dL
Taxa de filtração glomerular estimada TFGe	Estimado segundo a <i>National Kidney Foundation</i> com a equação CKD-EPI Creatinine. https://www.kidney.org/professionals/KDOQI/gfr	>90 mL/min/1,73 m ² Baixo <60 mL/min/1,73 m ²
Triglicerídeos	Ensaio enzimático colorimétrico	<150 mg/dL (jejum 12 h))
Ureia	Urease - UV cinético	15-44 mg/dL

As análises foram realizadas no sistema automatizado LabMax400 (Labtest SA), com padrões, controles e calibradores fornecidos pelo fabricante.

A determinação de 1,5 anidroglicitol (1,5-AG) foi realizada com reagentes (GlicoMark), calibradores e controles fornecidos pela Tomen Inc. (USA)

Fonte: O autor (2018).

4.4 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)

Para a identificação das regiões polimórficas as amostras selecionadas foram amplificadas por PCR. Os oligonucleotídeos iniciadores foram sintetizados conforme descritos na Tabela 2 para os seguintes polimorfismos: rs1800624, rs1800625, 2070600, rs2107538, rs2280788, rs3918242, rs1001179 e rs2227983 (HUDSON *et*

al., 2001a, KANKOVA *et al.*, 2001b, SOBTI *et al.*, 2012, SINGH *et al.*, 2013, AKAHANE *et al.*, 2016)

As reações de amplificação foram realizadas em volume final de 10 µL e as condições otimizadas foram: 6,4 µL de água reagente estéril, 1,0 µL de Tampão Taq 10X (200 mM Tris-HCl pH 8,4; 500 mM KCl), 0,8 µL de MgCl₂ (25 mM), 0,1 µL de cada oligonucleotídeo iniciador (Primer F e Primer R), 0,4 µL de dNTP (5 mM), 0,2 µL de Taq DNA polimerase (5 U/µL) e 1,0 µL de DNA molde (100 ng/µL), e as condições em que foram realizadas as PCRs encontram-se descritas na Tabela 3.

Tabela 3 - Parâmetros de genotipagem para as reações de PCR-RFLP.

SNP	Oligonucleotídeos Iniciadores	T(°C)	Enzima de restrição	Genotipagem e Tamanho dos Fragmentos
rs1800624 -374T>A RAGE	F-TTTTCCCTGGGTTTAGTTGAGA R-ATGCTAGGAATTCATGCCTTTG	65°C	<i>Tsp509 I</i>	TT-217pb + 110pb + 77pb TA-327pb + 217pb + 110pb + 77pb AA-327pb + 77pb
rs1800625 -429T>C RAGE	F-TTTTCCCTGGGTTTAGTTGAGA R-ATGCTAGGAATTCATGCCTTTG	37°C	<i>Alu I</i>	TT-404pb TC-404pb + 326pb + 78pb CC-326pb + 78pb
rs2070600 G82S RAGE	F-GTAAGCGGGGCTCCTGTTGCA R-GGCCAAGGCTGGGGTTGAAGG	67°C	<i>Alu I</i>	GG-248pb + 123pb + 26 pb GS-248pb + 181pb + 123pb + 67 pb + 26 pb SS- 181pb + 123 pb + 67pb + 26pb GG-206pb
rs2107538 -403G>A RANTES	F-CACAAGAGGACTCATTCCAACCTCA R-GTTCTTGCTTATTACATTACAGATCGTA	37°C	<i>Rsa I</i>	GA-206pb + 180pb + 26pb AA-180pb + 26pb
rs2280788 -28C>G RANTES	F-ACTCCCCTTAGGGGATGCCGT R-GCGCAGAGGGCAGTAGCAAT	37°C	<i>Hinc II</i>	CC-175pb CG-175pb + 152pb + 23pb GG-152pb + 23pb
rs3918242 -1562C>T MMP9	F-GCCTGGCACATAGTAGGCC R-CTTCCTAGCCAGCCGGCATC	37°C	<i>Sph I</i>	CC-436pb CT-436pb + 244pb + 192pb TT-244pb + 192pb
rs1001179 -262C>T CAT	F-AGAGCCTCGCCCCGCCGACCG R-TAAGAGCTGAGAAAGCATAGCT	37°C	<i>Sma I</i>	CC-155pb + 30pb CT-185pb + 155pb + 30pb TT-185pb
rs2227983 142285G>A EGFR	F-TGCTGTGACCCACTCTGTCT R-CCAGAAGGTTGCACTTGTC	60°C	<i>Bstn I</i>	GG-67pb + 50pb + 38pb GA-117pb + 67pb + 50pb + 38pb AA-117pb + 38pb

Fonte: O autor (2018).

Tabela 4 - Condições utilizadas para PCR

SNP	Desnaturação inicial	Nº ciclos	Desnaturação	Anelamento	Extensão	Extensão Final
rs1800624	94°C, 2min	34	94°C, 1min	62°C, 1min	72°C, 2min	72°C, 10min
rs1800625	94°C, 2min	34	94°C, 1min	62°C, 1min	72°C, 2min	72°C, 10min
rs2070600	94°C, 3min	34	94°C, 40seg	68°C, 40seg	72°C, 45 s	72°C, 10min
rs2107538	94°C, 1min	35	94°C, 30seg	57°C, 30seg	72°C, 30 s	72°C, 5 min
rs2280788	94°C, 1min	35	94°C, 30seg	61°C, 30seg	72°C, 30 s	72°C, 7min
rs3918252	94°C, 2min	30	94°C, 1min	58°C, 1min	72°C, 1 min	72°C, 5min
rs1001179	95°C, 5min	30	95°C, 30seg	56°C, 30seg	72, 45 s	72°C, 5min
rs2227983	95°C, 5min	28	94°C, 1 min	55°C, 1min	72°C, 2 min	72°C, 10min

Fonte: O autor (2018).

Os produtos de PCR foram analisados em relação à quantidade e qualidade dos produtos por eletroforese em agarose 1,5% em tampão TBE 1X (89mM Tris Base, 89mM ácido bórico, e 2mM EDTA), sendo aplicado 2 µL do produto de PCR adicionado de 3µL de *loading dye* (glicerol 30% v/v acrescido de 0,05% de azul de bromofenol e 0,05% de xileno cianol). A visualização do produto de PCR foi realizada por coloração com brometo de etídeo, sob luz ultravioleta utilizando foto documentador L-PIX (Loccus) para registro e captura de imagem dos géis.

As reações para detecção de polimorfismos de comprimento de restrição (PCR-RFLP) foram realizadas utilizando as enzimas de restrição citadas na Tabela 2 para todos os polimorfismos seguindo o protocolo de cada fabricante. Os fragmentos de restrição foram separados por eletroforese em gel de poliacrilamida (29:1), em tampão TBE 1X. Ao volume total de cada reação de restrição (5 µL) foi adicionado 3 µL de *loading dye* e aplicado em gel de poliacrilamida. A coloração dos géis foi realizada com brometo de etídeo e visualizada sobre luz ultravioleta com imagem do gel capturada no sistema de fotodocumentador L-PIX (Loccus). Estão descritos na Tabela 2 os tamanhos dos fragmentos para cada polimorfismo, onde foi realizado a genotipagem para obtenção dos diferentes genótipos.

4.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

No presente grupo de estudo a normalidade das variáveis contínuas foi avaliada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. As comparações entre variáveis contínuas com distribuição normal foram realizadas pelo teste “t” de Student para amostras independentes ou pela análise de variância (ANOVA) quando pertinente. Variáveis que apresentaram distribuição normal foram descritas como média ± desvio padrão. Variáveis que não apresentam distribuição normal foram comparadas

pelo teste U de Mann-Whitney ou teste de Kruskal-Wallis (ANOVA não paramétrica). Estas variáveis foram apresentadas como mediana (intervalo interquartil, 25%-75%).

Para as análises de correlação linear (Pearson) e nos estudos de associação de variáveis genéticas com parâmetros laboratoriais e dados clínicos dos pacientes, os resultados foram apresentados pelo coeficiente de correlação (r) e a probabilidade da análise ou análise de variância (ANOVA), neste caso foram utilizados para os polimorfismos e estudo e como variável classificadora.

Para obter os cálculos das comparações envolvendo frequências alélicas e genóticas onde incluímos as análises de intervalo de confiança de 95% (IC95%) e equilíbrio de *Hardy-Weinberg*, foi utilizado o programa DeFinetti, disponível em <http://ihg.gsf.de/cgi-bin/hw/hwa1.pl>. As comparações feitas entre as frequências alélicas observadas no estudo e comparada com outros trabalhos publicados, foram analisados e considerados os resultados que apresentaram valores da frequência do alelo raro que se enquadrava dentro dos limites do intervalo de confiança de 95%. O programa Statistica para Windows 8.0 (StatSoft, Inc. Tulsa, OK) foi utilizado para as análises estatísticas.

Na comparação dos polimorfismos com os biomarcadores, os polimorfismos de único nucleotídeo foram codificados como 1 (homozigoto frequente); 2 (heterozigoto) e 3 (homozigoto raro). As triagens de associação foram analisadas por ANOVA. As comparações das associações com probabilidades significativas foram analisadas pelo teste de Tuckey para tamanhos amostrais diferentes (unequal N HSD).

Para comparação das variáveis discretas foram utilizados os testes de Qui-quadrado (χ^2) ou o teste Exato de Fisher bidirecional, bem como tabelas de contingência disponíveis em http://www.physics.csbsju.edu/stats/contingency_NROW_NCOLUMN_form.html.

Para as determinações do intervalo de confiança de 95% e curvas ROC foi utilizado o programa MedCalc versão 18.5 (MedCalc Software bvba, Ostend, Belgium).

Uma probabilidade inferior a 5% ($P < 0.05$) foi considerada significativa em todas as análises.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 VARIAÇÃO DO 1,5-AG NO DIAGNÓSTICO DO DM2

As análises dos dados antropométricos e parâmetros bioquímicos utilizados para avaliação dos biomarcadores de perfil glicêmico para uso diagnóstico para o DM2 estão descritas na Tabela 4.

O uso do 1,5-AG para triagem ou diagnóstico do DM é controverso. Yamanouchi e colaboradores (1991) e Lu e colaboradores concluíram que o 1,5-AG é suficientemente sensível e específico para o diagnóstico do diabetes (LU *et al.*, 2003), enquanto que Robertson e colaboradores (1993) obtiveram resultados contrários. Desta forma, avaliamos a capacidade discriminadora do 1,5-AG para o diagnóstico do DM2 em um grupo de pacientes com controle glicêmico moderado (HbA1c entre 7-8%) com tempo de diabetes de 9 anos e sem evidência de nefropatia manifesta (Tabela 4). O estudo não incluiu indivíduos com insuficiência renal uma vez que pode afetar as concentrações plasmáticas de 1,5-AG (HASSLACHER, KULOZIK, 2016).

Tabela 5 – Parâmetros antropométricos e bioquímicos para os grupos Controle e DM2.

Parâmetros	Controles n=291	DM2 n=276	
Gênero (H/M)	77/214	67/209	0,550*
Duração DM em anos	-	9,0 (5,-14)	-
Idade (anos)	49,0 (46-56)	54 (50-60)	<0,001
IMC (kg/m ²)	26,0 (23,4-29,0)	30,7 (27,2-34,8)	<0,001
Glicemia (mg/dL)	91,9 (81,1-104,5)	131,5 (104,5-174,8)	<0,001
HbA1c (%)	5,3 (5,1-5,6)	7,6 (6,3-9,2)	<0,001
1,5-AG (µg/mL)	22,6 (18,7-27,6)	9,4 (4,5-18,8)	<0,001
Albumina (g/dL)	3,9 (3,8-4,0)	4,1 (3,9-4,3)	<0,001
Creatinina (mg/dL)	0,6 (0,5-0,8)	0,8 (0,7-0,9)	<0,001
TFGe (mL/min/1,73 m ²)	119 (98-148)	82 (71,5-94)	<0,001

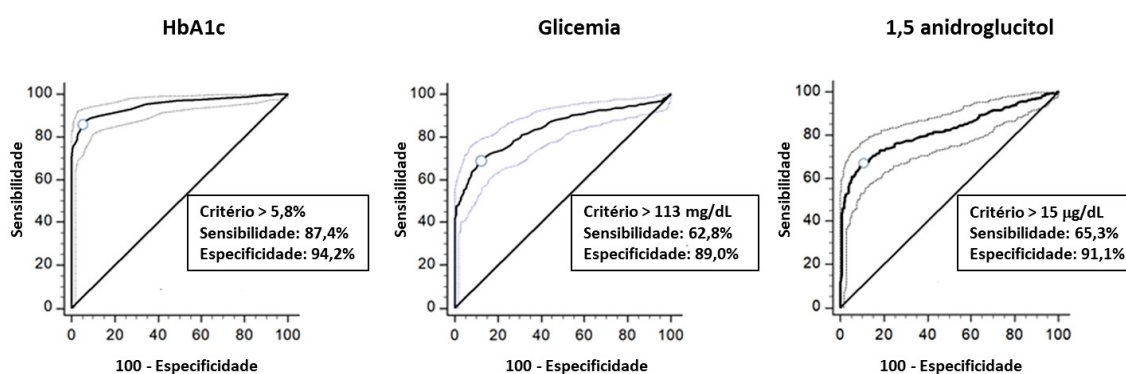
Gênero, H, homem; M, mulher.

DM: diabetes tipo 2; IMC: índice de massa corporal; 1,5-AG: 1,5 anidroglicitol; TFGe: taxa de filtração glomerular estimada. Mann-Whitney U test e *Chi-square test.

Fonte: O autor (2018).

Foi feito a curva ROC para os biomarcadores de controle glicêmico (1,5-AG, glicemia em jejum e HbA1c (Figura 15). O valor de corte de 15 µg/dL de 1,5-AG (critério) apresenta sensibilidade de 65,3% (95%IC, 9,8-11,7 µg/dL) e especificidade de 91,1% (95%IC, 14,3-15,5 µg/dL) para discriminar pacientes com DM2 do grupo

controle. Nossos achados estão em concordância com o estudo de Robertson e colaboradores (1993) em uma população Chinesa, no qual concluiu que a acurácia diagnóstica do 1,5-AG foi pobre para discriminar DM2 em qualquer valor de corte avaliado. Em contraste, o estudo de Yamanouchi e colaboradores (1991) encontrou uma sensibilidade de 74,1% e especificidade de 97,4% na discriminação do DM1 e DM2 na concentração de corte de 10 µg/dL. Lu e colaboradores (2003) encontraram uma sensibilidade de 95,8% e especificidade de 95,7% na discriminação do DM2 no valor de corte de 11,5 µg/dL.



Parâmetros	Biomarcadores		
	HbA1c	Glicemia	1,5-AG
Índice J-Youden	0,815	0,573	0,564
AUC* (95%IC)	0,951 (0,93-0,97)	0,841 (0,81-0,87)	0,820 (0,79-0,75)
Critério	> 5,8%	> 113 mg/dL	≥ 15 µg/dL
Sensibilidade (%)	87,4	62,2	65,3
Especificidade (%)	94,2	89,0	91,1
Acurácia (%)	87,0	75,1	78,3

Figura 15. Curvas ROC para os biomarcadores de controle glicêmico HbA1c, glicemia, e 1,5-anidroglicitol (1,5-AG).

O círculo indica o valor de corte (critério utilizado) e as linhas pontilhadas indicam o intervalo de confiança de 95%. A tabela abaixo da figura descreve índices relevantes. * AUC (*Area Under de the Curve*) foi diferente significativamente para os três biomarcadores ($P < 0,001$). Os valores preditivos positivos (%) e valores preditivos negativos (%) para HbA1c, glicemia e 1,5-AG foram 93,2% e 82,2%; 85,4% e 74,4%; e 87,3% e 73,2%, respectivamente.

Fonte: O autor (2018).

A área sob curva (AUC) calculada para os biomarcadores testados foi significativa ($P < 0,001$), caracterizando que estes biomarcadores são capazes de discriminar o DM2. Não houve diferença significativa ($P = 0,212$) entre as AUC (\pm erro padrão) do 1,5-AG e da glicemia ($0,820 \pm 0,018$ vs. $0,851 \pm 0,017$). Contudo, a AUC para HbA1c ($0,951 \pm 0,009$) foi significativamente maior ($P < 0,001$) do que a do 15-AG e glicemia. A curva ROC para a glicemia e 1,5-AG mostraram AUC muito bom, contudo um pobre índice Youden J ($< 0,7$) (Figura 15) (RAY *et al.*, 2010).

O 1,5-AG apresenta capacidade para discriminar o DM2, como demonstrado pela curva ROC, de forma similar com a glicemia, contudo, com capacidade marcadamente inferior quando comparado à HbA1c (Figura 15). A HbA1c no valor de corte de 5,8% (média estimada de glicemia em 121 mg/dL) foi melhor discriminador para o DM2 do que o 1,5-AG e glicemia de jejum (Figura 15). Estudos mostraram que a HbA1c e 1,5-AG são bons preditores para identificação do DM2 em indivíduos jovens obesos (SHAH *et al.*, 2009, CHAN *et al.*, 2015) e que estes dois biomarcadores apresentam melhor performance na discriminação em indivíduos jovens quando comparados a indivíduos mais velhos, e que a HbA1c provavelmente é superior ao 1,5-AG para teste de triagem do DM2 (TSUKUI, KOBAYASHI, 1995).

Uma possível explicação para o 1,5-AG apresentar uma discriminação pobre do DM2 em nosso estudo recai nas características dos pacientes DM2 envolvidos, os quais apresentam controle glicêmico moderado, não apresentando episódios de hiperglicemia (picos hiperglicêmicos ou hiperglicemia pós-prandial com intensidade e duração suficiente para promover mudanças significativas das concentrações plasmáticas do 1,5-AG. As concentrações de 1,5-AG só reduzem substancialmente quando as concentrações plasmáticas de glicose são muito elevadas, e excedendo o limiar renal, usualmente 180 mg/dL (YAMANOUCHI *et al.*, 1992a). No DM2, o limiar renal pode ser superior, entre 200-250 mg/dL (OSAKI *et al.*, 2016), o que reforça nossa hipótese. Adicionalmente, os pacientes DM2 avaliados por Lu e colaboradores (2003), no qual foi encontrada boa sensibilidade (95,8%) e especificidade (95,7%) na discriminação do DM2 pelo 1,5-AG, com valor de corte de 11,5 µg/dL, apresentavam controle glicêmico inadequado (1,5-AG, 4.02 ± 2.96 µg/dL; HbA1c, $10,7 \pm 2,1\%$ e glicemia em jejum 196 ± 58 mg/dL). Esta avaliação também contribui com nossa hipótese.

Em síntese, concentrações séricas do biomarcador 1,5-AG superiores a 15 µg/mL (>91 µmol/L) é capaz de discriminar indivíduos com DM tipo 2 de normoglicêmicos saudáveis, com boa especificidade (91%), mas sensibilidade pobre (65%), na ausência de lesão renal manifesta (TFGe >80 mg/mim/1,73m²). A capacidade discriminatória do 1,5-AG em pacientes com DM2 com controle glicêmico moderado (HbA1c, mediana 7,6%) apresentados neste estudo foi inferior aquele fornecido pela HbA1c (Sensibilidade 87% e especificidade 94%).

5.2 ANÁLISES DOS DADOS ANTROPOMÉTRICOS E PARÂMETROS BIOQUÍMICOS

As amostras em estudo para as análises moleculares foram pareadas por gênero e divididas em três grandes grupos (Controles saudáveis, DM1 com idade de diagnóstico >18anos, DM2) conforme já descrito em materiais e métodos. As análises estatísticas descritivas estão reportadas na Tabela 5.

5.2.1 Idade

O grupo controle saudável empregado no estudo tem idade média similar aos pacientes com DM2 (Tabela 5), sendo ambos significativamente ($p < 0,001$) mais velhos que os pacientes com DM1. Esta característica está em concordância com outros estudos e com a própria descrição dos tipos de diabetes, que atribuem ao DM1 as características de diabetes com início na juventude e ao DM2 um diabetes da maturidade. DM2 pode ocorrer em qualquer idade, mas é geralmente diagnosticado após os 40 anos. O risco para DM2 aumenta de acordo com a idade, e independe do sexo e da etnia (QIAO *et al.*, 2003).

Tabela 6 – Dados antropométricos dos grupos Controles, DM1 e DM2.

Parâmetros	Controle n=354	DM1 n=143	DM2 n=293	C vs DM1	C vs DM2	DM1 vs DM2
Gênero (H/M)	107/248	45/98	70/225	0,084	0,067	0,084*
Idade (anos)	49,9±9,0	42,3±12,6	51,2±8,9	<0,001	0,060	<0,001
Peso (kg)	73,6±13,1	71,7±17,1	79,5±16,7	0,191	<0,001	<0,001
Altura (m)	1,66±0,09	1,63±0,10	1,61±0,08	0,003	<0,001	0,012
IMC (kg/m ²)	26,8±4,1	26,9±5,8	30,8±6,3	0,706	<0,001	<0,001
Hipertensão Arterial (%)	ND	46,7	70,5	-	-	<0,001
Tabagismo (%)						
Não fumante	ND	60,7	58,0	-	-	-
Ex-fumante		26,7	34,2			
Fumante		12,6	7,8			
Doença da Tireoide (%)	ND	34,8	32,9	-	-	0,056
DAC (%)	ND	23	20,3	-	-	<0,001
Dislipidemia (%)	ND	40	66,4	-	-	<0,001
Tempo de DM	ND	16,1±10,3	11,1±10,5			<0,001
HFDm (%)	ND	68,1	67,4	-	-	0,887
HFO (%)	ND	29,6	34,6	-	-	0,311
HFDAC (%)	ND	54,1	57,3	-	-	0,550
HFDt (%)	ND	23,7	23,0	-	-	0,882
Uso de Insulina (%)	ND	100	58,6	-	-	<0,001
Hipoglicemiante Oral (%)	ND	0	78,9	-	-	-
Antihipertensivo (%)	ND	43,8	71,2	-	-	<0,001
Hipolipemiante (%)	ND	42,1	67,5	-	-	0,320
Complicações do DM (%)						
Retinopatia		14,9	19,0			0,320
Neuropatia	ND	4,6	7,5	-	-	0,253
IAM		7,4	7,8			0,901
Nefropatia		10,7	5,7			0,546

H: Homens, M: Mulheres. IMC: Índice de massa corpórea. C vs DM1: Controle versus Diabetes tipo 1, valores de P, C vs DM2: Controle versus Diabetes tipo 2, valores de P, DM1 vs DM2: Diabetes tipo 1 versus Diabetes tipo 2, valores de P. *Teste do Chi-quadrado. ND: Dados não disponíveis. Abreviações: C: controle; DM1: *Diabetes mellitus* tipo 1; DM2: *Diabetes mellitus* tipo 2; HFO: histórico familiar de obesidade; HFDm: histórico familiar de *Diabetes mellitus*; HFDAC: histórico familiar de doença arterial coronariana; DT: doença tireoidiana; IAM: infarto agudo do miocárdio. ND: não há dados. Fonte: O autor (2018).

5.2.2 Peso, IMC e Obesidade

Os grupos DM1 e controle apresentam IMC similares entre si, mas inferiores ao do grupo DM2 ($p < 0,001$) (Tabela 6). Os grupos DM1 (26,9 kg/m²) e controle (26,8 kg/m²) apresentam sobrepeso (IMC > 25 kg/m²) e o grupo DM2 (30,8 kg/m²) é compatível com a classe I de obesidade proposta pela OMS (WHO, 2000). Pacientes com DM1 costumam apresentar IMC normal ou reduzido, mas os fenótipos destes pacientes vêm mudando nos últimos anos. Isto pode ser um resultado do efeito da insulino-terapia, hormônios ou também do aumento na ingestão calórica evitando os quadros de hipoglicemia (CONWAY *et al.*, 2010). A obesidade é considerada um dos

principais fatores de risco para o desenvolvimento do DM2, quanto maior o IMC, maior o risco de desenvolver a doença (LOGUE *et al.*, 2014).

5.2.3 Hipertensão (HAS)

Os grupos DM1 (46,7%) e DM2 (70,5%) apresentaram elevada frequência de HAS (Tabela 6). Nossos dados confirmam ser a hipertensão um dos principais achados, associada ao diabetes, em particular nos pacientes com DM2, reproduzindo as características para este fator descritas em outros estudos (DODSON, 2002, ENGELEN *et al.*, 2010, BARRA *et al.*, 2012, DANQUAH *et al.*, 2013, DAL SANTO FRANCISCO BONAMICHI *et al.*, 2016). A frequência de hipertensão no grupo DM1 foi similar a reportada na população Americana (43%) (MAAHS *et al.*, 2005) e superior a reportada em outro estudo brasileiro (19,2%), contudo foi mostrado neste estudo que a frequência da hipertensão estava relacionada à idade, tempo de duração do DM, IMC e perfil lipídico (GOMES *et al.*, 2013).

Estudos populacionais mostram que a prevalência de HAS é elevada no Brasil (MALACHIAS *et al.*, 2016). A HAS e o DM estão fortemente associados, já que pacientes que apresentam DM tem um risco maior de desenvolver HAS (SBD, 2017). Assim como o DM, a HAS tem um grande impacto no desenvolvimento das complicações vasculares, e ambas as condições podem compartilhar de mecanismos comuns de lesão endotelial (LONG,DAGOGO-JACK, 2011).

5.2.4 Tabagismo

O expressivo número de ex-fumantes, principalmente entre os DM2 (34,2% - Tabela 6) pode ser resultado do abandono do tabaco imposto no diagnóstico do diabetes associado à HAS, fatores de risco para doença arterial coronariana (DAC).

Os efeitos adversos à saúde do tabagismo são bem reconhecidos em relação ao risco futuro de câncer e doença cardiovascular. Apesar disso, as taxas de tabagismo são significativamente mais altas entre os jovens com DM do que entre os jovens sem DM (KARTER *et al.*, 2008, REYNOLDS *et al.*, 2011).

A porcentagem de fumantes no grupo DM1 (12,6%) foi superior a descrita para o grupo DM2 e diferente das reportadas em outros estudos brasileiros (15,3%, 23,11% e 7,3%) (HIRAI *et al.*, 2007, ESTEVES *et al.*, 2009, GOMES *et al.*, 2012). A

frequência de fumantes no grupo DM2 foi similar (7,9%) a um estudo realizado em Brasília (BARRA *et al.*, 2012), mas inferior a de outros estudos (BAHIA *et al.*, 1999, ALVARENGA *et al.*, 2007, DE ALMEIDA-PITITTO *et al.*, 2015, MAGALHÃES *et al.*, 2017) (Tabela 5).

Fumo pode ter papel no desenvolvimento do DM2 (JANKOWICH *et al.*, 2011, AKTER *et al.*, 2017). A avaliação rotineira e completa do uso do tabaco é essencial para evitar o fumo ou estimular a cessação. Embora, alguns pacientes ganhem peso em curto período de tempo após parar de fumar (TIAN *et al.*, 2016), estudos recentes têm demonstrado que este ganho de peso não diminui o substancial benefício cardiovascular obtido por parar de fumar (CLAIR *et al.*, 2013).

Um estudo em fumantes recém-diagnosticados com DM2 demonstrou que parar de fumar foi associado com melhora dos parâmetros metabólicos e redução da pressão sanguínea e albuminúria em 1 ano (VOULGARI *et al.*, 2011).

5.2.5 Doença tireoidiana

Estima-se que a prevalência de doença tireoidiana na população em geral seja 6,6% (CANARIS *et al.*, 2000) e na diabética por volta de 10,8% (WU, 2000).

No grupo DM1, a prevalência de doença tireoidiana foi de 34,8% (Tabela 5). A observada elevada prevalência de doença tireoidiana está em concordância com outros estudos que descrevem a incidência entre 15 a 30% de doença autoimune tireoidiana em pacientes DM1 (KARAVANAKI *et al.*, 2009, VAN DEN DRIESSCHE *et al.*, 2009, KAHALY, HANSEN, 2016, NEDERSTIGT *et al.*, 2016). Outros estudos conduzidos no Brasil mostraram prevalências da doença tireoidiana de 20,6% (RAMOS *et al.*, 2003), 30,7% (SOUZA *et al.*, 2005), 33% (ARAUJO *et al.*, 2008).

No grupo DM2, a prevalência de doença tireoidiana foi de 32,9% (Tabela 6). Demitrost e Ranabir (2012) em seu estudo relataram frequências de 31,2%, Celani, Bonati e Stucci (1994) de 31,4% e Díez, Sánchez e Iglesias (2011) de 32,4%. Outros estudos reportam uma prevalência menor entre 12,4-13,4% (PERROS *et al.*, 1995, RADAIDEH *et al.*, 2004, RAMASAMY *et al.*, 2011, PALMA *et al.*, 2013).

Estas diferenças de frequência podem ser decorrentes da diversidade de critérios diagnósticos para a doença tireoidiana (valor de corte utilizado para o TSH), heterogeneidade das populações estudadas, insensibilidade relativa do teste utilizado para avaliar a função tireoidiana e falta de utilização de testes de imagem

da tireoide para o diagnóstico confirmatório (VANDERPUMP *et al.*, 1995, CANARIS *et al.*, 2000).

Alguns trabalhos mostram uma maior frequência de disfunção tireoidiana em pacientes com DM1 comparada com pacientes com DM2 (PERROS *et al.*, 1995, BADMAN, CHOWDHURY, 2002, GOPINATH *et al.*, 2008, DOSI, TANDON, 2010). Contudo, outros estudos reportaram a mesma prevalência entre os dois tipos de DM (WARREN *et al.*, 2004, PIMENTA *et al.*, 2005, RAMASAMY *et al.*, 2011, PALMA *et al.*, 2013), em concordância com nossos dados (Tabela 6).

A alta prevalência de doença tireoidiana nos pacientes DM1 e DM2 encontrada neste trabalho recomenda a triagem para identificar a doença tireoidiana, através da dosagem do TSH, como fator relevante associado ao DM. Também, o diagnóstico de alteração tireoidiana associado ao DM tem impacto na terapêutica com insulina. A sensibilidade à insulina e a necessidade desta são afetados na presença da doença tireoidiana, requerendo aumento na dose deste hormônio neste grupo de pacientes (DUNTAS *et al.*, 2011, WARD *et al.*, 2018).

5.2.6 Doença arterial coronariana (DAC) e Dislipidemia

Para os indivíduos do grupo controle (saudáveis) não foi possível obter a avaliação da presença ou risco de DAC pela falta de informação nos prontuários do Banco de Sangue.

A DAC ocorre mais comumente em pessoas com DM do que na população em geral, afetando mais de 55% dos pacientes. O DM é um dos principais fatores de risco para a doença cardiovascular (SIQUEIRA *et al.*, 2007, FALUDI *et al.*, 2017b). A maior frequência de DAC nos pacientes diabéticos está associada aos fatores de risco que contribuem para o desenvolvimento das complicações diabéticas (BROWNLEE, 2001, SAKURAI *et al.*, 2003, NAKA *et al.*, 2004).

Nosso estudo mostra que a DAC está presente nos pacientes com DM1 (23%) em uma proporção um pouco superior ao paciente com DM2 (20,3%). A elevada prevalência de DAC em pacientes com DM2 está relacionada com o maior número de fatores de risco quando comparado com os pacientes com DM1, entre eles resistência à insulina, sobrepeso/obesidade, idade e hipertensão (MUIR *et al.*, 1992, LERARIO *et al.*, 1997, WARRAM *et al.*, 1997). Embora no DM1 não estejam associados muitos dos fatores de risco para DAC reconhecidos na DM2, o risco

relativo ajustado à idade para DAC no DM1 pode até exceder o da DM2 (KROLEWSKI *et al.*, 1987).

Gall e colaboradores (1991) demonstraram que a prevalência de DAC em pacientes com DM2 é dependente da concentração de albumina urinária, correspondendo à 46% na macroalbuminúria, 26% na microalbuminúria, e 22% na normoalbuminúria. A frequência de DAC no grupo DM2 (20,3%) foi similar à descrita por Saisho e colaboradores (2011) (19,7%). Em um estudo realizado no Brasil, a frequência encontrada de DAC em pacientes com DM1 foi de 25% (A. S. M. MATHEUS *et al.*, 2008) e para DM2 de 43,6% (BAHIA *et al.*, 1999), corroborando com outros estudos (LERARIO, 1998, ALVARENGA *et al.*, 2007, COBAS *et al.*, 2008, A. S. M. MATHEUS *et al.*, 2008).

A dislipidemia é uma característica comum do diabetes (CHAPMAN *et al.*, 2011). Existe associação entre DAC e as concentrações plasmáticas de colesterol e triglicerídeos nos pacientes DM1 e DM2 (WEST *et al.*, 1983, HOWARD *et al.*, 2000). O risco de DAC é maior em pacientes diabéticos com qualquer concentração plasmática de colesterol e sua associação com a hipertrigliceridemia é mais forte do que na população em geral (STAMLER *et al.*, 1993).

Neste estudo 40% do grupo DM1 e 66,4% do grupo DM2, apresentaram dislipidemia (Tabela 6). A frequência da dislipidemia encontrado no grupo DM2 foi similar a encontrada em outros estudos (70,2% e 64,1%) (ALVARENGA *et al.*, 2007, YADAV *et al.*, 2014). As prevalências de dislipidemias são geograficamente variáveis, dependendo dos hábitos dietéticos, culturais ou adquiridos e do estilo de vida das diferentes populações (HEISS *et al.*, 1980, MUSCAT *et al.*, 1994, POSADAS-ROMERO *et al.*, 1995, HODGE *et al.*, 1996).

Um estudo brasileiro mostrou que os principais fatores de riscos associados à dislipidemia foram sobrepeso (34,02%), sedentarismo (26,6%), hipertensão (20,20%) e DM (7,4%) em uma população ambulatorial (OLIVEIRA *et al.*, 2017). Estudos reportam a alta prevalência de dislipidemia em pacientes hiperglicêmicos (UTTRA *et al.*, 2011, KANDULA, 2013, SARFRAZ *et al.*, 2016).

A alteração no perfil lipídico, associada ao sobrepeso e/ou obesidade, eleva muito o risco de ocorrência de complicações macro vasculares, tendo sido demonstrado que o risco cardiovascular no DM1 está aumentado 4 e 8 vezes em homens e mulheres, respectivamente (LAING *et al.*, 2003b, NATHAN *et al.*, 2003, SOEDAMAH-MUTHU *et al.*, 2004). A aterosclerose e os eventos cardiovasculares,

os quais estão associados à presença de dislipidemia, se destacam nos pacientes com DM1, sendo responsáveis por até 44% da mortalidade total (MORRISH *et al.*, 2001). Um estudo de coorte realizado no Reino Unido com 23.000 pacientes tratados com insulina demonstrou que pacientes com DM1, independentemente da faixa etária, apresentaram maior mortalidade por DAC e doença cerebrovascular, quando comparados à população não diabética (LAING *et al.*, 2003a, LAING *et al.*, 2003b).

5.2.7 Tempo de diabetes e História familiar de diabetes

O tempo a partir do diagnóstico de diabetes não foi diferente entre os grupos DM1 e DM2 ($P=0,287$), bem como a história familiar para o diabetes ($P=0,887$), como observado na Tabela 6. As características do início do DM2, frequentemente acima dos 40 anos, e persistir ao longo da vida do paciente e uma vez que a idade média dos pacientes em estudo para este grupo foi de 51,2 anos, era de se esperar que este grupo apresentasse maior tempo após o diagnóstico. Este dado poderia sugerir que os pacientes no estudo tiveram um diagnóstico tardio, o que teria suporte na literatura, que reporta que cerca de 50% dos diabéticos desconhecem o diagnóstico (MALERBI,FRANCO, 1992, GROSS, 2002).

Relevante ressaltar que o grupo DM1 em estudo, apresentou diagnóstico da patologia em idade superior a 18 anos (DM1 de início na vida adulta). Portanto, os pacientes com DM1 incluídos neste estudo apresentam, possivelmente, características diferentes do DM1 com diagnóstico na infância (*childhood type 1 diabetes*). A idade do diagnóstico confere ao DM características distintas como já descrito na literatura (SABBAH *et al.*, 2000, JERRAM,LESLIE, 2017). O incremento da idade no diagnóstico do DM1 está associado a redução do risco genético, bem como à severidade das complicações associadas à patologia (SABBAH *et al.*, 2000).

Os fatores genéticos, autoimunes e manifestações clínicas são distintos entre o DM1 de início na infância e aquele de início na fase adulta. O DM1 de início em idade inferior aos 20 anos é fortemente associado à susceptibilidade genética relacionada ao sistema HLA (SABBAH *et al.*, 2000).

Neste estudo os grupos DM1 e DM2 apresentaram uma frequência elevada para história familiar de diabetes ($> 67\%$), indicando que esta informação é relevante e utilizada como fator de risco para triar pacientes com potencial risco para o

desenvolvimento da patologia. Goldenberg, Schenkman e Franco (2003) relatam a importância da história familiar para detecção de pacientes recém-diagnosticados em seu estudo, mostrando uma prevalência de 18%. Além disso, Souza e colaboradores (2003) reportam que a prevalência de DM foi maior em pessoas com história familiar da doença (10,3%). O risco pode aumentar em pacientes com histórico bi parental onde os diagnósticos foram feitos em idades mais jovens (SCOTT *et al.*, 2013).

Diferentes estudos também observaram uma alta frequência de história familiar para diabetes associada à pessoas com DM (74,6%; 76,6%; 86% e 68,8%) (ARAÚJO *et al.*, 1999, CRISPIM *et al.*, 2006, BARONE *et al.*, 2008, SOUSA *et al.*, 2011, GEETHA *et al.*, 2017), sendo 3,5 vezes maiores quando comparada a outros estudos (BOER *et al.*, 1996, GOLDENBERG *et al.*, 2003, COBAS *et al.*, 2011) e similar aos dados observados neste trabalho.

Desta forma, a história familiar de DM2 também é fator proeminente no risco para desenvolvimento do diabetes (MITCHELL *et al.*, 1993), independente da obesidade (BJORNHOLT *et al.*, 2000).

Os resultados de Zamora-Ginez e colaboradores (2012) reiteram a associação do histórico familiar de DM2 com diminuição da sensibilidade à insulina e o balanço inadequado entre sensibilidade à insulina e sua secreção (BJORNHOLT *et al.*, 2000). Além disso, o histórico familiar de DM2 foi associado com aumento de resposta à insulina e hiperinsulinemia em hispânicos mexicanos saudáveis (BJORNHOLT *et al.*, 2000, GUERRERO-ROMERO, RODRIGUEZ-MORAN, 2001b, c, a). A resistência à insulina tem se revelado um preditor pobre do desenvolvimento do DM em pacientes com ausência de histórico familiar de DM2 (GOLDFINE *et al.*, 2003). Em síntese, o histórico familiar como fator de risco associado ao DM2 e com o desenvolvimento das alterações na ação da insulina, independente da obesidade é importante, o que foi ratificado pelo trabalho em tela.

5.2.8 História familiar de Obesidade, DAC e DT

Foi mostrado que história familiar de obesidade combinada ou não à história familiar de diabetes está associada à presença de sobrepeso ou obesidade (MAKRILAKIS *et al.*, 2008). Também, a história familiar de DAC associada à história familiar de diabetes prediz a incidência de DM2 (YEUNG *et al.*, 2007).

História familiar de doença tireoidiana é considerada fator de risco para disfunção tireoidiana (SURKS *et al.*, 2004). A presença de história familiar de doença tireoidiana encontrada neste estudo para os grupos DM1 (23,7%) e DM2 (23%) foi expressivamente superior (5 vezes maior) a descrita em um estudo brasileiro (4,3%) (PIMENTA *et al.*, 2005). O efeito do critério de seleção e as características das populações em estudo, como a etnia, podem explicar as diferenças entre os estudos.

5.2.9 Terapia medicamentosa

Como o diabetes se caracteriza como uma doença crônica, a maioria dos pacientes não consegue obter um controle glicêmico apenas com exercícios físicos e dietas bem controladas, verificando que existe a necessidade e adição de terapia medicamentosa (HAAK, 2015).

Para o grupo DM1 o uso de insulina foi de 100% da população em estudo, como esperado. A insulinização é essencial no DM1, e as respostas a insulino terapia podem variar de paciente para paciente adicionando a ela uma dieta adequada, a prática de exercícios físicos e a capacidade residual da produção deste hormônio (WANGNOO, 2015).

Podemos observar também que 78,9% dos pacientes do grupo DM2 fazem uso de hipoglicemiantes orais, sendo esta a primeira escolha de medicamentos para estes pacientes, em concordância com outros estudos (SOUSA *et al.*, 2011, SKRHA *et al.*, 2014). Mas com o tempo e a deterioração das células beta também pode haver necessidade do uso de insulina como complementação as drogas orais (SBD, 2017). Contudo, neste estudo foi detectada uma elevada porcentagem de pacientes utilizando insulina (58,6%) comparada com outros estudos (23,5%, 31,4% e 47%) (SOUSA *et al.*, 2011, IWATA *et al.*, 2012, MANTOVANI *et al.*, 2016), mas similar a descrita no estudo de Skrha e colaboradores (2014) (55%) e Keshavarz e colaboradores (2014) (68,2%), com tempo de diabetes mediano similar (11 anos) ou inferior (7 anos), respectivamente.

Em relação ao tratamento farmacológico das dislipidemias existem evidências fortes e convincentes de que a terapia de diminuição do colesterol reduz significativamente DAC em pacientes com ambos os tipos de DM (COLHOUN *et al.*, 2004, BAIGENT *et al.*, 2005, CHOLESTEROL TREATMENT TRIALISTS *et al.*, 2008).

Parece não existir valor de corte o qual a redução do LDL-C possa ser benéfica (BAIGENT *et al.*, 2005, CHOLESTEROL TREATMENT TRIALISTS *et al.*, 2008).

O tratamento da HAS, independentemente do agente utilizado, apresenta efeito benéfico sobre a progressão da doença renal diabética (MOGENSEN, 2003).

5.2.10 Complicações do diabetes

Estudos mostram que 13% dos pacientes com DM1 desenvolverão retinopatia em 5 anos e 90% entre 10 a 15 anos (KLEIN *et al.*, 1984). E os pacientes com DM2, 40% que utilizam insulina e 24 % dos que utilizam hipoglicemiantes orais desenvolverão retinopatia em 5 anos. Após 15 a 19 anos as porcentagens aumentam para 84% e 53%, respectivamente (KLEIN *et al.*, 1984).

A prevalência da nefropatia no diabetes não foi determinada neste estudo. Proteinúria ocorre em 15-40% dos pacientes com DM1 e 5-20% nos DM2 (GROSS *et al.*, 2005). A prevalência da nefropatia diabética é maiores em Afro-Americanos, Asiáticos e Nativos Americanos do que em Caucasoides (GROSS *et al.*, 2005, CHAWLA *et al.*, 2016). Em estudos realizados no Sul do Brasil, verificou-se que 37% dos pacientes com DM2 e 34% dos pacientes com DM1 apresentam aumento da excreção urinária de albumina (SCHEFFEL *et al.*, 2004, RODRIGUES *et al.*, 2010).

A prevalência da neuropatia em pacientes com diabetes é de 7% ao ano, aumentando para 50% em 25 anos para o DM1 e DM2 (VINIK *et al.*, 1995).

As complicações diabéticas no grupo DM1 foram inferiores as descritas no DM2 (Tabela 6). De acordo com a literatura a prevalência das complicações microvasculares no DM1 varia muito (STEFFES *et al.*, 2003, FULLERTON *et al.*, 2014, KUHTREIBER *et al.*, 2015). A frequência das complicações encontrada neste estudo foi inferior a descrita na literatura (SKRHA *et al.*, 2014), mas em concordância com nosso estudo a complicação mais frequente foi a retinopatia, seguida pela nefropatia e neuropatia. Foi mostrado que com controle intensivo da glicemia a incidência das complicações microvasculares foi 6,2%, 16,3% e 4,9% para retinopatia, nefropatia e neuropatia, respectivamente (FULLERTON *et al.*, 2014) e que resultados similares foram encontrados em um estudo brasileiro em que foi utilizado tratamento convencional (PENAFORTE-SABOIA *et al.*, 2017). Nestes estudos, diferentemente do nosso, a complicação mais frequente foi a nefropatia (Tabela 6).

No grupo DM2 a frequência das complicações foram, em geral, menores quando comparado a outros estudos brasileiros (BARRA *et al.*, 2012, DAL SANTO FRANCISCO BONAMICHI *et al.*, 2016). Um estudo brasileiro (DAL SANTO FRANCISCO BONAMICHI *et al.*, 2016) realizado para determinar a frequência das complicações diabéticas em pacientes com DM2 reportou valores superiores à descrita em outros estudos (56,9% de retinopatia, 47,2% de nefropatia e 36,1% de neuropatia) (WHO, 2003, NAUCK *et al.*, 2009, AMERICAN DIABETES, 2012) e menciona que estas diferenças dependem do fenótipo da população estudada e das condições de diagnóstico. O risco de desenvolvimento da retinopatia em pacientes com DM2 está relacionado à severidade da hiperglicemia e presença de hipertensão (GROUP, 1998a, b).

A nefropatia diabética é a primeira causa de doença renal crônica em pacientes que iniciam a terapia de substituição renal e está associada ao aumento da mortalidade cardiovascular (GROSS *et al.*, 2005). No DM2 a taxa de conversão é de aproximadamente 2% entre normoalbuminúria e microalbuminúria e microalbuminúria e proteinúria estabelecida (ADLER *et al.*, 2003).

Entre 10 a 20% dos pacientes recém-diagnosticados com DM2 apresentam sinais clínicos de neuropatia diabética e a porcentagem aumenta para 50% após 15 anos de doença (HEWAPATHIRANA,PAGE, 2012).

Os parâmetros laboratoriais para os grupos estudados são mostrados na Tabela 7.

Tabela 7 – Parâmetros bioquímicos para os grupos Controles, DM1 e DM2.

Analitos	Controles n=354	DM1 n=143	DM2 n=293	C vs DM1	C vs DM2	DM1 vs DM2
Glicemia (mg/dL)	91 (82-104)	179 (104-245)	133 (105-184)	<0,001	<0,001	<0,001
HbA1c (%)	5,4 (5,1-5,6)	8,7 (7,6-9,7)	7,7 (6,4-9,3)	<0,001	<0,001	<0,001
1,5-AG (µg/mL)	23,4 (19-29)	4,1 (2,4-5,7)	11,7 (5,8-20,8)	<0,001	<0,001	<0,001
Colesterol total (mg/dL)	189 (164-217)	171 (151-199)	182 (155-214)	<0,001	0,013	0,064
HDL-C (mg/dL)	55 (46-63)	51 (42-63)	42 (35-51)	0,033	<0,001	<0,001
LDL-C (mg/dL)	102 (84-125)	99 (80-120)	106 (84-129)	0,145	0,619	0,082
Triglicérides (mg/dL)	131 (89-180)	89 (67-151)	145 (96-197)	<0,001	0,047	<0,001
Não-HDL- (mg/dL)	133 (110-159)	122 (100-141)	136 (113-164)	<0,001	0,266	<0,001
Creatinina (mg/dL)	0,64 (0,5-0,76)	0,85 (0,80-1,0)	0,80 (0,70-1,0)	<0,001	<0,001	0,025
Ureia (mg/dL)	26 (21-32)	32 (25-40)	31 (26-39)	<0,001	<0,001	0,432
Ácido úrico (mg/dL)	4,2 (3,3-5,1)	3,7 (2,8-4,9)	4,8 (3,8-5,8)	0,002	<0,001	<0,001
Proteínas Totais (g/dL)	6,9 (6,6-7,2)	8,2 (7,4-8,8)	8,3 (7,6-8,9)	<0,001	<0,001	0,092
Albumina (g/dL)	3,9 (3,8-4,0)	4,1 (3,8-4,3)	4,2 (4,0-4,4)	<0,001	<0,001	0,003
AST (U/L)	21 (18-25)	16 (12-21)	16 (12-21)	<0,001	<0,001	0,823
ALT (U/L)	15 (12-19)	18 (9-23)	17 (11-22)	0,131	0,353	0,472
γGT (U/L)	26 (19-38)	23 (15-39)	28 (18-44)	0,042	0,144	0,009

Os valores são mediana e (intervalo interquartil).

DM1, diabetes tipo 1 de início tardio; DM2, diabetes tipo 2 e Controles, normoglicêmicos saudáveis. Probabilidade, teste U de Mann-Whitney

AST, aspartato aminotransferase; ALT, alanina amonitranferase; γGT, gama-glutamilttransferase.

Fonte: O autor (2018).

5.2.11 Biomarcadores de controle glicêmico (glicemia jejum, 1,5–AG e HbA1c)

As comparações entre os grupos no presente estudo foram feitas entre o grupo controle e ambos os grupos DM1 e DM2. Como o grupo controle é formado por doadores de sangue saudáveis, as dosagens destes indivíduos foram obtidas com ausência de jejum. As amostras do grupo DM1 e DM2 foram coletadas após aproximadamente 12 horas de jejum. Independente da ausência de jejum para o

grupo controle, não foram observadas concentrações de glicose superiores a 104 mg/dL (Tabela 7). Como esperado, as concentrações dos biomarcadores glicêmicos entre os grupos de diabéticos foram significativamente diferentes do grupo controle saudáveis. As concentrações (critérios para controle glicêmico inadequado) da glicemia em jejum (> 180 mg/dL), da HbA1c ($>7,5\%$) e do 1,5AG (<10 $\mu\text{g/mL}$), indicam que os grupos DM1 e DM2 em estudo contempla diabéticos com mau controle glicêmico (VAN LEEUWEN, BLADH, 2015, SBD, 2017, ADA, 2018).

As concentrações significativamente mais elevadas da glicemia em jejum (179 mg/dL vs. 133 mg/dL, $p<0,001$) e da HbA1c (8,7% vs. 7,7%, $p<0,001$) e menores de 1,5AG (4,1 $\mu\text{g/dL}$ vs 11,7 $\mu\text{g/dL}$) no grupo DM1 em relação a DM2 (Tabela 7) pode estar associada a maior dificuldade no controle glicêmico com uso de insulina, presente em todos os pacientes com DM1 (ROSENSTOCK, 2001, HAMATY, 2011).

A mediana da concentração do 1,5-AG foi significativamente diferente entre os três grupos em análise (Tabela 7). Diabéticos com DM1 e DM2 apresentaram a mediana da concentração de 1,5-AG cerca de 5,7 e 2 vezes menores, respectivamente, a do grupo controle saudável (Tabela 7). A menor concentração de 1,5-AG observada no DM1 quando comparada a DM2 ($p<0,05$) sugere que grupo DM1 está sujeito a maior frequência de eventos de hiperglicêmicos (incursões ou marés hiperglicêmicas). Contudo, esta diferença nas concentrações de 1,5-AG entre os dois grupos independem da HbA1c. A utilização de 1,5-AG pode ser muito interessante como marcador de picos de hiperglicemia funcionando como um biomarcador para pacientes com DM1 (GREVEN *et al.*, 2010). Em concordância com os nossos resultados, outros estudos mostraram que as concentrações de 1,5-AG são consistente e marcadamente diminuídos em pacientes com DM1 (valores médios entre 0,98-1,97 $\mu\text{g/mL}$) (PITKANEN, 1982, YAMANOUCHI *et al.*, 1987, YAMANOUCHI *et al.*, 1992a, JURASCHEK *et al.*, 2012) ou quando comparados com pacientes DM2 (valores médios entre 4,27-7,88 $\mu\text{g/mL}$) (UMEDA *et al.*, 1991, YAMANOUCHI *et al.*, 1991, YAMANOUCHI *et al.*, 1992b).

5.2.12 Perfil lipídico

A dislipidemia no DM1 pode ocorrer pela hipertrigliceridemia, mas o HDL-C frequentemente está normal ou mesmo elevado, a não ser que haja um controle glicêmico pobre ou a nefropatia esteja presente (DEAN, DURRINGTON, 1996). O

tratamento insulínico intensivo associado às mudanças no padrão alimentar e ao estilo de vida sedentário nos pacientes com DM1 contribui para o ganho de peso, favorecendo o desenvolvimento de um perfil lipídico mais aterogênico (elevação de triglicérides, LDL-C, ApoB e diminuição do HDL-C) (A. S. M. MATHEUS *et al.*, 2008). Apesar das concentrações plasmáticas do LDL-C algumas vezes não se elevarem nestes pacientes, do ponto de vista qualitativo, há significativa diferença no perfil de aterogenicidade, o que pode ser atribuído ao fato dos pacientes diabéticos possuírem maior proporção de partículas pequenas e densas de LDL (REMIG *et al.*, 2010). Os pacientes com DM1, além do uso de insulina e da obesidade, podem apresentar outras condições clínicas desencadeadoras de alterações em seu perfil lipídico, tais como o mau controle glicêmico, o hipotireoidismo, a nefropatia diabética, a presença do tabagismo e o sedentarismo, dentre outras (LAING *et al.*, 2003a, LAING *et al.*, 2003b, KERSHNAR *et al.*, 2006, A. S. MATHEUS *et al.*, 2008, FALUDI *et al.*, 2017b). Em concordância com o reportado na literatura, o grupo DM1 apresenta o perfil lipídico dentro do intervalo preconizado pelas Diretrizes Brasileiras de Dislipidemia (Colesterol total <190mg/dL; HDL-C >40 mg/dL; Triglicérides <150 mg/dL; LDL-C <130 mg/dL e não HDL-C <130 mg/dL) (FALUDI *et al.*, 2017a) (Tabela 7). As concentrações plasmáticas de triglicérides e não HDL inferiores ao apresentado pelo grupo controle ($P < 0,001$) pode estar relacionado ao fato do uso de hipoglicemiantes orais (Tabela 5) e do grupo controle não estar em jejum.

A dislipidemia no DM2 é caracterizada pela elevação dos triglicérides e diminuição de HDL-C, alterações detectadas muitos anos antes do início da hiperglicemia clinicamente relevante (HAFFNER *et al.*, 1990, DEAN, DURINGTON, 1996). Evidências recentes sugerem que as concentrações baixas de HDL-C constituem um fator de risco independente para a doença cardiovascular, mas também para o desenvolvimento do próprio DM (ABBASI *et al.*, 2013). Estas alterações e a presença de partículas pequenas de LDL-C, provavelmente contribuem para aterosclerose acelerada mesmo antes de o diabetes ser formalmente diagnosticado (STEINBERG *et al.*, 1989, HAFFNER *et al.*, 1990). O grupo DM2 apresentou concentração mediana de HDL-C inferior ao dos grupos controle e DM1 ($P < 0,001$). A concentração mediana de triglicérides foi similar ao do grupo controle ($P = 0,047$) e superior ao do grupo DM1 ($P < 0,001$), perfil também reportado em outro estudo (SKRHA *et al.*, 2014). Este perfil também pode estar

relacionado ao fato do uso de hipolipemiantes orais (Tabela 5) e do grupo controle não estar em jejum.

5.2.13 Creatinina e ureia

Creatinina e Ureia e são marcadores de filtração glomerular, conseqüentemente da função renal (FERGUSON, WAIKAR, 2012). O grupo DM1 apresentou concentrações de creatina superior ao grupo DM2 ($P=0,025$), e ambos os grupos diabéticos apresentaram concentrações superiores quando comparados ao grupo controle ($P<0,001$). Os grupos diabéticos apresentaram concentrações semelhantes de ureia ($P=0,432$) entre si, mas foram superiores às concentrações do grupo controle ($P<0,001$) (Tabela 7). A perda progressiva da função renal é algo comum entre pacientes com DM (MACISAAC *et al.*, 2014). Mas vale ressaltar que a mediana das concentrações da creatinina e ureia apresentadas pelos grupos DM não superam os valores de referência para estes analitos, creatinina (0,6-1,2 mg/dL) e ureia (15-44 mg/dL), o que indica que os grupos com DM não se apresentam como um grupo com risco de nefropatia manifesta.

5.2.14 Ácido úrico

A concentração sérica de ácido úrico no grupo DM2 (4,8 mg/dL) foi significativamente ($P<0,001$) superior ao grupo controle (4,2 mg/dL) e DM1 (3,7 mg/dL), mas o grupo DM1 apresentou concentrações inferiores ao grupo controle ($P=0,002$) (Tabela 7).

Tem sido descrito que pacientes com DM1 e DM2 podem apresentar hipouricemia (DE COEK, 1965, HERMAN, KEYNAN, 1969, ESPARZA MARTIN, GARCIA NIETO, 2011). Isto implica que a fisiopatologia deve estar conectada com algum mecanismo em comum em ambas as condições. Esta redução da concentração plasmática de urato é devida a um aumento no *clearance* (depuração) renal deste analito associado à glicosúria por mecanismo que permanece desconhecido (GOTFREDSEN *et al.*, 1982, MAYER, FREEDMAN, 1983, HALMOS *et al.*, 1984, SHICHIRI *et al.*, 1987, ERDBERG *et al.*, 1992, GOLIK *et al.*, 1993). Esta hipouricemia foi observada em pacientes com taxa de filtração glomerular normal. Contudo, foi sugerido que a hipouricemia é um marcador preditivo de nefropatia diabética (SHICHIRI *et al.*, 1990, MORIWAKI *et al.*, 1994) e

anormalidades renais, afetando o transporte de ácido úrico em pacientes diabéticos (HISATOME *et al.*, 1992).

Moriwaki e colaboradores (1994) mostraram que o aumento no *clearance* do ácido úrico ocorria na infusão com glicose, mas não com manitol, sugerindo que o efeito não é relacionado à diurese osmótica, mas sim pela glicosúria e/ou hiperglicemia.

A hiperuricemia também reflete resistência à insulina em alguns estudos (YOO *et al.*, 2011, KRISHNAN *et al.*, 2012), o qual constitui a base patofisiológica do DM2. A associação causal entre hiperuricemia e DM2 pode ser mediada pela disfunção renal bem como resistência à insulina. Contudo, nem todos os estudos chegam as mesmas conclusões (LI *et al.*, 2013). Um grande estudo prospectivo (TANIGUCHI *et al.*, 2001) não mostrou associação entre as concentrações plasmáticas de ácido úrico e o DM2, e associação inversa as concentrações plasmáticas de ácido úrico e o DM2 foram observadas (HERMAN *et al.*, 1976, TUOMILEHTO *et al.*, 1988).

5.2.15 Proteínas (proteínas totais e albumina)

As concentrações plasmáticas de proteínas totais e albumina foram significativamente maiores nos grupos diabéticos que no controle (Tabela 7), e encontram-se dentro do intervalo de referência (Proteínas totais: 5,7-8,2 g/dL e Albumina: 3,2-4,8 g/dL). Valores de concentração abaixo dos valores de referência podem indicar perda de função ou comprometimento renal (ROSHAN, STANTON, 2013).

5.2.16 Enzimas (AST, ALT e γ GT)

As enzimas aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT), são marcadores de dano hepatocelular. A gama-glutamilttransferase (γ GT) é indicador de lesão do trato biliar e, tem a síntese aumentada do uso crônico de álcool.

Avaliação anual da função hepática é recomendada pelas diretrizes de prática clínica do diabetes (ADA, 2018) porque o DM dobra o risco da doença do fígado gordo (ou esteatose hepática) não alcóolico e carcinoma hepatocelular (EL-SERAG *et al.*, 2004, SUH, KIM, 2011). O DM2 e a esteatose hepática não alcóolica

compartilham a resistência à insulina/hiperinsulinemia como fisiopatologia subjacente, e esteatose hepática não alcóolica é uma comorbidade bem documentada do DM2 (WILLIAMSON *et al.*, 1991, TARGHER *et al.*, 2007, LEITE *et al.*, 2009). Em contraste, o significado clínico da quantificação das enzimas hepáticas no DM1 como parte da triagem anual não é clara, porque o DM1 não é usualmente acompanhado de características da síndrome metabólica. Contudo, a prevalência de síndrome metabólica está aumentando na população em geral e em pacientes com DM1 (MERGER *et al.*, 2016), inclusive no Brasil (BARROS *et al.*, 2017). E foi detectado que elevada atividade das enzimas hepáticas em pacientes DM1 foram associadas a um perfil de risco cardiovascular menos favorável e com pior controle glicêmico (STADLER *et al.*, 2017).

Embora tenha sido encontrada diferença significativa entre a atividade das enzimas hepáticas (AST e γ GT) entre o grupo controle e dos pacientes com DM, as atividades foram maiores no grupo controle (Tabela 7).

5.3 ANÁLISES MOLECULARES

5.3.1 Polimorfismos no gene RAGE

As Figuras 16, 17 e 18 mostram os perfis eletroforéticos típicos obtidos da PCR-RFLP para o polimorfismo -374T/A (rs1800624), Del 63 pb (-407 a -345 pb) e 429T>C (rs1800625) localizados na região promotora do gene *RAGE*. No painel A das figuras estão a representação esquemática do perfil de restrição dos fragmentos de 404 pb gerado por reação de PCR após a digestão com enzimas de restrição. Dependendo do alelo presente são gerados diferentes fragmentos que permitem a genotipagem dos polimorfismos em estudo.

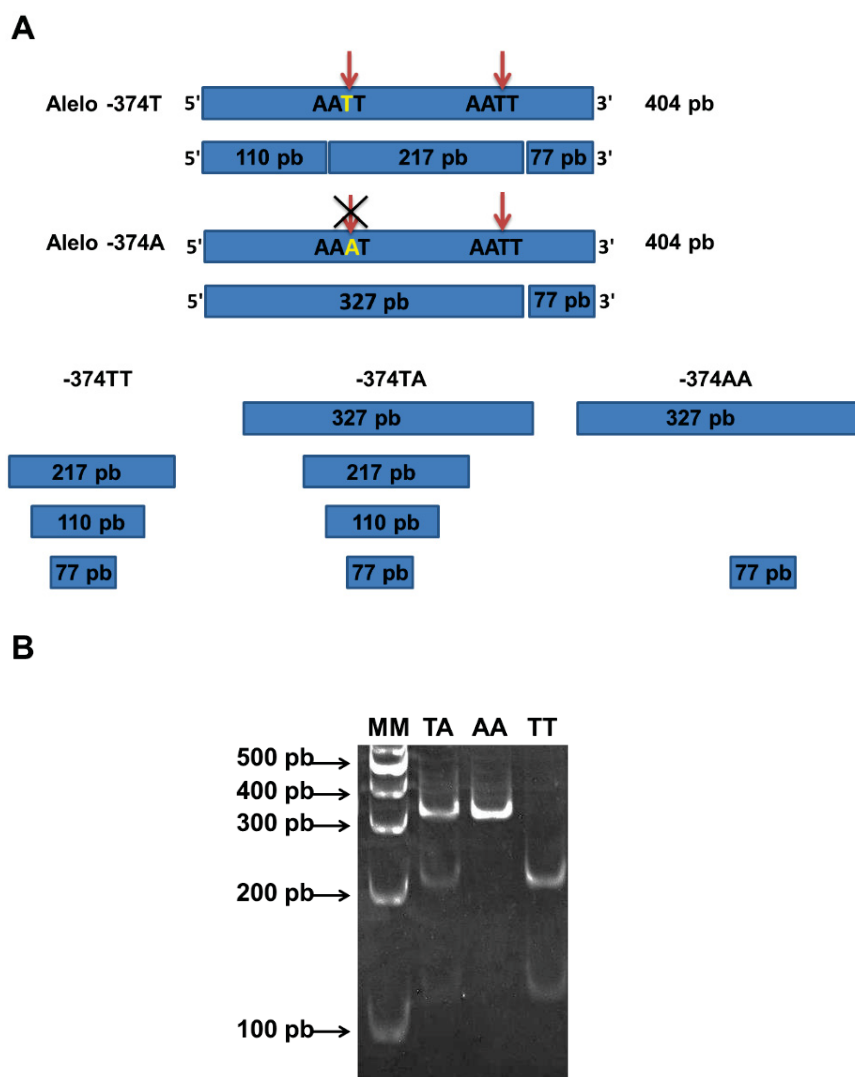


Figura 16 - **Genotipagem por RFLP do polimorfismo -374T/A.** **Painel A. Mapa de restrição do produto de PCR.** As setas indicam os sítios de restrição para a enzima *Tsp509* I. Os nucleotídeos em amarelo encontram-se na posição -374. Em destaque a ausência do sítio de restrição (x) no alelo -374A. Quando o alelo T está presente no fragmento de 404 pb a digestão com a enzima de restrição *Tsp509* I gera os fragmentos 217 pb, 110 pb e 77 pb, quando o alelo A está presente a digestão com a enzima de restrição *Tsp509* I gera os fragmentos 327 pb e 77 pb. Assim, o indivíduo homocigoto TT apresenta o perfil de restrição com 3 fragmentos (217 pb, 110 pb e 77 pb); o heterocigoto TA com 4 fragmentos (327 pb, 217 pb, 110 pb e 77 pb) e o homocigoto AA com dois fragmentos (327 pb e 77 pb). **Painel B. Perfil eletroforético dos genótipos do polimorfismo -374T>A da região promotora do gene RAGE.** Os fragmentos de restrição foram separados em gel de poliácridamida (29:1) a 10% em tampão TBE 1X, corados com brometo de etídeo e visualizados sob luz ultra-violeta (302 nm) com imagem capturada em sistema L.PIX (Loccus). Linha MM: marcador de massa molecular de 100 pb. As linhas TA, AA e TT mostram respectivamente, os perfis de restrição para os genótipos -374TA, -374AA e -374TT. À esquerda do gel estão indicados com flechas a massa molecular dos fragmentos de 100 pb, 200 pb, 300 pb, 400 pb e 500 pb do marcador de massa e à direita os fragmentos que podem ser gerados dependendo do genótipo após restrição do produto de PCR com a enzima *Tsp509* I.

Fonte: O autor (2018).

As frequências genotípicas e alélicas do polimorfismo -374T>A estão de acordo com o esperado pelo equilíbrio de Hardy-Weinberg em todos os grupos. As frequências genotípicas foram similares entre os grupos controle e DM1 ($P=0,068$),

controle e DM2 (P=0,195) e DM1 e DM2 (P=0,591). As frequências alélicas foram similares entre os grupos controle e DM2 (P=0,093) e DM1 e DM2 (P=0,352), mas foi diferente (P=0,023) entre o grupo controle e DM1 (Tabela 8).

Vários estudos não identificaram associação do -374T/A (rs1800624) com o DM1 (PICHETH *et al.*, 2007a, ABDEL-AZEEZ, EL-OKELY, 2009, GOMES *et al.*, 2015) ou DM2 (HUDSON *et al.*, 2001b, JIXIONG *et al.*, 2003, KANKOVA *et al.*, 2005, NG *et al.*, 2012) em diferentes populações. Com relação à associação com as complicações diabéticas, alguns estudos não acharam correlação (HUDSON *et al.*, 2001a, POIRIER *et al.*, 2001, GLOBOCNIK PETROVIC *et al.*, 2003, JIXIONG *et al.*, 2003, NG *et al.*, 2012, ZHANG *et al.*, 2017), e os que acharam correlação foram controversos no que diz respeito ao alelo A conferir risco (LINDHOLM *et al.*, 2006, LINDHOLM *et al.*, 2008, FRANKO *et al.*, 2016) ou proteção (PETTERSSON-FERNHOLM *et al.*, 2003, SANTOS *et al.*, 2005, PICHETH *et al.*, 2007a, TRIPATHI *et al.*, 2014).

Tabela 8 - Frequências genotípicas e alélicas do polimorfismo -374T>A (rs1800624) da região promotora do gene *RAGE* para os grupos Controle, DM1 e DM2.

Gene/SNP	Modelo	Genótipos	Saudáveis			Diabéticos			Valores de P		
			Controle n=354	DM1 n=143	DM2 n=293	C vs DM1	C vs DM2	DM1 vs DM2			
RAGE rs1800624 -374T>A	Codominante	TT	158 (44,6)	80 (55,9)	153 (52,2)	0,068	0,195	0,591			
		TA	156 (44,1)	54 (37,8)	114 (38,9)						
			AA	30 (8,5)	7 (4,9)	21 (7,2)					
			T/D	7 (2,0)	2 (1,4)	3 (1,0)					
			A/D	3 (0,8)	0 (0)	2 (0,7)					
			Frequência Alelo A (%)	31,4	24,1	27,1	0,023	0,093	0,352		
			IC 95%	[28-35]	[19-29]	[23-31]					
		Dominante	TT/TA+AA	158/186	80/61	153/135	0,030	0,071	0,480		
		Recessivo	AA/TT+TA	30/314	7/134	21/267	0,157	0,511	0,359		

Genótipos descritos em n (%). P: probabilidade, Teste do Chi-quadrado ou Teste Exato de Fisher bidirecional. IC 95%: Intervalo de confiança de 95%. Todos os grupos estão em equilíbrio de *Hardy-Weinberg* (P>0,05), para grupo controle (P=0,328), DM1 (P=0,581) e DM2 (P=0,970).

Odds ratio para alelo-A -374T>A: 0,69 (95%IC, 0,51-0,95).

Fonte: O autor (2018).

Contudo, a presença do alelo A conferiu proteção marginal ($P=0,023$) para o DM1 (OR, 0,69; 95%IC, 0,51-0,95), em discordância com outros estudos realizados na população Brasileira (PICHETH *et al.*, 2007a, GOMES *et al.*, 2015). As frequências do alelo A observada neste estudo foi inferior ao reportado para pacientes com DM1 em outras populações Brasileiras (PICHETH *et al.*, 2007a, GOMES *et al.*, 2015). Foi demonstrado que a frequência do alelo -374A é significativamente maior ($P=0,04$) nos Euro-Brasileiros quando comparados aos Afro-brasileiros (TORRES *et al.*, 2012). Santos e colaboradores (2005) que estudaram pacientes com DM2 também mostraram a diferença entre Euro- (31%) e Afro-Brasileiros (24%) para o alelo A. Na população Americana a frequência do alelo A também foi inferior para indivíduos saudáveis e com DM2 nos Afro-Americanos quando comparada aos Euro-Americanos (GOULART *et al.*, 2008) (Tabela 8). Uma hipótese para justificar a menor frequência do alelo A observada neste estudo, está na diferença da composição étnica da amostra em estudo. Outro elemento relevante reflete que nossa amostra de DM1 são indivíduos que desenvolveram o diabetes após os 18 anos (diabetes tipo 1 de início tardio). Este grupo em particular tem poucos estudos, sendo que o DM1 em geral descreve este tipo de DM com início na infância.

As frequências alélicas entre controles (KANKOVA *et al.*, 2005, PICHETH *et al.*, 2007a, COHEN *et al.*, 2012, TORRES *et al.*, 2012, GOMES *et al.*, 2015) e DM2 (SANTOS *et al.*, 2005, LINDHOLM *et al.*, 2006, GOULART *et al.*, 2008, LINDHOLM *et al.*, 2008) foram similares aos previamente reportados em outras populações Caucasoídes, mas superior às das populações Asiáticas (RAMPRASAD *et al.*, 2007, LU *et al.*, 2008) e Afro-Brasileiras (SANTOS *et al.*, 2005, COHEN *et al.*, 2012). As frequências do alelo A no grupo DM1 foi inferior a descrita para a população Euro-Brasileira (SANTOS *et al.*, 2005, PICHETH *et al.*, 2007a) e caucasoíde (POIRIER *et al.*, 2001, LINDHOLM *et al.*, 2008) (Tabela 9).

Tabela 9 – Comparações entre as frequências genótípicas e alélicas do polimorfismo -374T>A (rs1800624) da região promotora do gene *RAGE* com dados da literatura.

Grupo étnico	Características	N	Genótipos			Alelo (%)
			TT	TA	AA	A
Euro-brasileiros (Presente estudo)	Controles	354	44,6	44,1	8,5	31,4
	DM1	143	55,9	37,8	4,9	24,1
	DM2	298	52,2	38,9	7,2	27,1
Ingleses (GOULART <i>et al.</i> , 2008)	DM2	481	56,7	35,1	8,2	25,7
	Controles	496	55,5	34,9	9,6	27,0
Indianos (HALDAR <i>et al.</i> , 2015)	DM2	145	46	39	15	35
	Controles	100	76	22	2	13
Euro-brasileiros Afro-brasileiros (TORRES <i>et al.</i> , 2012)	Controles	108	47,2	42,6	10,5	31,5
	Controles	91	50,5	35,2	6,6	26,2
Euro-Brasileiros Afro-Brasileiros (SANTOS <i>et al.</i> , 2005)	DM2	520	46,5	40,7	9,3	31
	DM2	183	52,5	31,7	7,1	24
Chineses (ZHANG <i>et al.</i> , 2017)	DM2 com nefropatia	430	52,1	39,1	8,8	28,4
	DM2 sem nefropatia	435	58,4	35,9	5,7	23,7
Indianos (BALASUBBU <i>et al.</i> , 2010)	DM2 com retinopatia	345	96,2	3,8	0	1,9
	DM2 sem retinopatia	359	97,1	2,9	0	1,5
Chineses (Lu <i>et al.</i> , 2008)	Controles	152	73	19,1	7,9	17,4
	DM sem DAC	205	74,2	18	7,8	16,8
	DM + DAC	128	74,5	19,6	7,0	16,8
	DM + DAC + reestenose	86	77,9	19,8	2,3	10,5
Caucasianos (POIRIER <i>et al.</i> , 2001)	DM1 com nefropatia	199	43,6	44,6	11,8	34,2
	DM1 sem nefropatia	193	48,7	42,2	9,1	30,2
Asiáticos (XU <i>et al.</i> , 2005)	DM2	227	75,3	22,5	2,2	13,4
	Controles	126	75,4	23,0	1,6	13,1
Asiáticos (RAMPRASAD <i>et al.</i> , 2007)	DM2 com retinopatia	190	72	17	2	8,8
	DM2 sem retinopatia	189	78	13	1	9,2
	Controles	149	79	13	0	9,3
Caucasianos (KANKOVA <i>et al.</i> , 2005)	DM2 com retinopatia	195	42,0	47,2	10,8	34,4
	DM2 sem retinopatia	176	36,9	51,1	11,9	37,5
	Controle	225	40,0	50,2	9,8	34,9
Euro-Americanos	DM2	481	56,7	35,1	8,2	26
	Controle	496	55,1	34,9	9,6	27
Afro-Americanos (GOULART <i>et al.</i> , 2008)	DM2	156	88,1	9,3	2,6	7,0
	Controle	100	82,0	13,0	5,0	11,0
Caucasianos (LINDHOLM <i>et al.</i> , 2006)	DM1	867	49,0	43,7	7,3	29,0
	DM2	2453	55,1	38,4	6,5	26,0
	Controles	205	62,4	32,7	4,9	21,0
Caucasianos (LINDHOLM <i>et al.</i> , 2008)	DM1	733	47,7	45,7	6,5	29,4
	DM2	2930	55,4	37,8	6,8	25,7
	Controles	205	62	32,7	5,4	21,7
Euro-Brasileiros (GOMES <i>et al.</i> , 2015)	DM1	90	46	31	12	31
	Controles	105	49	35	13	31
Euro-Brasileiros (PICHETH <i>et al.</i> , 2007b)	DM1	102	44,1	47,1	8,8	32
	Controles	225	42,7	49,3	8,0	33
Euro-Brasileiros Afro-Brasileiros (COHEN <i>et al.</i> , 2012)	Controles	121	46,5	38,5	12,7	33
	Controles	74	51,3	28,4	8,1	24

Em negrito, dados obtidos neste estudo: DM1: *Diabetes mellitus* tipo 1; DM2: *Diabetes mellitus* tipo 2; DAC: Doença Arterial Coronariana. As frequências do alelo A em itálico e negrito estão fora do

intervalo de confiança de 95% dos grupos do presente estudo calculados na Tabela 8. Fonte: O autor (2018).

A deleção de 63 pb foi detectada duplamente. Inicialmente através da eletroforese em gel de agarose do produto de PCR, e posteriormente confirmada através da PCR-RFLP para o polimorfismo -374T>A (Figura 17).

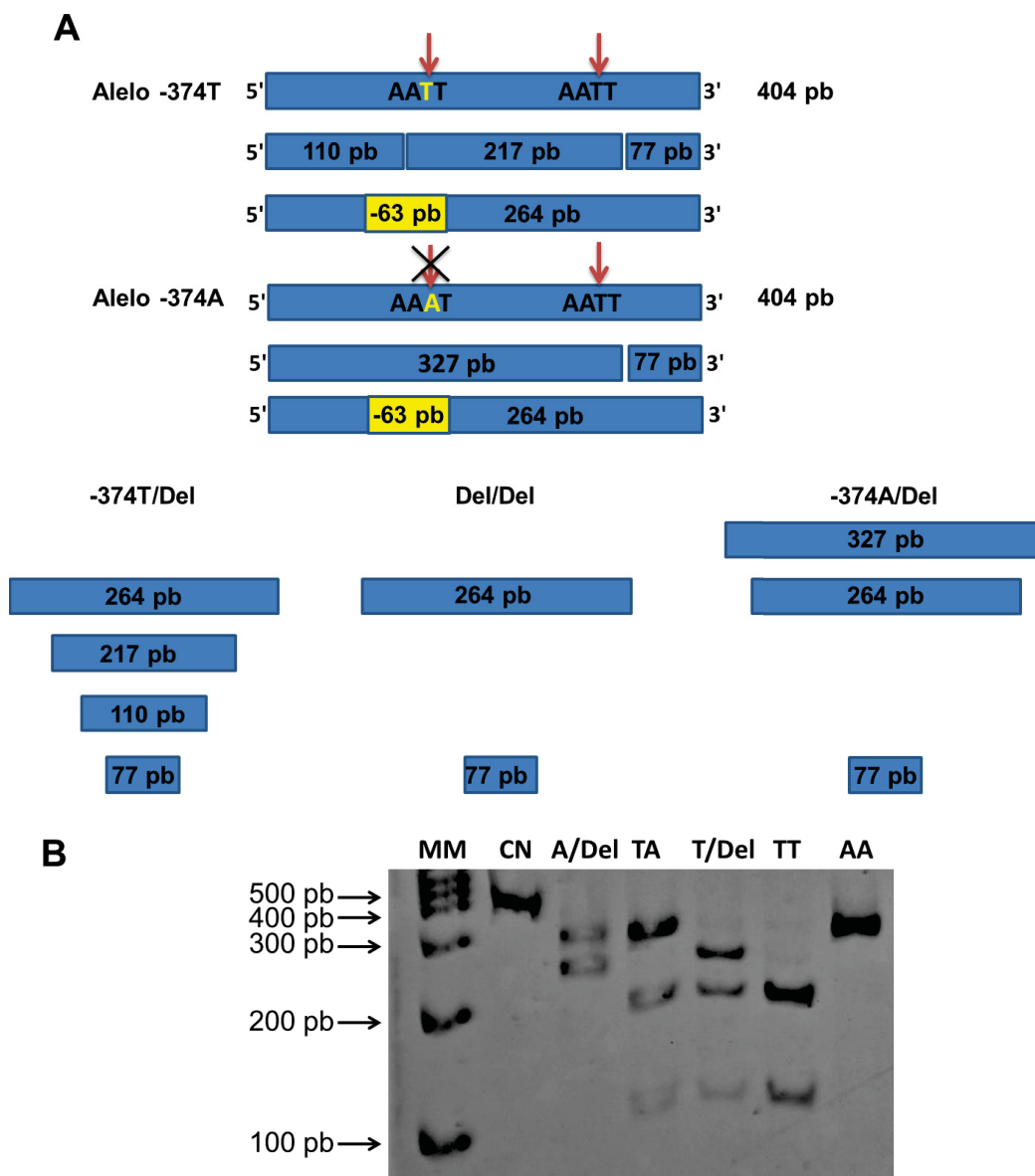


Figura 17 – Genotipagem por RFLP do polimorfismo Del 63 pb. Painei A. Mapa de restrição do produto de PCR. As setas indicam os sítios de restrição para a enzima *Tsp509* I. Os nucleotídeos em amarelo encontram-se na posição -374 e o retângulo em amarelo representa o fragmento deletado de 63 pb. Em destaque a ausência do sítio de restrição (x) no alelo -374A. Quando a deleção de 63 pb e o alelo T estão presentes no fragmento de 404 pb a digestão com a enzima de restrição *Tsp509* I gera os fragmentos 264 pb, 217 pb, 110 pb, e 77 pb quando a deleção de 63 pb e o alelo A estão presentes a digestão com a enzima de restrição *Tsp509* I gera os fragmentos 327 pb, 264 pb e 77 pb. Assim, o indivíduo homocigoto TT apresenta o perfil de restrição com 3 fragmentos (217 pb, 110 pb e 77 pb); o heterocigoto TA com 4 fragmentos (327 pb, 217 pb, 110 pb e 77 pb), o homocigoto AA com dois fragmentos (327 pb e 77 pb), o heterocigoto T/Del com 3 fragmentos (327

pb, 264 pb e 77 pb), o heterozigoto A/Del com 4 fragmentos e o homozigoto Del/Del 2 fragmentos (264 pb e 77 pb). **Painel B. Perfil eletroforético dos genótipos do polimorfismo -374T>A e Del 63 pb da região promotora do gene RAGE.** Os fragmentos de restrição foram separados em gel de poliacrilamida (29:1) a 10% em tampão TBE 1X, corados com brometo de etídeo e visualizados sob luz ultra-violeta (302 nm) com imagem capturada em sistema L.PIX (Loccus). Linha MM: marcador de massa molecular de 100 pb; Linha CN: produto de PCR com 404 pb sem digestão utilizado como controle negativo. As linhas A/Del, TA, T/Del, TT e AA mostram respectivamente, os perfis de restrição para os genótipos -374A/Del, -374TA, 374T/Del, 374TT e -374AA. À esquerda do gel estão indicados com flechas a massa molecular dos fragmentos de 100 pb, 200 pb, 300 pb, 400 pb e 500 pb do marcador de massa e à direita os fragmentos que podem ser gerados dependendo do genótipo após restrição do produto de PCR com a enzima *Tsp509 I*. Fonte: O autor (2018).

A frequência genotípica da deleção analisada está de acordo com o esperado pelo equilíbrio de *Hardy-Weinberg* em ambos os grupos. Os dados não mostram diferença significativa na distribuição genotípica e alélica entre os grupos estudados (Tabela 10).

Tabela 10 - Frequências genotípicas e alélicas da deleção de 63 pb da região promotora do gene *RAGE* para os grupos Controle, DM1 e DM2.

Gene/SNP	Modelo	Genótipos	Saudáveis			Diabéticos		Valores de P	
			Controle n=354	DM1 n=143	DM2 n=293	C vs DM1	C vs DM2	DM1 vs DM2	
RAGE	Codominante	I/I	344 (97,2)	141 (98,6)	288 (98,3)	0,348	0,347	0,810	
		I/D	10 (2,8)	2 (1,4)	5 (1,7)				
		D/D	0 (0)	0 (0)	0 (0)				
	Del 63 pb	Frequência Alelo D (%)	1,4	0,7	0,9	0,351	0,349	0,811	
		IC 95%	[1-2]	[0-2]	[0-2]				
	Dominante	II/ID+DD	344/10	141/2	288/5	0,348	0,347	0,810	
	Recessivo	DD/II+ID	0/354	0/143	0/293	-	-	-	

Genótipos descritos em n (%). P: probabilidade, Teste do Chi-quadrado ou Teste Exato de Fisher bidirecional. IC 95%: Intervalo de confiança de 95%. Todos os grupos estão em equilíbrio de *Hardy-Weinberg* ($P > 0,05$), para grupo controle ($P = 0,787$), DM1 ($P = 0,932$) e DM2 ($P = 0,883$).
Fonte: O autor (2018).

A frequência do alelo menos frequente para a deleção de 63 pb foi maior àquela descrita para indivíduos saudáveis Euro-Brasileiros (0,6%) (GOMES *et al.*, 2015) e Alemães (0,7%) (RUDOFISKY *et al.*, 2004), mas similar outra população Euro-Brasileira (1,0%) (COHEN *et al.*, 2012), e inferior à Asiática (3,3 -4,1%) (S. SU *et al.*, 2015, S. C. SU *et al.*, 2015) e Afro-Brasileira (6,0%) (COHEN *et al.*, 2012). Ao comparar os indivíduos com DM, a frequência alélica foi bastante similar entre os grupos e à população Alemã (RUDOFISKY *et al.*, 2004). A frequência alélica do

grupo DM2 também foi similar à outra população Euro-Brasileira (2,0%), mas inferior à Afro-Brasileira (4,0%) (SANTOS *et al.*, 2005), e a do DM1 foi inferior à encontrada em outra população Euro-Brasileira (4,0%) (GOMES *et al.*, 2015) (Tabela 11).

Tabela 11 - Comparações entre as frequências genóticas e alélicas da deleção de 63 pb da região promotora do gene *RAGE* com dados da literatura.

Grupo étnico	Características	Genótipos				Alelo (%)
		N	I/I	I/D	D/D	D
Euro-brasileiros (Presente estudo)	Controles	354	97,2	2,8	0	1,4
	DM1	143	98,6	1,4	0	0,7
	DM2	293	98,3	1,7	0	0
Asiáticos (S. C. SU <i>et al.</i> , 2015)	Carcinoma hepatocelular	265	91,3	8,7	0	4,3
	Controles	300	93,3	6,7	0	3,3
Euro-Brasileiros Afro-Brasileiros (COHEN <i>et al.</i> , 2012)	Controles	260	97,7	2,3	0	1,0
	Controles	74	87,8	12,2	0	6,0
Asiáticos (S. SU <i>et al.</i> , 2015)	Controles	592	92,4	7,1	0,5	4,1
	Câncer de Oral	618	93,4	6,6	0	3,3
Alemã (RUDOFISKY <i>et al.</i> , 2004)	DM1	559	97,8	2,2	0	1,0
	DM2	528	97,7	2,3	0	1,0
	Controles	475	98,5	1,5	0	0,7
Euro-Brasileiros Afro-Brasileiros (SANTOS <i>et al.</i> , 2005)	DM2	520	96,5	3,5	0	2,0
	DM2	183	91,3	8,7	0	4,0
Euro-Brasileiros (GOMES <i>et al.</i> , 2015)	DM1	90	89	1	0	4
	Controles	105	97	7	1	0,6

Em negrito, dados obtidos neste estudo: DM1: *Diabetes mellitus* tipo 1; DM2: *Diabetes mellitus* tipo 2. As frequências do alelo D em itálico e negrito estão fora do intervalo de confiança de 95% dos grupos do presente estudo calculados na Tabela 10.

Fonte: O autor (2018).

Rudofsky e colaboradores (2004) relataram que a deleção de 63 pb não está relacionada às manifestações do DM, e identificaram apenas um indivíduo homozigoto (D/D) porém saudável, entre a população estudada. Não observaram associação entre a deleção de 63 pb da região promotora do gene *RAGE* com o DM1, de acordo com nossos resultados. Contudo, um estudo realizado com a população Brasileira achou diferença significativa na distribuição alélica entre o grupo controle e DM1 ($P=0,20$), encontrando um indivíduo homozigoto (D/D) no grupo saudável (GOMES *et al.*, 2015). A baixa frequência de um dos alelos não permite análises com maior poder discriminatório devido ao tamanho amostral utilizado.

A frequência do polimorfismo Del 63 pb também foi baixa em outras populações (Tabela 11). Pelo fato da deleção aumentar a transcrição de *RAGE* em quatro vezes aproximadamente (HUDSON *et al.*, 2001a), esta variação tem potencial para afetar a susceptibilidade às complicações diabéticas (LINDHOLM *et al.*, 2006).

O baixo tamanho amostral, decorrente da baixa frequência da deleção, não permite uma análise com poder estatístico mínimo para quaisquer conclusões.

A Figura 18 mostra o perfil eletroforético típicos obtidos da PCR-RFLP para o polimorfismo -429T>C (rs1800625) localizado na região promotora do gene *RAGE*.

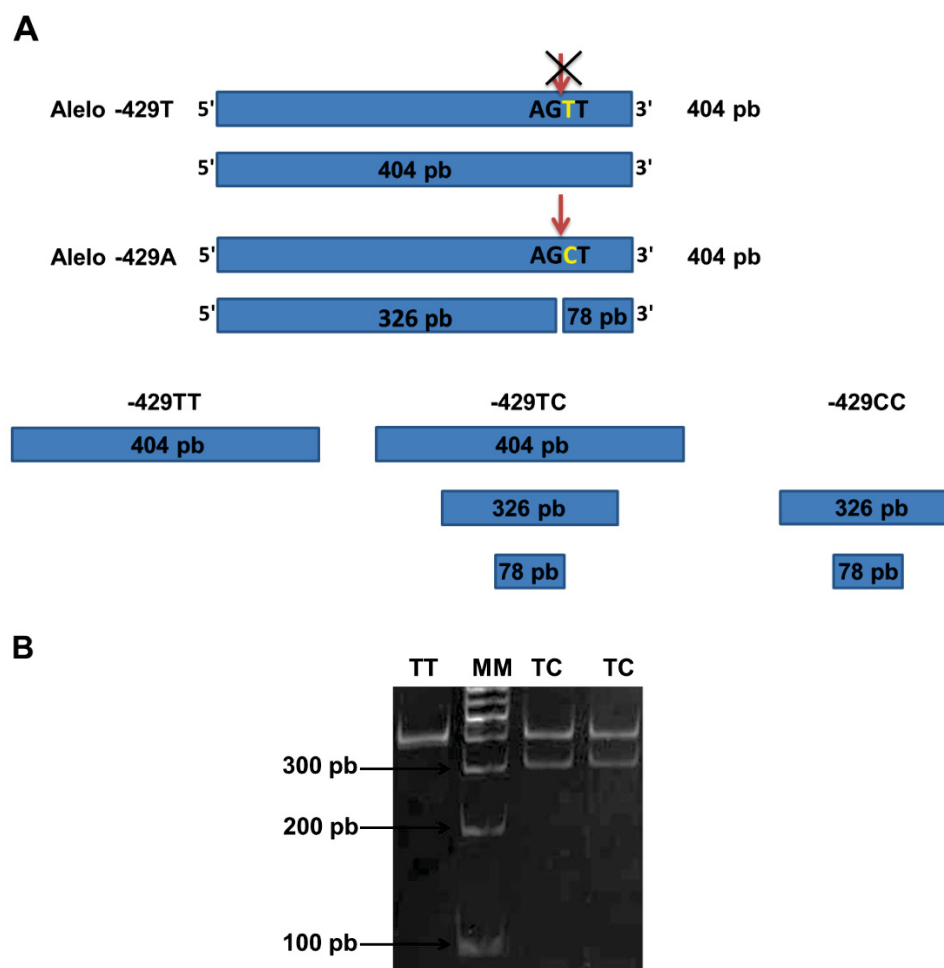


Figura 18 – Genotipagem por RFLP do polimorfismo -429T>C (rs1800625). **Painel A.** Mapa de restrição do produto de PCR. As setas indicam o sítio de restrição para a enzima *Alu* I. Os nucleotídeos em amarelo encontram-se na posição -429. Em destaque a ausência do sítio de restrição (x) no alelo -429. Quando o alelo T está presente no fragmento de 404 pb não há sítio de restrição para a enzima de restrição *Alu* I não havendo digestão havendo apenas o fragmento de 404 pb e quando o alelo C está presente a digestão com a enzima de restrição *Alu* I gera os fragmentos 326 pb e 78 pb. Assim, o indivíduo homocigoto TT apresenta o perfil de restrição com apenas um fragmento correspondente ao produto de PCR (404 pb); o heterocigoto TC com 3 fragmentos (404 pb, 326 pb e 78 pb) e o homocigoto CC com dois fragmentos (326 pb e 78 pb). **Painel B.** Perfil eletroforético dos genótipos do polimorfismo -429T>C da região promotora do gene *RAGE*. Os fragmentos de restrição foram separados em gel de poliacrilamida (29:1) a 10% em tampão TBE 1X, corados com brometo de etídeo e visualizados sob luz ultra-violeta (302 nm) com imagem capturada em sistema L.PIX (Loccus). Linhas TT, MM, TC e TC mostram respectivamente o genótipo -429TT, marcador de massa molecular de 100 pb; os genótipos -429TC e -429TC. À esquerda do gel estão indicados com flechas a massa molecular dos fragmentos de 100 pb, 200 pb e 300 pb do marcador de massa e à direita os fragmentos que podem ser gerados dependendo do genótipo após restrição do produto de PCR com a enzima *Alu* I.

Fonte: O autor (2018).

As frequências genóticas do polimorfismo estão de acordo com o esperado pelo equilíbrio de *Hardy-Weinberg* em todos os grupos (Tabela 11). Neste estudo, as frequências genóticas da variante -429T>C (rs1800625) do gene *RAGE* não foram diferentes ($P>0,05$) entre os grupos controle, DM1 e DM2. As frequências alélicas entre os grupos controle e DM2 ($P=0,393$) ou DM2 e DM1 ($P=0,212$) não foram diferentes.

A frequência do alelo C no grupo DM1 foi marginalmente superior ao do grupo controle ($P=0,045$), apresentando uma razão de chances de 1,54 (95%IC, 1,01-2,34) (Tabela 12). Novos ensaios com tamanho amostral superior são necessários para confirmar este achado.

Não encontramos associação do polimorfismo -429T>C com o DM2 em concordância com outros estudos outras etnias (HUDSON *et al.*, 2001b, JIXIONG *et al.*, 2003, NG *et al.*, 2012, RASKA *et al.*, 2017, ZULFIQAR *et al.*, 2018). Contudo, encontramos uma maior frequência do alelo C no grupo com DM em relação ao grupo controle, em concordância com o estudo de Picheth e colaboradores (2007b) realizado em uma população Brasileira.

Tabela 12 - Frequências genóticas e alélicas do polimorfismo -429T>C (rs1800625) da região promotora do gene *RAGE* para os grupos Controle, DM1 e DM2.

Gene/SNP	Modelo	Genótipos	Saudáveis			Diabéticos		Valores de P	
			Controle n=354	DM1 n=143	DM2 n=293	C vs DM1	C vs DM2	DM1 vs DM2	
RAGE rs1800625 -429T>C	Codominante	TT	291 (82,2)	107 (74,8)	231 (78,8)	0,132	0,337	0,160	
		TC	60 (16,9)	33 (23,1)	61 (20,8)				
		CC	3 (0,9)	3 (2,1)	1 (0,4)				
	Frequência Alelo C (%)		9,3	13,6	10,8	0,045	0,393	0,212	
	IC 95%		[7-11]	[10-18]	[8-13]				
	Dominante		TT/TC+CC	291/63	107/36	231/62	0,062	0,280	0,345
Recessivo		CC/TT+TC	3/351	3/140	1/292	0,247	0,413	0,070	

Genótipos descritos em n (%). P: probabilidade, Teste do Chi-quadrado ou Teste Exato de Fisher bidirecional. IC 95%: Intervalo de confiança de 95%. Todos os grupos estão em equilíbrio de *Hardy-Weinberg* ($P>0,05$), para grupo controle ($P=0,962$), DM1 ($P=0,809$) e DM2 ($P=0,146$).

Odds ratio para alelo C no DM1: 1,54 (95%IC, 1,01-2,34).

Fonte: O autor (2018).

As frequências do alelo raro (C) observada nos grupos controles, DM1 e DM2 para o polimorfismo -429T>C foram diferentes daquelas descritas para diversas populações (Tabela 13). As frequências do alelo C foram similares para o grupo controle com uma população Euro-Brasileira (PICHETH *et al.*, 2007b) e Afro-Brasileira (COHEN *et al.*, 2012) e para o grupo DM2 com algumas populações Asiáticas (JIXIONG *et al.*, 2003, PRASAD *et al.*, 2010).

Tabela 13 – Comparações entre as frequências genotípicas e alélicas do polimorfismo -429T>C (rs1800625) do gene *RAGE* com dados da literatura.

Grupo étnico	Características	Genótipos			Alelo (%)	
		N	TT	TC	CC	C
Euro-brasileiros (Presente estudo)	Controles	354	82,2	16,9	0,9	9,3
	DM1	143	74,8	23,1	2,1	13,6
	DM2	293	78,8	20,8	0,4	10,8
Ingleses (GOULART <i>et al.</i> , 2008)	DM2	481	71,8	26,1	2,1	15,1
	Controles	496	69,6	28,1	2,3	16,3
Han Chineses (D. WANG <i>et al.</i> , 2017)	Controles	540	77,2	20,9	1,9	12,3
Euro-brasileiros Afro-brasileiros (TORRES <i>et al.</i> , 2012)	Controles	108	76,9	21,3	1,8	12,5
	Controles	91	78	19,8	2,2	12,1
Chineses (ZHANG <i>et al.</i> , 2017)	DM2 com nefropatia	430	49,3	39,5	11,2	30,9
	DM2 sem nefropatia	425	64,4	30,6	5,0	20,3
Indianos (BALASUBBU <i>et al.</i> , 2010)	DM2 com retinopatia	345	74,9	22,7	2,4	13,7
	DM2 sem retinopatia	359	71,3	24,9	3,8	16,2
Chineses (LU <i>et al.</i> , 2008)	Controles	152	80,9	15,1	4,0	11,5
	DM sem DAC	205	77,1	18,0	4,9	13,9
	DM com DAC	128	79,7	18,0	2,3	11,3
	DM+DAC+reestenose	86	80,2	16,3	4,5	13,6
Asiáticos (XU <i>et al.</i> , 2005)	DM2	271	80,5	18,8	0,7	13,4
	Controles	127	70,1	29,1	0,8	13,1
Caucasianos (KANKOVA <i>et al.</i> , 2005)	DM2	198	63,1	29,8	7,1	22,0
	Controles	179	72,1	25,7	2,2	15,1
Euro-Brasileiros	DM2	520	77,3	20,6	2,1	12
Afro-Brasileiros (SANTOS <i>et al.</i> , 2005)	DM2	183	77	21,9	1,1	12
Asiáticos (PRASAD <i>et al.</i> , 2010)	DM2	196	81,1	13,8	5,1	12,0
	Controles	225	76,9	22,2	0,9	12,0
Han Chineses (PAN <i>et al.</i> , 2014)	Controles	504	72,4	25,8	1,8	14,7
Han Chineses (PAN <i>et al.</i> , 2013)	Câncer de Pulmão	819	54,6	37,0	8,4	26,9
	Controles	803	60,4	36,0	3,6	21,6
Finlandês (RASKA <i>et al.</i> , 2017)	DM2	112	71	25	4	16,1
	Controles	171	65	32	3	18,7
Asiáticos (S. C. SU <i>et al.</i> , 2015)	Carcinoma hepatocelular	265	81,5	16,6	1,9	10,2
	Controles	300	92,3	7,4	0,3	4,0
Asiáticos (S. SU <i>et al.</i> , 2015)	Controles	592	89,9	9,6	0,5	5,3
	Câncer de Oral	618	82,4	16,5	1,1	9,4
Euro-brasileiros (PICHETH <i>et al.</i> , 2007b)	DM1	102	64,7	33,3	2	19
	Controles	225	80,4	19,6	0	10
Paquistanesa	DM2	100	23	26	51	64*

(ZULFIQAR <i>et al.</i> , 2018)	Controles	50	28	22	50	61*
Euro-Brasileiros	Controles	257	74	23,3	2,7	14
Afro-Brasileiros	Controles	74	82,4	16,2	1,4	10
(COHEN <i>et al.</i> , 2012)						
Euro-Brasileiros	DM1	90	75	14	0	8
(GOMES <i>et al.</i> , 2015)	Controles	105	78	19	0	1

Em negrito, dados obtidos neste estudo: DM1: *Diabetes mellitus* tipo 1; DM2: *Diabetes mellitus* tipo 2; DAC: *Doença Arterial Coronariana*. As frequências do alelo C em itálico e negrito estão fora do intervalo de confiança de 95% dos grupos do presente estudo calculados na Tabela 12. *Frequências fora do equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Fonte: O autor (2018).

A Figura 19 mostra o perfil eletroforético típicos obtidos da PCR-RFLP para o polimorfismo G82S (rs2070600) localizado no exon 3 do gene *RAGE*.

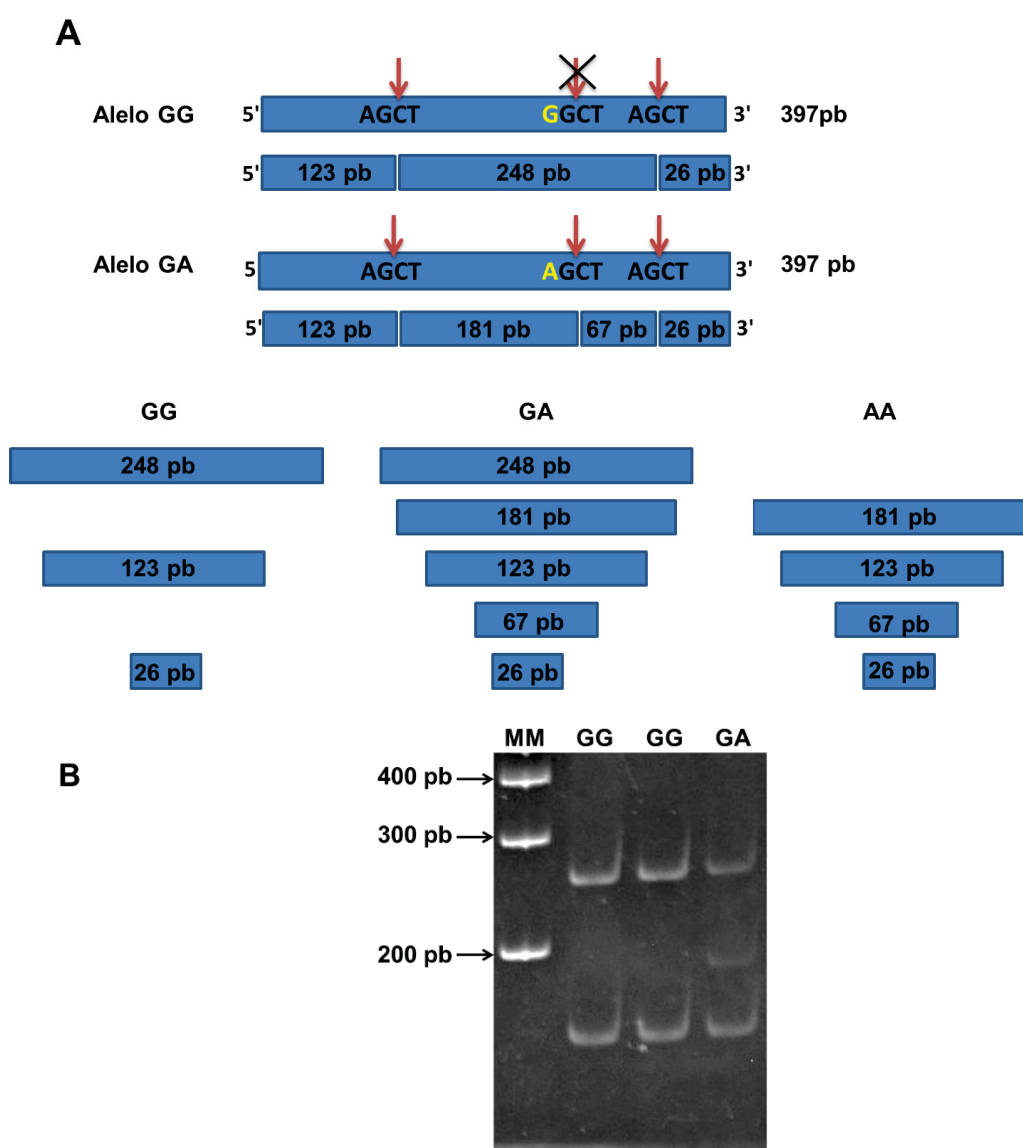


Figura 19 – Genotipagem por RFLP do polimorfismo G82S (rs2070600). Painei A. Mapa de restrição do produto de PCR. As setas indicam o sítio de restrição para a enzima *Alu I*. Os nucleotídeos em amarelo encontram-se no códon 82. Em destaque a ausência do sítio de restrição (x) no alelo G. Quando o alelo G está presente no fragmento de 397 pb há dois sítios de restrição para a enzima de restrição *Alu I* gerando os fragmentos 248 pb, 123 pb e 26 pb e quando o alelo A está presente ocorre a introdução de um terceiro sítio de restrição para a enzima de restrição *Alu I*

gerando os fragmentos 181 pb, 123 pb, 67 pb e 26 pb. Assim, o indivíduo homocigoto GG apresenta o perfil de restrição com 3 fragmentos (248 pb, 123 pb e 26 pb); o heterocigoto GA com 5 fragmentos (248 pb, 181 pb, 123 pb, 67 pb e 26 pb) e o homocigoto AA com 4 fragmentos (181 pb, 123 pb, 67 pb e 26 pb). **Painel B. Perfil eletroforético dos genótipos do polimorfismo G82S (rs2070600) no exon 3 do gene RAGE.** Os fragmentos de restrição foram separados em gel de poliacrilamida (29:1) a 10% em tampão TBE 1X, corados com brometo de etídeo e visualizados sob luz ultra-violeta (302 nm) com imagem capturada em sistema L.PIX (Loccus). Linha MM: marcador de massa molecular de 100 pb, Linhas GG, GG e GA mostram respectivamente os genótipos GG82, GG82 e GS82. À esquerda do gel estão indicados com flechas a massa molecular dos fragmentos de 200 pb, 300 pb e 400 pb do marcador de massa e à direita os fragmentos que podem ser gerados dependendo do genótipo após restrição do produto de PCR com a enzima *Alu I*.

Fonte: O autor (2018).

As frequências alélicas e genóticas da variante Gly82Ser (rs2070600) do gene *RAGE* estão dentro do equilíbrio de *Hardy-Weinberg* em todos os grupos estudados e não foram diferentes significativamente (Tabela 14).

Outros estudos também não encontraram diferença significativa da distribuição genotípica e alélica em entre os grupos controles, DM1 (PREVOST *et al.*, 1999, NAKA *et al.*, 2006) e DM2 (HUDSON *et al.*, 1998, NAKA *et al.*, 2006, GOULART *et al.*, 2008, KAMAL *et al.*, 2016, RASKA *et al.*, 2017). Estes resultados estão em concordância com uma meta-análise que sugere não haver associação deste polimorfismo com o DM2 ou complicações associadas ao DM (KANG *et al.*, 2012).

Tabela 14 - Frequências genóticas e alélicas do polimorfismo G82S (rs2070600) da região do exon 3 do gene *RAGE* para os grupos Controle, DM1 e DM2.

Gene/SNP	Modelo	Genótipos	Saudáveis			Diabéticos			Valores de P		
			Controle n=354	DM1 n=143	DM2 n=293	C vs DM1	C vs DM2	DM1 vs DM2			
RAGE rs2070600	Codominante	GG	347 (98,0)	142 (99,3)	284 (96,9)	0,305	0,372	0,120			
		GA	7 (2,0)	1 (0,7)	9 (3,1)						
G82S G>A		AA	0 (0)	0 (0)	0 (0)						
		Frequência Alelo A (%)	1,0	0,3	1,5	0,307	0,375	0,122			
		IC 95%	[0-2]	[0-1]	[1-3]						
	Dominante	GG/GA+AA	347/7	142/1	284/9	0,305	0,372	0,120			
	Recessivo	AA/GG+GA	0/354	0/143	0/293	-	-	-			

Genótipos descritos em n (%). P: probabilidade, Teste do Chi-quadrado ou Teste Exato de Fisher bidirecional. IC 95%: Intervalo de confiança de 95%. Todos os grupos estão em equilíbrio de *Hardy-Weinberg* ($P > 0,05$), para grupo controle ($P = 0,851$), DM1 ($P = 0,966$) e DM2 ($P = 0,789$).

Fonte: O autor (2018).

A frequência do alelo de menor frequência A nos grupos controle, DM1 e DM2 foram inferiores a descritas para populações Caucasoídes (PREVOST *et al.*, 1999, POIRIER *et al.*, 2001, GOULART *et al.*, 2008, SALONEN *et al.*, 2014, RASKA *et al.*, 2017) e Asiáticas (ZHANG *et al.*, 2009, HALDAR *et al.*, 2015, ZHANG *et al.*, 2017), mas similares às frequências descritas em outros estudos com a população Brasileira (NAKA *et al.*, 2006, TORRES *et al.*, 2012). A diferença na frequência é mais expressiva quando comparada à população Chinesa e Japonesa (Tabela 15).

Tabela 15 – Comparações entre as frequências genótípicas e alélicas do polimorfismo G82S (rs2070600) da região do exon 3 do gene *RAGE* com dados da literatura.

Grupo étnico	Características	N	Genótipos			Alelo (%)
			GG	GA	AA	A
Euro-brasileiros (Presente estudo)	Controles	354	98,0	2,0	0	1,0
	DM1	143	99,3	0,7	0	0,3
	DM2	293	96,9	3,1	0	1,5
Ingleses (GOULART <i>et al.</i> , 2008)	DM2	481	89,3	9,8	0,9	5,8
	Controles	496	91,6	8,4	0,0	4,2
Han Chineses (D. WANG <i>et al.</i> , 2017)	Controles	540	59,4	35,2	5,4	22,9
Indianos (HALDAR <i>et al.</i> , 2015)	DM2	145	77	22	1	11
	Controles	100	74	26	0	13
Euro-brasileiros	Controles	108	96,3	3,7	0	1,9
Afro-brasileiros (TORRES <i>et al.</i> , 2012)	Controles	91	98,9	1,1	0	0,5
Chineses (ZHANG <i>et al.</i> , 2017)	DM2 com Nefropatia	430	50,2	40,0	9,8	29,8
	DM2 sem Nefropatia	435	57,2	35,6	7,1	24,9
Indianos (BALASUBBU <i>et al.</i> , 2010)	DM2 com retinopatia	345	90,4	9,3	0,3	4,9
	DM2 sem retinopatia	359	84,1	15,6	0,3	8,1
Chineses (ZHANG <i>et al.</i> , 2009)	DM2 com retinopatia	166	39,4	48,8	12,1	36,4
	DM2 sem retinopatia	340	61,2	35,9	2,9	20,9
	Controles	182	51,3	41,0	7,7	28,2
Chineses (ZHANG <i>et al.</i> , 2017)	DM2	435	57,2	35,6	7,1	24,9
	DM2 com Nefropatia	430	50,2	40,0	9,8	29,8
Caucasianos (RASKA <i>et al.</i> , 2017)	DM2	112	88	12	0	5,8
	Controles	171	94	6	0	2,9
Indianos (VANITA, 2014)	DM2 com retinopatia	446	92,0	5,6	2,4	5,3
	DM2 sem retinopatia	312	87,2	12,	0,7	6,7
Japoneses (YOSHIOKA <i>et al.</i> , 2005b)	DM2 com microalbuminúria	232	74	23	3	14,2
	DM2 sem microalbuminúria	116	79	18	3	12,3
Franceses (PREVOST <i>et al.</i> , 1999)	DM1	188	94	6	0	3,5
	Controles	198	95	4	0	2,7
Brasileiros (NAKA <i>et al.</i> , 2006)	DM1	105	98,1	1,9	0	1,0
	DM2	147	97,8	2,1	0	1,0
	Controles	82	96,3	3,7	0	1,8
Filandeses (SALONEN <i>et al.</i> , 2014)	DM1 <15 anos de idade	1390	78	22	1	11,7
Dinamarqueses (POIRIER <i>et al.</i> , 2001)	DM1 sem nefropatia	193	90,6	9,4	0	4,7
	DM1 com nefropatia	199	93,6	5,9	0,5	3,5

Em negrito, dados obtidos deste estudo. DM1: *Diabetes mellitus* tipo 1; DM2: *Diabetes mellitus* tipo 2. As frequências do alelo A em itálico e negrito estão fora do intervalo de confiança de 95% dos grupos do presente estudo calculados na Tabela 14.

Fonte: O autor (2018).

Os resultados da associação dos polimorfismos -374T>A (rs1800624), Del 63 pb (-407 a -345 pb), -429T>C (rs1800625) e Gly82Ser (rs2070600) no gene *RAGE* com o desenvolvimento do DM ou com suas complicações são conflitantes (KANG *et al.*, 2012, NIU *et al.*, 2012, SHI *et al.*, 2015, TAO *et al.*, 2017). Os achados contraditórios nas associações dos polimorfismos de *RAGE* podem ser devido à heterogeneidade clínica e perfis biológicos das populações analisadas nos diferentes estudos, incluindo a definição dos desfechos clínicos (complicações presentes no grupo com DM, tempo de diabetes, critérios de exclusão), tamanho amostral, diferenças na exposição dos fatores de risco, etnogeografia e antecedentes genéticos entre raças e etnias.

Considerando o fato do DM ser uma doença multifatorial, *background* genético diferente ou padrões de desequilíbrio de ligação podem contribuir para a divergência, e um polimorfismo pode estar em estrita ligação com outro próximo à uma variante causal em uma etnia e não em outra (YU *et al.*, 2010, NIU *et al.*, 2012). Há muitos estudos com genes candidatos mostrando que algumas variantes podem constituir fator de risco para o DM em um grupo étnico, mas permanece controverso em outros grupos étnicos (JIANG *et al.*, 2015, LOTTA *et al.*, 2016).

A baixa frequência dos polimorfismos Del 63 bp e G28S no nosso número amostral reduz o poder da análise estatística e conseqüentemente torna nossas observações irrelevantes. (COHEN *et al.*, 2012, GOMES *et al.*, 2015, YANG *et al.*, 2017).

5.3.2 Polimorfismos no gene *RANTES*

A Figura 20 mostra o perfil eletroforético típico obtidos da PCR-RFLP para o polimorfismo -403G>A (rs2107538) do gene *RANTES*.

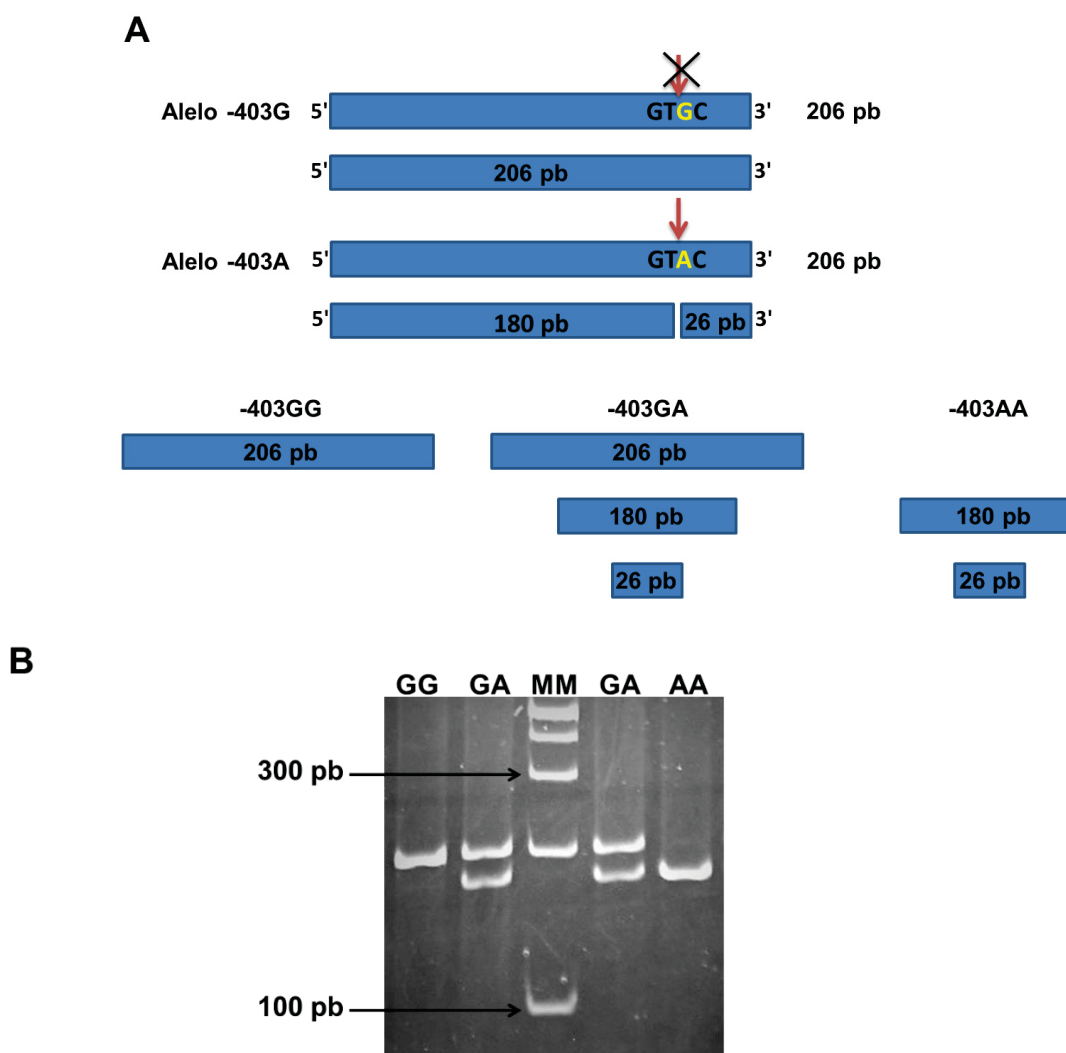


Figura 20 – Genotipagem por RFLP do polimorfismo -403G>A (rs2107538) do gene *RANTES*. **Painel A.** Mapa de restrição do produto de PCR. As setas indicam o sítio de restrição para a enzima *Rsa* I. Os nucleotídeos em amarelo encontram-se na posição -403. Em destaque a ausência do sítio de restrição (x) no alelo G. Quando o alelo G está presente no fragmento de 206 pb não há sítio de restrição para a enzima de restrição *Rsa* I não havendo digestão havendo apenas o fragmento de 206 pb e quando o alelo A está presente a digestão com a enzima de restrição *Rsa* I gera os fragmentos 180 pb e 26 pb. Assim, o indivíduo homocigoto GG apresenta o perfil de restrição com apenas um fragmento correspondente ao produto de PCR (206 pb); o heterocigoto GA com 3 fragmentos (206 pb, 180 pb e 26 pb) e o homocigoto AA com dois fragmentos (180 pb e 26 pb). **Painel B.** Perfil eletroforético dos genótipos do polimorfismo -403G>A (rs2107538) na região promotora do gene *RANTES*. Os fragmentos de restrição foram separados em gel de poliacrilamida (29:1) a 10% em tampão TBE 1X, corados com brometo de etídeo e visualizados sob luz ultra-violeta (302 nm) com imagem capturada em sistema L.PIX (Loccus). Linhas GG, GA, MM, GA e AA mostram respectivamente os genótipos -403GG, -403GA, marcador de massa molecular de 100 pb; os genótipos -403GA e -403AA. À esquerda do gel estão indicados com flechas a massa molecular dos fragmentos de 100 pb e 300 pb do marcador de massa e à direita os fragmentos que podem ser gerados dependendo do genótipo após restrição do produto de PCR com a enzima *Rsa* I. Fonte: O autor (2018).

As frequências alélicas e genotípicas da variante -403G>A (rs2107538) do gene *RANTES* foram diferentes ($P>0,05$) entre DM1 e controle e entre DM1 e DM2 nos modelos codominante e recessivo, mas não diferiram para entre o DM2 e o

controle (P=0,260) (Tabela 16). As frequências genótípicas do polimorfismo estão de acordo com o esperado pelo equilíbrio de *Hardy-Weinberg* em ambos os grupos.

A frequência do alelo A foi aproximadamente 1,3 vezes maior no DM1 quando comparado ao controle (36,4% vs 27,0%, respectivamente; P=0,003) e 1,5 vezes maior no DM1 quando comparada à DM2 (36,4% vs 24,2%, respectivamente; P=<0,001). A razão de chances para o alelo A foi 1,55 (95% IC, 1,15–2,07), ou seja, indivíduos portadores do alelo G possuem 1,55 vezes maior risco em desenvolver DM1.

Tabela 16. Frequências genótípicas e alélicas do polimorfismo -403G>A (rs2107538) da região promotora do gene *RANTES* para os grupos Controle, DM1 e DM2.

Gene/SNP	Modelo	Genótipos	Saudáveis			Diabéticos		Valores de P	
			Controle n=354	DM1 n=143	DM2 n=293	C vs DM1	C vs DM2	DM1 vs DM2	
RANTES rs2107538 -403G>A	Codominante	GG	188 (53,1)	55 (38,5)	165 (56,3)	0,010	0,422	0,001	
		GA	141 (39,8)	72 (50,3)	114 (38,9)				
		AA	25 (7,1)	16 (11,2)	14 (4,8)				
			Frequência Alelo A (%)	27,0	36,4	24,2	0,003	0,260	<0,001
			IC 95%	[22-32]	[28-45]	[19-30]			
	Dominante	GG/GA+AA	188/166	55/118	165/128	<0,001	0,414	<0,001	
	Recessivo	AA/GG+GA	25/329	16/127	14/279	0,130	0,224	0,013	

Genótipos descritos em n (%). P: probabilidade, Teste do Chi-quadrado ou Teste Exato de Fisher bidirecional. IC 95%: Intervalo de confiança de 95%. Todos os grupos estão em equilíbrio de *Hardy-Weinberg* (P>0,05), para grupo controle (P=0,836), DM1 (P=0,293) e DM2 (P=0,307).

Odds Ratio para alelo A no DM1 1,55 (95% IC, 1,15–2,07)

Fonte: O autor (2018).

O alelo -403A em *RANTES* foi associado com aumento da expressão do seu RNAm, o que resultaria em maiores concentrações de *RANTES* favorecendo condição inflamatória (McDermott, et al., 2000; Nickel, et al., 2000). Jamili e colaboradores (2013) mostraram que as concentrações plasmáticas de *RANTES* são maiores em pacientes com DM1 quando comparados com indivíduos saudáveis, e que as concentrações se correlacionavam diretamente com o tempo da doença e idade dos pacientes. Além disso, foi demonstrado que *RANTES* e seu receptor cognato (CCR5) foram implicados na regulação da função das células imunes (WONG *et al.*, 2001). Polimorfismos que revogam a expressão funcional do receptor

CCR5 enfraquece a ação pró-inflamatória mediada por RANTES (SAMSON *et al.*, 1996) e mutações no receptor predispõe o início tardio do DM1 (KALEV *et al.*, 2003). Também foi mostrado que o recrutamento das células T e a ativação de proteínas quinases são dependentes de RANTES-CCR5 (RODRIGUEZ-FRADE *et al.*, 1999, WONG *et al.*, 2001) e que a administração de inibidor de JAK3 atrasa o início do diabetes autoimune em camundongos diabéticos não obesos (NOD) (CETKOVIC-CVRLJE *et al.*, 2003). Ainda, RANTES é um dos fatores de ativação dos membros das proteínas quinases ativadas por mitógeno (Erk e p38) que estão envolvidas na proliferação e diferenciação celular (BRILL *et al.*, 2001, WONG *et al.*, 2001, WONG, FISH, 2003, KONDOH *et al.*, 2005). A proteína p38 pode estar associada com a destruição das células β durante o desenvolvimento do DM1 e sua inibição resulta na inibição da imunidade Th1 e impede que ratos NOD desenvolvam DM (ANDO *et al.*, 2004). Portanto, é concebível que concentrações elevadas de RANTES possa oferecer risco para o desenvolvimento do DM1 através da ativação de uma dessas vias. Desta forma, estes resultados estão de acordo com o alelo -403A estar associado ao risco para o DM1 encontrado neste estudo.

Existe um estudo (ZHERNAKOVA *et al.*, 2006) que descreveu associação do alelo A com proteção para o DM1 e correlação com concentrações diminuídas de RANTES, resultados contrários ao do nosso estudo e dos demais citados acima. Alguns fatores devem ser levados em consideração com relação a este estudo; primeiro os, autores reportam que as frequências genótípicas e alélicas não estavam dentro do equilíbrio de *Hardy-Weinberg* ($P=0,02$), e, segundo, o número amostral no qual foi quantificado RANTES foi pequeno, sendo o grupo controle e DM1 constituído de 14 e 15 indivíduos, respectivamente.

Jamali e colaboradores (2013) demonstraram que as concentrações de RANTES foi significativamente aumentadas com a idade em pacientes com DM1, de modo que foi detectado $618,6 \pm 45,3$ pg/mL, $1140 \pm 53,9$ pg/mL e $1686,4 \pm 48,6$ pg/mL em pacientes com idades entre 1 - 20 anos, 21 - 40 anos e 41 - 60 anos, respectivamente ($p < 0,0001$). Mais estudos avaliando a expressão gênica de RANTES em pacientes com e sem DM podem ser úteis para esclarecer ainda mais seu papel como marcador de predição de DM1.

Além disso, o estudo de Zhernakova e colaboradores (2006) foi desenvolvido em crianças diagnosticadas com 17 anos ou menos (mediana de 8,7 anos, variação de 1 a 17 anos) e a idade de início da DM1 se correlaciona tanto com o risco

genético quanto com a gravidade da doença (SABBAH *et al.*, 2000, JERRAM,LESLIE, 2017). Hizawa e colaboradores (2002) demonstraram que as manifestações genéticas do alelo -28G do promotor de *RANTES* variam com a idade de início da asma. Os autores encontraram associação entre o alelo -28G da *RANTES* com início tardio, mas não com asma precoce ou de início intermediário. A correlação entre heterogeneidade genética e idade de início é evidente em várias doenças complexas, incluindo Alzheimer (BLACKER,TANZI, 1998), câncer de mama (WOOSTER *et al.*, 1995), e Parkinson (SCOTT *et al.*, 2001).

A frequência do alelo -403A (rs2107538) no grupo controle (27% - 95% IC, 22–32%) foi similar a reportada para as populações Holandesa (22,0%) (Zhernakova *et al.*, 2006), Chinesa (27,7%) (Yao *et al.*, 2009), Grega (22,5%) (VOGIATZI *et al.*, 2009) e Indiana (MISHRA *et al.*, 2012); inferior que na Japonesa (33%) (LIU *et al.*, 1999a, HIZAWA *et al.*, 2002), Coreana (42,2%) (JANG *et al.*, 2007a), Chinesa Han (36,1%) (QIN *et al.*, 2011) e Africana (55,6%) (MHMOUD *et al.*, 2013); e maior que Espanhola (13,7%) (SANCHEZ-CASTANON *et al.*, 2009), Polonesa (19,8%) (LUTEREK-PUSZYNSKA *et al.*, 2017, FICHNA *et al.*, 2018) e Alemã (20%) (NICKEL *et al.*, 2000).

As frequências do alelo -403A nos grupos com DM foram diferentes das reportada em outras populações (Tabela 17), a do DM1 (36,4% - 95% IC, 28–45%) foi superior ao da população Holandesa (18%) e Irlandesa (15,6%) (PETTIGREW *et al.*, 2010) e a do DM2 (24,2% - 95% IC, 19–30%) foi inferior à descrita para a população Coreana (JANG *et al.*, 2007b) e Japonesa (34%) (NAKAJIMA *et al.*, 2003).

Tabela 17 – Comparações entre as frequências genóticas e alélicas do polimorfismo -403G>A (rs2107538) da região promotora do gene *RANTES* com dados da literatura.

Grupo étnico	Características	N	Genótipos			Alelo (%)
			GG	GA	AA	A
Euro-brasileiros (Presente estudo)	Controles	354	53,1	39,8	7,1	27,0
	DM1	143	38,5	50,8	11,2	36,4
	DM2	293	56,3	38,9	4,8	24,2
Holandeses (ZHERNAKOVA <i>et al.</i> , 2006)	DM1	350	66,8	30,2	3,0	18,0
Irlandesa (PETTIGREW <i>et al.</i> , 2010)	Controles	540	58,6	38,2	3,2	22,0
	DM1 com nefropatia	267	67,8	31,1	1,1	16,7
Afro-Americanos	DM1 sem nefropatia	442	71,8	25,2	3,0	15,6
	Controle	94	14,9	55,3	29,8	43
Afro-Caribenhos	Controle	85	15,3	56,5	28,2	44
Colombianos	Controle	87	6,9	47,1	46	30
Alemães	Controle	286	2,1	35	62,9	20
Americanos (NICKEL <i>et al.</i> , 2000)	Controle	152	0,7	28,9	70,4	15
Poloneses (FICHNA <i>et al.</i> , 2018)	Controles	542	65,5	29,3	5,2	19,8
Poloneses (LUTEREK-PUSZYNSKA <i>et al.</i> , 2017)	Artrite reumatoide	422	67,8	28,7	3,6	17,9
	Controles	338	63,6	33,1	3,3	19,8
Gregos (VOGIATZI <i>et al.</i> , 2009)	DAC	192	50	43,2	6,8	29,5
	Controle	149	55,7	43,6	0,7	22,5
Chineses (YAO <i>et al.</i> , 2009)	Artrite reumatoide	107	43,0	48,6	8,4	32,7
	Controles	139	51,8	41	7,2	27,7
Coreanos (JANG <i>et al.</i> , 2007a)	DAC	377	40,8	45,1	14,1	36,6
	DM2 + DAC	176	42,6	40,9	16,5	36,9
	Controles	416	32,5	50,7	16,8	42,2
Indianos (MISHRA <i>et al.</i> , 2012)	Controles	216	61	33	6	23
Indianos (SELVARAJ <i>et al.</i> , 2011)	Controles	211	43,1	46,0	10,9	33,9
Espanhóis (SANCHEZ-CASTANON <i>et al.</i> , 2009)	Controles	157	73,9	24,8	1,3	13,7
Chineses (CHU <i>et al.</i> , 2007)	Controles	465	46,0	42,8	11,2	32,6
Africanos (MHMOUD <i>et al.</i> , 2013)	Controles	206	33,0	22,8	44,2	55,6
Japonesa (HIZAWA <i>et al.</i> , 2002)	Controles	311	45	44	11	33

Em negrito, dados obtidos deste estudo. DM1: *Diabetes mellitus* tipo 1; DM2: *Diabetes mellitus* tipo 2; DAC: Doença arterial coronariana. As frequências do alelo A em itálico e negrito estão fora do intervalo de confiança de 95% dos grupos do presente estudo calculados na Tabela 16.

Fonte: O autor (2018).

Uma frequência notavelmente mais alta do alelo -403A foi observada em indivíduos de ascendência Africana em comparação com indivíduos caucasianos. À luz dessas diferenças étnicas, é intrigante que diferenças básicas na biologia do receptor de quimiocina C-C tenham sido descritas em indivíduos de ascendência africana vs caucasiana. A deleção de 32 pb no receptor de RANTES (CCR5) é

detectado em uma frequência maior que 10% na população Caucasoide e está ausente na Africana (MARTINSON *et al.*, 1997).

A Figura 21 mostra o perfil eletroforético típicos obtidos da PCR-RFLP para o polimorfismo -28C>G (rs2280788) da região promotora do gene *RANTES*.

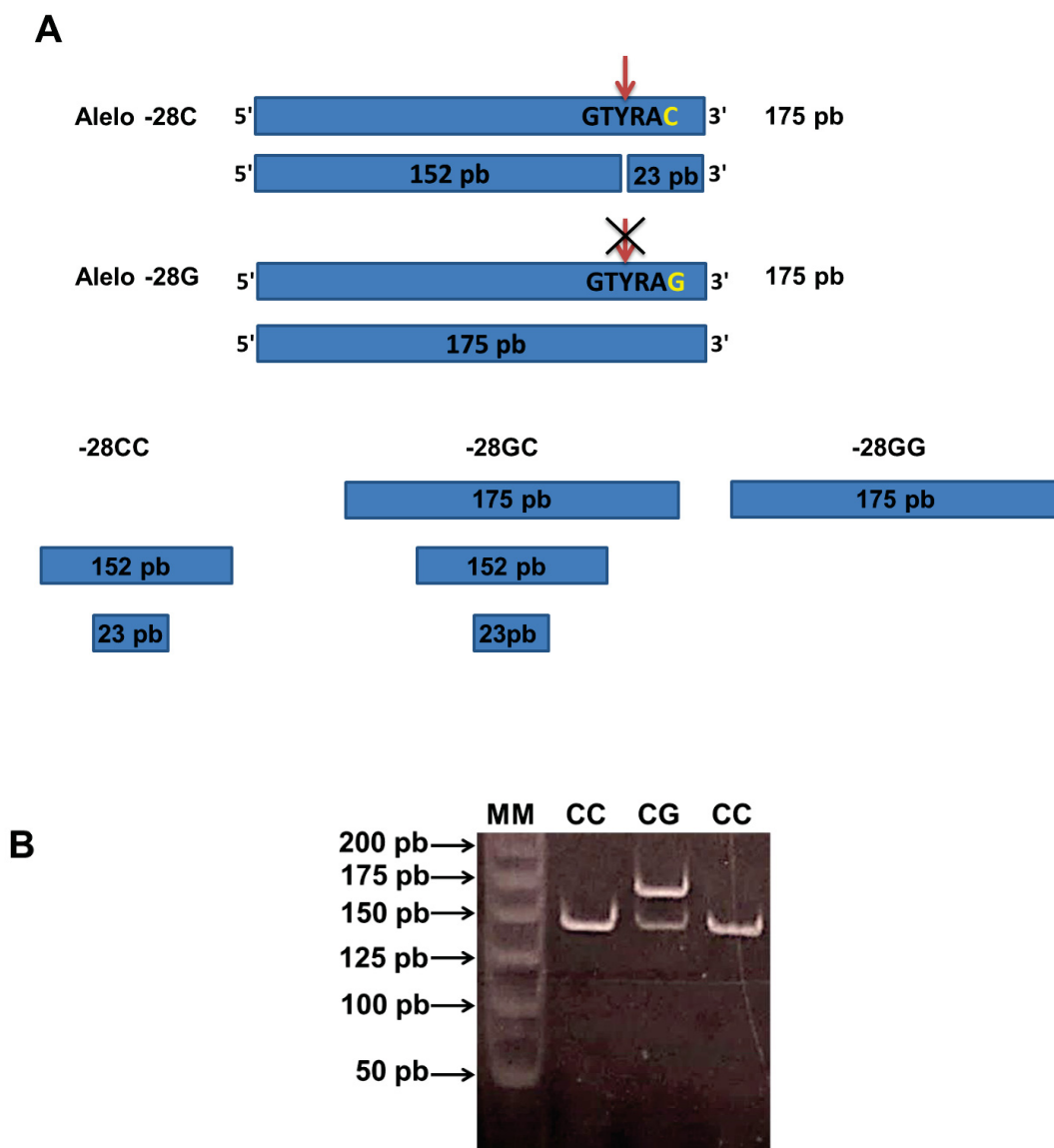


Figura 21 – Genotipagem por RFLP do polimorfismo -28C>G (rs2280788) do gene *RANTES*. **Painel A. Mapa de restrição do produto de PCR.** As setas indicam o sítio de restrição para a enzima *Hinc* II. Os nucleotídeos em amarelo encontram-se na posição -28. Em destaque a ausência do sítio de restrição (x) no alelo G. Quando o alelo G está presente no fragmento de 206 pb não há sítio de restrição para a enzima de restrição *Hinc* II não havendo digestão havendo apenas o fragmento de 175 pb e quando o alelo C está presente a digestão com a enzima de restrição *Hinc* II gera os fragmentos 152 pb e 23 pb. Assim, o indivíduo homocigoto GG apresenta o perfil de restrição apenas com um fragmento correspondente ao produto de PCR (175 pb); o heterocigoto CG com 3 fragmentos (175 pb, 152 pb e 23 pb) e o homocigoto CC com dois fragmentos (152 pb e 23 pb). **Painel B. Perfil eletroforético dos genótipos do polimorfismo -28C>G (rs2280788) na região promotora do gene *RANTES*.** Os fragmentos de restrição foram separados em gel de poliacrilamida (29:1) a 10% em tampão TBE 1X, corados com brometo de etídeo e visualizados sob luz ultra-violeta (302 nm) com imagem capturada em sistema L.PIX (Loccus). Linha MM: marcador de massa molecular de

50 pb, Linhas CC, CG e CC mostram respectivamente os genótipos -28CC, -28CG e -28CC. À esquerda do gel estão indicados com flechas a massa molecular dos fragmentos de 50 pb, 100 pb, 125 pb, 150 pb, 175 pb, e 200 pb do marcador de massa e à direita os fragmentos que podem ser gerados dependendo do genótipo após restrição do produto de PCR com a enzima *Hinc* II.

Fonte: O autor (2018).

As frequências alélicas e genótípicas da variante -28C>G (rs2280788) do gene *RANTES* foram diferentes ($P>0,05$) entre DM2 e controle e entre DM2 e DM1 nos modelos codominante e recessivo, mas não diferiram entre o DM1 e o controle ($P=0,262$) (Tabela 18). As frequências genótípicas do polimorfismo estão de acordo com o esperado pelo equilíbrio de *Hardy-Weinberg* em ambos os grupos.

Tabela 18-. Frequências genótípicas e alélicas do polimorfismo -28C>G (rs2280788) da região promotora do gene *RANTES* para os grupos Controle, DM1 e DM2.

Gene/SNP	Modelo	Genótipos	Saúdáveis			Diabéticos			Valores de P		
			Controle n=354	DM1 n=143	DM2 n=293	C vs DM1	C vs DM2	DM1 vs DM2			
RANTES rs2280788 -28C>G	Codominante	CC	338 (95,5)	133 (93,0)	225 (76,8)	0,262	<0,001	<0,001			
		CG	16 (4,5)	10 (7,0)	66 (22,5)						
		GG	0 (0)	0 (0)	2 (0,7)						
	Frequência Alelo G (%)		2,3	3,5	11,9	0,268	<0,001	<0,001			
	IC 95%		[1-4]	[1-8]	[8-16]						
	Dominante		CC/CG+GG	338/16	133/10	225/68	0,262	<0,001	<0,001		
Recessivo		GG/CC+CG	0/354	0/143	2/291	-	*0,398	*0,814			

Genótipos descritos em n (%). P: probabilidade, Teste do Chi-quadrado ou Teste Exato de Fisher bidirecional. IC 95%: Intervalo de confiança de 95%. *Correção por continuidade de Yates. Todos os grupos estão em equilíbrio de *Hardy-Weinberg* ($P>0,05$), para grupo controle ($P=0,663$), DM1 ($P=0,664$) e DM2 ($P=0,225$).

Fonte: O autor (2018).

A frequência do alelo G no grupo DM2 (O.R. 11,9% - 95% IC, 8–16%) foi superior ($P<0,001$) ao do grupo controle (O.R. 2,3% - 95% IC, 1–4%) e DM1 (O.R. 3,5% - 95% IC, 1–8%), mas similar entre os grupos controle e DM1 ($P=0,268$) (Tabela 18).

A frequência do alelo G foi aproximadamente 5,2 vezes maior no DM2 quando comparado ao controle (11,9% vs 2,3%, respectivamente; $P<0,001$) e 3,4 vezes maior no DM2 quando comparado ao DM1 (11,9% vs 3,5%, respectivamente; $P<0,001$). A razão de chances para o alelo G foi 5,87 (95% IC, 3,37–10,22), ou seja,

indivíduos portadores do alelo G possuem cerca de 6 vezes maior risco em desenvolver DM2. Importante notar que a frequência do alelo G na população estudada é baixa, o que recomenda que este estudo tenha seu tamanho amostral ampliado para confirmar os achados.

Existem muitos estudos indicando que CCL5/RANTES e seu receptor CCR5 estão associados ao DM2 (HERDER *et al.*, 2006, KITADE *et al.*, 2012), intolerância à glicose (KITADE *et al.*, 2012), obesidade (WU *et al.*, 2007, KEOPHIPHATH *et al.*, 2010) e aterosclerose (KUZIEL *et al.*, 2003). Contudo, o papel e o mecanismo das ações de RANTES no funcionamento da insulina e metabolismo da glicose permanecem sob debate devido a controversos resultados. Foi reportado que a deficiência de RANTES em ratos causaria proteção contra recrutamento de macrófagos na inflamação induzida por obesidade (KITADE *et al.*, 2012), e da resistência à insulina e intolerância à glicose sistêmica (KENNEDY *et al.*, 2013). Um dos receptores de RANTES, GPR75 (*G-protein receptor 75*), localizado na membrana celular das células β -pancreáticas, parece estar envolvido com o estímulo da secreção de insulina e melhora da homeostasia da glicose tanto em ratos magros e ratos com resistência à insulina *ob/ob* (LIU *et al.*, 2013, CHOU *et al.*, 2016). Assim, o papel de CCL5/RANTES no DM2 poderia suportar a associação encontrada neste estudo entre o alelo -28G (rs2280788) com o risco para o desenvolvimento do DM2, uma vez que também foi reportado que este polimorfismo estimula a transcrição de RANTES (LIU *et al.*, 1999a, HIZAWA *et al.*, 2002). Adicionalmente, foi demonstrado que a progressão do DM2 está significativamente aumentada em indivíduos com concentrações plasmáticas mais elevadas de RANTES (HERDER *et al.*, 2008). Contudo, como o alelo -28G não é frequente nas populações, com exceção da Asiática (13%) (AN *et al.*, 2002), e nosso tamanho amostral ser relativamente pequeno, para confirmar a associação aqui encontrada entre polimorfismo e o DM2 será necessário replicar o achado em populações com maior número amostral.

Também foi mostrado que RANTES e seu receptor possuem um importante papel no DM1 (ABDI *et al.*, 2002, LOHMANN *et al.*, 2002, CARVALHO-PINTO *et al.*, 2004, CNOP *et al.*, 2005, HANIFI-MOGHADDAM *et al.*, 2006, RAMNATH, BHATIA, 2006). Pflieger e colaboradores (2008) mostraram que as concentrações plasmáticas de RANTES estava diminuídas em pacientes recém-diagnosticados com DM1 em remissão e se associava positivamente com a HbA1c, sugestivo de progressão da

doença. Contudo, não encontramos associação do polimorfismo com o DM1 em concordância com um estudo conduzido na população Holandesa (ZHERNAKOVA *et al.*, 2006).

A frequência para o alelo -28G encontrada para o grupo controle (2,3% - 95% IC, 1–4%) foi similar à encontrada em Holandeses (ZHERNAKOVA *et al.*, 2006), Indianos (MISHRA *et al.*, 2012) e Africanos (MHMOUD *et al.*, 2013); mas inferior à dos Espanhóis (SANCHEZ-CASTANON *et al.*, 2009), Coreanos (JANG *et al.*, 2007a), Japoneses (LIU *et al.*, 1999a, HIZAWA *et al.*, 2002), Chineses Han (QIN *et al.*, 2011) e Chineses (CHU *et al.*, 2007, YAO *et al.*, 2009). O grupo DM1 apresentou frequência do alelo G (3,5% - 95% IC, 1–8%), similar à encontrada em pacientes DM1 Holandeses (ZHERNAKOVA *et al.*, 2006). O grupo DM2 apresentou frequência do alelo G (11,9% - 95% IC, 8–16%) similar à encontrada em pacientes DM2 Japoneses (NAKAJIMA *et al.*, 2003) e diferente de Coreanos (JANG *et al.*, 2007a, JOO *et al.*, 2007) e Alemães (BOGER *et al.*, 2005) (Tabela 19).

Tabela 19 - Comparações entre as frequências genóticas e alélicas do polimorfismo -28C>G (rs2280788) da região promotora do gene *RANTES* com dados da literatura.

Grupo étnico	Características	Genótipos				Alelo (%)
		N	CC	CG	GG	
Euro-brasileiros (Presente estudo)	Controles	354	95,5	4,5	0	2,3
	DM1	143	93,0	7,0	0	3,5
	DM2	293	76,8	22,5	0,7	11,9
Holandeses (ZHERNAKOVA <i>et al.</i> , 2006)	DM1	350	96,0	4,0	0	2,0
	Controles	540	95,0	4,8	0,2	3,0
Chineses Han (QIN <i>et al.</i> , 2011)	AVC	314	75,3	22,4	2,3	13,5
	Controles	389	79,6	19,1	1,27	10,8
Japonesa (HIZAWA <i>et al.</i> , 2002)	Controles	311	78,1	19,9	2,0	11,9
Alemães (BOGER <i>et al.</i> , 2005)	DM2 em diálise	207	96,6	3,4	0	1,4
Coreanos (JANG <i>et al.</i> , 2007a)	DM2 com DAC	176	67	30,7	2,3	17,6
	Controles	416	63,7	32,5	3,8	20,1
Coreanos (JOO <i>et al.</i> , 2007)	DM2 com ND	176	69	28	3	16,5
	DM2	184	68	29	3	16,8
	DM2 (todos)	616	75,3	22,4	2,3	13
Japoneses (NAKAJIMA <i>et al.</i> , 2003)	DM2 normoalbuminúria	355	75	23	2	13
	DM2 microalbuminúria	166	80	18	2	11
	DM2 macroalbuminúria	95	66	30	4	19
Indianos (MISHRA <i>et al.</i> , 2012)	Controles	217	98,6	0,9	0,5	1,0
Indianos (SELVARAJ <i>et al.</i> , 2011)	Controles	212	98,1	1,9	0	0,9
Espanhóis (SANCHEZ-CASTANON <i>et al.</i> , 2009)	Controles	157	89,8	10,2	0	5,1

Chineses (CHU <i>et al.</i> , 2007)	Controles	465	79,6	18,1	2,4	11,4
Africanos (MHMOUD <i>et al.</i> , 2013)	Controles	206	98,1	1,9	0	1,0

Em negrito, dados obtidos deste estudo. DM1: *Diabetes mellitus* tipo 1; DM2: *Diabetes mellitus* tipo 2; AVC: Acidente vascular cerebral; DAC: Doença arterial coronariana; ND: nefropatia diabética. As frequências do alelo A em itálico e negrito estão fora do intervalo de confiança de 95% dos grupos do presente estudo calculados na Tabela 18.

Fonte: O autor (2018).

Os polimorfismos -403G>A (rs2107538) e -28C>G (rs2280788) estão em completo desequilíbrio de ligação (HIZAWA *et al.*, 2002), de forma que apenas 3 haplótipos são observados em vez de quatro, que seriam teoricamente possíveis. Em particular, em um estudo realizado por McDermott e colaboradores, todos os indivíduos com genótipo G/G na posição -403, também apresentaram C/C na posição -28, e todos com GG na posição -28 também apresentaram AA na posição -403, ou seja, não foi encontrado nenhum indivíduo com o haplótipos -403G/-28G (MCDERMOTT *et al.*, 2000). Liu e colaboradores também não encontraram indivíduos com este haplótipos (-403G/-28G) na população. Isto provavelmente ocorra devido à falta de eventos de *cross-over* pela proximidade física dos dois polimorfismos e a forma que estes polimorfismo surgiram na evolução humana. Ou alternativamente, uma explicação menos provável poderia ser que o haplótipo -403G/-28G reduza acentuadamente a aptidão reprodutiva (LIU *et al.*, 1999a).

A frequência dos alelos é diferente entre os pacientes com DM e indivíduos saudáveis (Tabelas 16 e 18). Este estudo indica evidências de que estes polimorfismos no gene *RANTES* estão associados com a susceptibilidade ao DM em uma população Euro-Brasileira.

A associação que foi observada entre os alelos -403A e -28G dos polimorfismos na região promotora de *RANTES* e as concentrações de *RANTES in vitro* suportam a hipótese de que estes *locus* em específico estão envolvidos no desenvolvimento do DM (LIU *et al.*, 1999a, NICKEL *et al.*, 2000, AN *et al.*, 2002, HIZAWA *et al.*, 2002). Quatro sítios de ligação para fator nuclear kappa β localizados na região promotora do gene *RANTES* são críticos para indução das vias co-estimulatórias através de CD28 pelas citocinas pró-inflamatórias, como o fator de necrose tumoral α e interleucina 1 β através de CD28 (MORIUCHI *et al.*, 1997). O polimorfismo -28C>G está localizado imediatamente a jusante do primeiro sítio de ligação para fator nuclear kappa β (-40 a -31). É possível conceber então que baixas concentrações de *RANTES* poderiam conferir proteção contra o desenvolvimento de

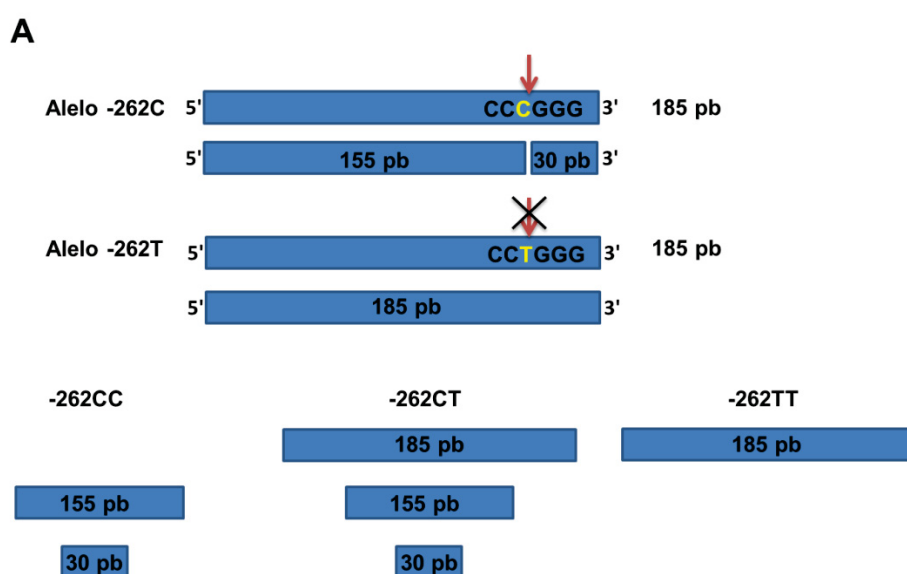
DM1 através da redução de ativação destas vias (ZHERNAKOVA *et al.*, 2006). Além disso, Herder e colaboradores (2006) relataram que as concentrações plasmáticas de RANTES ou CCL5 estavam elevadas em pacientes com tolerância à glicose diminuída, e que a progressão do DM2 foi significativamente maior em indivíduos com maiores concentrações de RANTES.

Contudo, como qualquer associação genética, é teoricamente possível que os polimorfismos -403G>A (rs2107538) e -28C>G (rs2280788) estejam em desequilíbrio de ligação com alelos que estejam causando os efeitos observados. O gene RANTES está localizado em um bloco estendido de elevado desequilíbrio de ligação (DL) com outros seis genes, *MMP28*, *TAF15*, *FLJ32830*, *CCL5*, *LOC440427* e *RAD52B*. Além disso, os genes das quimiocinas CC localizados no telômero de RANTES também estão em DL relativamente forte com RANTES. Um estudo detalhado dessa região é, portanto, necessário para elucidar a contribuição de RANTES para a associação observada.

Ainda os efeitos fenotípicos dos polimorfismos 403G>A e -28C>G e suas interações podem variar de acordo com a origem ambiental e genética, resultando em um sistema complexo de regulação do gene RANTES (HIZAWA *et al.*, 2002).

5.3.3 Polimorfismos no gene CAT

A Figura 22 mostra o perfil eletroforético típico obtido da PCR-RFLP para o polimorfismo -262C>T (rs1001179) localizado no promotor do gene CAT.



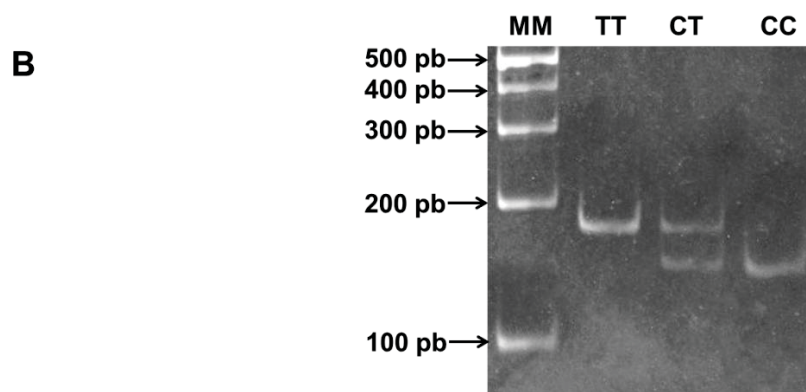


Figura 22 – Genotipagem por RFLP do polimorfismo -262C>T (rs1001179). Painei A. Mapa de restrição do produto de PCR. As setas indicam o sítio de restrição para a enzima *Sma* I. Os nucleotídeos em amarelo encontram-se na posição -262. Em destaque a ausência do sítio de restrição (x) no alelo T. Quando o alelo T está presente no fragmento de 185 pb não há sítio de restrição para a enzima de restrição *Sma* I não havendo digestão havendo apenas o fragmento de 185 pb e quando o alelo C está presente a digestão com a enzima de restrição *Sma* I gera os fragmentos 155 pb e 30 pb. Assim, o indivíduo homocigoto TT apresenta o perfil de restrição apenas com um fragmento correspondente ao produto de PCR (185 pb); o heterocigoto CT com 3 fragmentos (185 pb, 155 b e 30 pb) e o homocigoto TT com dois fragmentos (155 pb e 30 pb). Painei B. Perfil eletroforético dos genótipos do polimorfismo -262C>T (rs1001179) na região promotora do gene *CAT*. Os fragmentos de restrição foram separados em gel de poliacrilamida (29:1) a 10% em tampão TBE 1X, corados com brometo de etídeo e visualizados sob luz ultravioleta (302 nm) com imagem capturada em sistema L.PIX (Loccus). Linha MM: marcador de massa molecular de 100 pb, Linhas TT, CT e CC mostram respectivamente os genótipos -262TT, -262CT e -262CC. À esquerda do gel estão indicados com flechas a massa molecular dos fragmentos de 100 pb, 200 pb, 300 pb, 400 pb e 500 pb do marcador de massa e à direita os fragmentos que podem ser gerados dependendo do genótipo após restrição do produto de PCR com a enzima *Sma* I. Fonte: O autor (2018).

As frequências alélicas e genotípicas da variante -262C>T (rs1001179) do gene *CAT* estão de acordo com o esperado pelo equilíbrio de *Hardy-Weinberg* e difere significativamente entre o grupo controle e o grupo com DM e entre os grupos com DM (Tabela 20). A frequência do alelo T no grupo DM1 (O.R. 31,1% - 95% IC, 26–36%) é superior à do grupo controle (O.R. 16,0% - 95% IC, 13–19%), conferindo risco para o DM1 e no grupo DM2 (O.R. 10,2% - 95% IC, 8–13%) é inferior ao do grupo controle (O.R. 16,0% - 95% IC, 13–19%), conferindo proteção ao DM2.

Tabela 20 - Frequências genotípicas e alélicas do polimorfismo -262C>T (rs1001179) do gene *CAT* para os grupos Controle, DM1 e DM2.

Gene/SNP	Modelo	Genótipos	Saudáveis			Diabéticos			Valores de P		
			Controle n=354	DM1 n=143	DM2 n=293	C vs DM1	C vs DM2	DM1 vs DM2			
CAT rs1001179 -262C>T	Codominante	CC	250 (70,6)	67 (46,8)	238 (81,2)	<0,001	0,008	<0,001			
		CT	95 (26,8)	63 (44,1)	50 (17,1)						
		TT	9 (2,6)	13 (9,1)	5 (1,7)						
	Frequência Alelo T (%)			16,0	31,1	10,2	<0,001	0,003	<0,001		
	IC 95%			[13-19]	[26-36]	[8-13]					
	Dominante	CC/CT+TT	250/104	67/76	238/55	<0,001	0,001	<0,001			
	Recessivo	TT/CC+CT	9/345	13/130	5/288	0,001	0,467	<0,001			

Genótipos descritos em n (%). P: probabilidade, Teste do Chi-quadrado ou Teste Exato de Fisher bidirecional. IC 95%: Intervalo de confiança de 95%.

Todos os grupos estão em equilíbrio de *Hardy-Weinberg* ($P > 0,05$), para grupo controle ($P = 0,994$), DM1 ($P = 0,740$) e DM2 ($P = 0,220$).

Odds ratio DM1, 2,38 (95%IC, 1,73-3,28)

Odds ratio DM2, 0,60 (95%IC, 0,43-0,60) rs1001179

-262C>T

Fonte: O autor (2018).

Diferentes estudos reportam um aumento de marcadores de dano oxidativo e diminuição das defesas antioxidantes no DM1 e DM2 (SLATTER *et al.*, 2000, SHIN *et al.*, 2001, ABOU-SEIF, YOUSSEF, 2004). Embora os mecanismos etiopatogênicos sejam diferentes, o denominador de estresse oxidativo em ambos os casos é o mesmo: hiperglicemia. Assim, pode se esperar níveis de estresse oxidativo equivalentes em ambos os tipos de diabetes.

Entre os polimorfismos do gene da catalase, o mais estudado é o rs1001179 (*CAT* -262C>T), onde ocorre uma troca de bases de Citosina (C) para a Timina (T) na posição -262, sendo responsável pelo aumento da atividade enzimática da catalase (FORSBERG *et al.*, 2001), resultando na conversão aumentada de peróxido de hidrogênio em água e oxigênio. Esta conversão seria otimizada durante situações de estresse oxidativo severo. Deve ser ressaltado que a GPx é a principal enzima anti-oxidante na detoxicação do peróxido de hidrogênio em condições normais. Assim, como no DM ocorre estresse oxidativo severo, a catalase passa a ter papel importante, e, uma vez que a presença do alelo T causaria aumento de sua

atividade, este mecanismo poderia estar subjacente ao nosso resultado que mostra efeito protetor do alelo T para o DM2, mas não justificaria também constituir risco para o DM1. Além disso, foi mostrado que pacientes com DM1 e DM2 apresentam baixas atividades da enzima quando comparados com indivíduos saudáveis (GOTH *et al.*, 2001, TARNAI *et al.*, 2007, RAMAKRISHNA, JAILKHANI, 2008, GOTH *et al.*, 2012). Contudo, Goth e colaboradores (2012) não mostraram diferença de atividade em pacientes com DM1 entre os diferentes genótipos do polimorfismo; e, com relação ao DM2, os pacientes com o genótipo TT apresentaram a menor atividade da enzima, o que não suporta os achados de que o alelo T aumentaria a transcrição do gene *CAT*, e do nosso achado, de que o alelo T teria um efeito protetor DM2 (Tabela 19). Outros estudos reportaram menor atividade da catalase em indivíduos portadores do alelo T (AHN *et al.*, 2005, BASTAKI *et al.*, 2006, PERIANAYAGAM *et al.*, 2007), mas também foi reportado que indivíduos portadores do alelo T apresentariam uma maior atividade da catalase (FORSBERG *et al.*, 2001), bem como mesma atividade entre os diferentes genótipos (MAK *et al.*, 2006). Além disso, foi mostrado que a catalase pode ser inativada na presença de altas concentrações de radicais livre e peróxido de hidrogênio (SCOTT, 2006), o que refletiria o ambiente diabético.

Chistiakov e colaboradores (2004) mostraram que o alelo C está relacionado ao risco para o DM1 em uma população Russa, resultado que não foi replicado por Pask e colaboradores (2006) em várias populações, incluindo a Britânica, Americana, Romena, Norueguesa e Russa. Adicionalmente, a frequência do alelo T na população Russa encontrada por Pask e colaboradores (2006) foi de 25,4%, enquanto que a encontrada por Chistiakov e colaboradores (2004) foi de 55,8%.

Pacal e colaboradores (PACAL *et al.*, 2011) não encontraram diferenças nas frequências alélicas ou genotípicas entre os três grupos de pacientes com DM (Tabela 20) ou entre os pacientes com DM na presença ou ausência de complicações microvasculares, em discordância com nossos achados (Tabela 19).

O polimorfismo -262C>T (rs1001179) do gene *CAT* não foi associado ao DM1 (PASK *et al.*, 2006, FLEKAC *et al.*, 2008, GOTH *et al.*, 2012), DM2 (FLEKAC *et al.*, 2008, GOTH *et al.*, 2012) ou com complicações vasculares do DM1 ou DM2 (FLEKAC *et al.*, 2008) e nem com retinopatia, nefropatia ou doença cardíaca isquêmica no DM2 em trabalhos anteriores (DOS SANTOS *et al.*, 2006).

A frequência para o alelo -262T encontrada para o grupo controle (16,0% - 95% IC, 13–19%), DM1 (31,1% - 95% IC, 26–36%) e DM2 (10,2% - 95% IC, 8–13%) foram inferiores a descrita para populações Caucasoides (Tabela 21).

Tabela 21 – Comparações entre as frequências genotípicas e alélicas do polimorfismo -262C>T (rs1001179) da região promotora do gene CAT com dados da literatura.

Grupo étnico	Características	N	Genótipos			Alelo (%)
			CC	CT	TT	T
Euro-brasileiros (Presente estudo)	Controles	354	70,6	26,8	2,6	16,0
	DM1	143	46,8	44,1	9,1	31,1
	DM2	293	81,2	17,1	1,7	10,2
Britânicos	DM1	352	60,1	34,2	5,7	22,7
Americanos	Controles	407	62,3	33,1	4,6	21,0
	DM1	221	60,2	34,4	5,4	22,6
Noruegueses	Controles	244	62,7	31,8	5,6	21,5
	DM1	116	60,6	34,2	5,3	22,4
Romanos	Controles	111	59,1	36,0	4,9	22,4
	DM1	62	60,9	35,8	3,3	21,0
(PASK <i>et al.</i> , 2006)	Controles	48	58,5	34,4	7,1	25,0
República Checa (PACAL <i>et al.</i> , 2011)	DM1 crianças		47,8	52,2	0,0	26,1
	DM1 adultos		58,1	32,6	9,3	25,6
	DM2		53,1	44,9	2,0	24,5
Húngaros (GOTH <i>et al.</i> , 2012)	DM1	50	30,0	42,0	20,0	49,0
	DM2	105	41,0	36,0	23,0	40,0
Eslovenos (PETROVIC, 2014)	Controles	162	36,0	47,0	17,0	41,0
	DM2 com hipertensão	622	58,5	34,7	6,8	24,1
HapMap-CEU CAUC1	DM2 sem hipertensão	188	56,4	37,8	5,8	24,7
	Europeus	226	54,9	40,7	4,4	24,8
Russa (CHISTIYAKOV <i>et al.</i> , 2004)	Caucasianos	62	58,1	38,7	3,2	22,6
	DM1	247	32,0	49,4	18,6	43,3
Sueca (FORSBERG <i>et al.</i> , 2001)	Controles	258	19,4	49,6	31,0	55,8
	Controles	54	52	39	9	28,0
Euro Brasileiros (DOS SANTOS <i>et al.</i> , 2006)	DM2 com retinopatia	164	63	34	3	20
	DM2 sem retinopatia	310	66	29	5	19
	DM2 com nefropatia	193	64	33	3	20
	DM2 sem nefropatia	258	66	29	5	20
	DM2 com DCI	168	69	27	4	18
	DM2 sem DCI	176	61	35	4	21

Em negrito, dados obtidos neste estudo: DM1: *Diabetes mellitus* tipo 1; DM2: *Diabetes mellitus* tipo 2; DCI: Doença cardíaca isquêmica. As frequências do alelo T em itálico e negrito estão fora do intervalo de confiança de 95% dos grupos do presente estudo calculados na Tabela 20.

Fonte: O autor (2018).

A frequência do alelo T para o grupo DM2 foi inferior a descrita para outra população Euro-Brasileira do Rio Grande do Sul na presença ou ausência de complicações diabéticas (DOS SANTOS *et al.*, 2006), e também foi inferior a descrita para população Sueca (FORSBERG *et al.*, 2001) e Russa (CHISTIYAKOV *et al.*, 2004).

Pask e colaboradores (2006) sugerem que a associação encontrada por Chistiakov e colaboradores (2004) possa ser um falso positivo, uma vez que é esperado que estudos com número amostral pequeno possuam uma probabilidade muito pequena de detectar uma associação em doenças multifatoriais como o DM1 (THOMAS,CLAYTON, 2004, WACHOLDER *et al.*, 2004, CORDELL,CLAYTON, 2005, WANG *et al.*, 2005). Contudo, não é possível excluir o efeito do alelo T ou alelo C na susceptibilidade do DM1 ou DM2, respectivamente, como consequência de diferenças fenotípicas, background genético e população estudada. Desta forma, mais estudos serão necessários para elucidar o papel deste polimorfismo na patogênese do diabetes.

5.3.4 Polimorfismos no gene *MMP9*

A Figura 23 mostra o perfil eletroforético típicos obtidos da PCR-RFLP para o polimorfismo -1562C>T (rs3918242) localizado no promotor do gene *MMP9*.

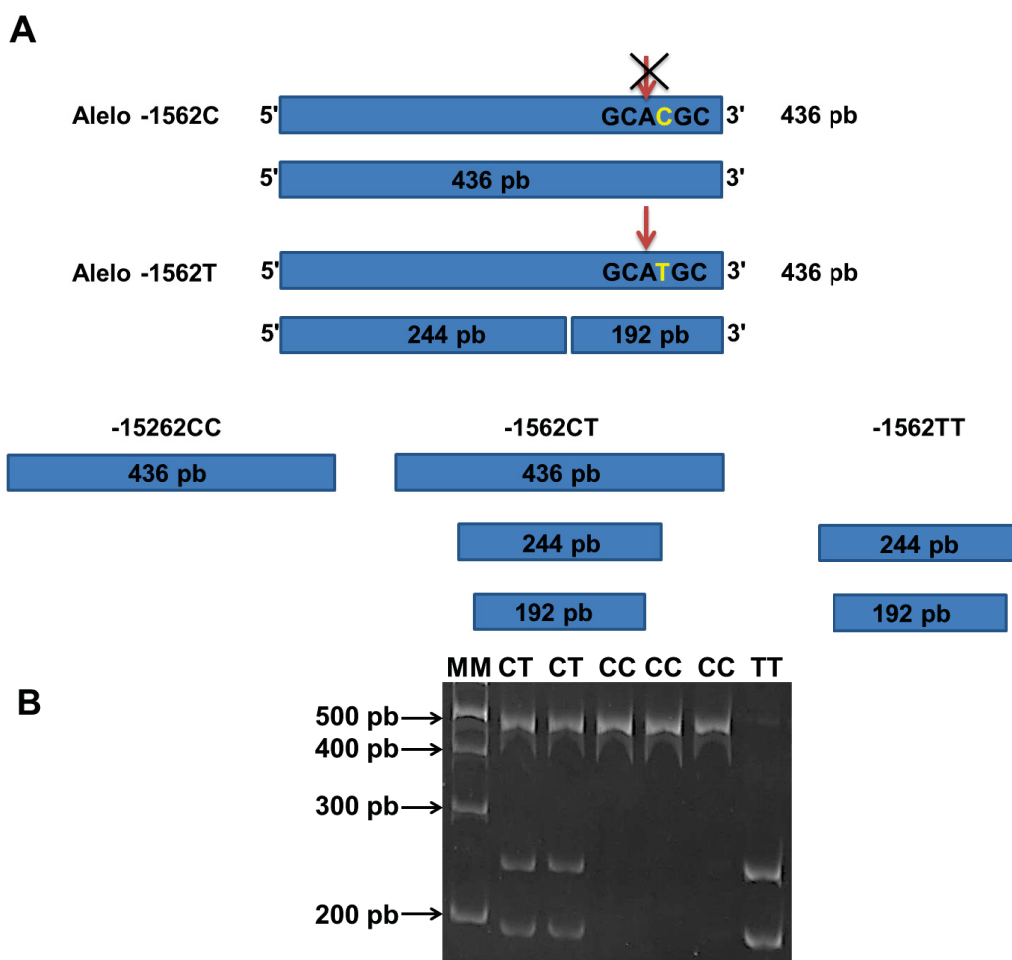


Figura 23 – Genotipagem por RFLP do polimorfismo -1562C>T (rs3918242) do gene *MMP9*. Painel A. Mapa de restrição do produto de PCR. As setas indicam o sítio de restrição para a

enzima *Sph* I. Os nucleotídeos em amarelo encontram-se na posição -1562. Em destaque a ausência do sítio de restrição (x) no alelo C. Quando o alelo C está presente no fragmento de 436 pb não há sítio de restrição para a enzima de restrição *Sph* I não havendo digestão, havendo apenas o fragmento de 436 pb e quando o alelo T está presente a digestão com a enzima de restrição *Sph* I gera os fragmentos 244 pb e 192 pb. Assim, o indivíduo homocigoto CC apresenta o perfil de restrição apenas com um fragmento correspondente ao produto de PCR (436 pb); o heterocigoto CT com 3 fragmentos (436 pb, 244 b e 192 pb) e o homocigoto TT com dois fragmentos (244 pb e 192 pb). **Painel B. Perfil eletroforético dos genótipos do polimorfismo -1562C>T (rs3918242) na região promotora do gene *MMP9*.** Os fragmentos de restrição foram separados em gel de poliacrilamida (29:1) a 10% em tampão TBE 1X, corados com brometo de etídeo e visualizados sob luz ultravioleta (302 nm) com imagem capturada em sistema L.PIX (Loccus). Linha MM: marcador de massa molecular de 100 pb, Linhas CT, CT, CC, CC, CC e TT mostram respectivamente os genótipos -1562CT, -1562CT, -1562CC, -1562CC, -1562CC e -1562TT. À esquerda do gel estão indicados com flechas a massa molecular dos fragmentos de 200 pb, 300 pb, 400 pb e 500 pb do marcador de massa e à direita os fragmentos que podem ser gerados dependendo do genótipo após restrição do produto de PCR com a enzima *Sph* I.
Fonte: O autor (2018).

As frequências alélicas e genotípicas da variante -1562C>T (rs3918242) do gene *MMP9* estão de acordo com o esperado pelo equilíbrio de *Hardy-Weinberg* em ambos os grupos. Não houve diferença significativa das frequências alélicas e genotípicas entre os grupos controle e DM2, DM1 e DM2. Contudo, a frequência do alelo T no grupo DM1 foi marginalmente superior do grupo controle (P=0,049) e também houve diferença significativa entre as frequências genotípicas no modelo recessivo (P=0,040) (Tabela 22).

Tabela 22 - Frequências genotípicas e alélicas do polimorfismo -1562C>T (rs3918242) da região promotora do gene *MMP-9* para os grupos Controle, DM1 e DM2.

Gene/SNP	Modelo	Genótipos	Saudáveis			Diabéticos		Valores de P	
			Controle n=354	DM1 n=143	DM2 n=293	C vs DM1	C vs DM2	DM1 vs DM2	
MMP9 rs3918242 -1562C>T	Codominante	CC	308 (87,0)	114 (79,7)	250 (85,3)	0,119	0,824	0,323	
		CT	44 (12,4)	28 (19,6)	41 (14,0)				
		TT	2 (0,6)	1 (0,7)	2 (0,7)				
		Frequência Alelo T(%)	6,8	10,5	7,7	0,049	0,532	0,164	
	IC 95%	[5-9]	[7-14]	[6-10]					
	Dominante	CC/CT+TT	308/46	114/29	250/43	0,040	0,536	0,139	
	Recessivo	TT/CC+CT	2/352	1/142	2/291	0,861	0,849	0,984	

Genótipos descritos em n (%). P: probabilidade, Teste do Chi-quadrado ou Teste Exato de Fisher bidirecional. IC 95%: Intervalo de confiança de 95%. Todos os grupos estão em equilíbrio de *Hardy-Weinberg* (P>0,05), para grupo controle (P=0,753), DM1 (P=0,609) e DM2 (P=0,822). Odds Ratio DM1, 1,61 (95%IC, 1,00–2,60).Fonte: O autor (2018).

Singh e colaboradores (SINGH *et al.*, 2013) mostraram associação do alelo -1562T com o DM2 em uma população Indiana. Este polimorfismo também foi associada à micro angiopatia diabética (WANG *et al.*, 2010) e nefropatia diabética (FENG *et al.*, 2016, SINGH *et al.*, 2017), mas não ao DM2 (PLESKOVIC *et al.*, 2017), em concordância com nosso estudo que não encontrou esta correlação.

As metaloproteases têm papel em vários processos patológicos, incluindo inflamação e uma variedade de doenças autoimunes, incluindo Lúpus eritematoso, síndrome de Sjogren e artrite reumatoide. A MMP-9 possui papel primário quanto secundário em cada uma destas doenças autoimunes através de sua regulação positiva ou negativa. Não é expressa constantemente, pelo contrário, é induzida ou suprimida por muitas moléculas regulatórias (RAM *et al.*, 2006). Foi mostrado que o polimorfismo -1562C>T afeta a atividade do promotor de MMP-9 *in vivo* (BLANKENBERG *et al.*, 2003, MEDLEY *et al.*, 2004) e *in vitro* (ZHANG *et al.*, 1999, YE, 2006), e que este efeito é traduzido em diferenças tanto em nível de atividade como de concentrações plasmáticas de MMP-9 em indivíduos com diferentes genótipos (BLANKENBERG *et al.*, 2003, MEDLEY *et al.*, 2004).

No presente estudo nós encontramos uma associação marginal entre o alelo -1562T e o DM1, o qual aumenta a transcrição de MMP-9 (ZHANG *et al.*, 1999, YE, 2006) e concentrações elevadas de MMP9 têm sido associadas com doenças autoimunes (VANDOOREN *et al.*, 2013). Além disso, tem sido sugerido que a MMP9 é um fator diabetogênico através da clivagem proteolítica da insulina e geração de peptídeos de insulina imunodominantes, desencadeando assim uma resposta autoimune (OPDENAKKER, VAN DAMME, 1994, DESCAMPS *et al.*, 2003).

A frequência do alelo -1562T encontrada para o grupo controle (O.R. 6,8% - 95% IC, 5–9%) e no DM2 (O.R. 7,7% - 95% IC, 6–10%) foi inferior a descrita para as populações Asiáticas, Africanas e Grega, mas similar a descrita para a população Brasileira (Tabela 23). Não foi encontrada na literatura a frequência do polimorfismo para indivíduos com DM1.

Tabela 23 - Comparações entre as frequências genótípicas e alélicas do polimorfismo -1562C>T (rs3918242) da região promotora do gene *MMP-9* com dados da literatura.

Grupos étnicos	Características	Genótipos				Alelo (%)
		N	CC	CT	TT	T
Euro-brasileiros (Presente estudo)	Controle	354	87,0	12,4	0,6	6,8
	DM1	143	79,7	19,6	0,7	10,5
	DM2	293	85,3	14,0	0,7	7,7
Indianos (SINGH <i>et al.</i> , 2013)	DM2	353	57,8	38,8	3,4	22,8
PGA-AFRICAN-PANEL	Controles	267	73,4	25,8	0,7	13,7
CGP-ASIAN-PANEL	Africanos	48	66,7	29,2	4,2	18,7
Chineses (FENG <i>et al.</i> , 2016)	Asiáticos	46	78,3	17,4	4,3	13,0
	DM2 sem nefropatia	142	45,1	21,1	33,8	47,2
	DM2 com nefropatia	168	60,1	22,0	17,9	29,2
Indianos (SINGH <i>et al.</i> , 2017)	Controles	100	45	13	42	47
	DM2	149	69,8	29,5	0,7	15,4
Iranianos (MAHMOODI <i>et al.</i> , 2017)	Controles	325	73,6	25,5	0,9	13,7
	DAC	100	68,0	27,0	5,0	18,5
Chineses (WANG <i>et al.</i> , 2010)	Controles	100	72,0	26,0	2,0	15,0
	DM2 com micro angiopatia	160	60,0	31,3	8,8	24,1
	DM2 sem micro angiopatia	160	76,3	21,3	2,5	13,1
Gregos (MAKRYGIANNIS <i>et al.</i> , 2018)	Controles	160	77,5	21,3	1,3	11,9
	AAA	175	76	23	1,0	13,0
Brasileiros (RITTER <i>et al.</i> , 2018)	Controles	166	80	19	1,0	11,0
	Hipertensos obesos	63	87	13	0	6
Brasileiros (RECH <i>et al.</i> , 2016)	Hipertensos não obesos	57	90	9	1	6
	Esclerose sistêmica	98	84,8	14,1	1,1	8,2
	Controles	100	84,0	16,0	0,0	8,0

Em negrito, dados obtidos neste estudo: DM1: *Diabetes mellitus* tipo 1; DM2: *Diabetes mellitus* tipo 2; DAC: Doença Arterial Coronariana; AAA: Aneurisma aórtico abdominal. As frequências do alelo T em itálico e negrito estão fora do intervalo de confiança de 95% dos grupos do presente estudo calculados na Tabela 22.

Fonte: O autor (2018).

5.3.5 Polimorfismos no gene EGFR

A Figura 24 mostra o perfil eletroforético típicos obtidos da PCR-RFLP para o polimorfismo 142285G>A (rs2227983) localizado no gene *EGFR*.

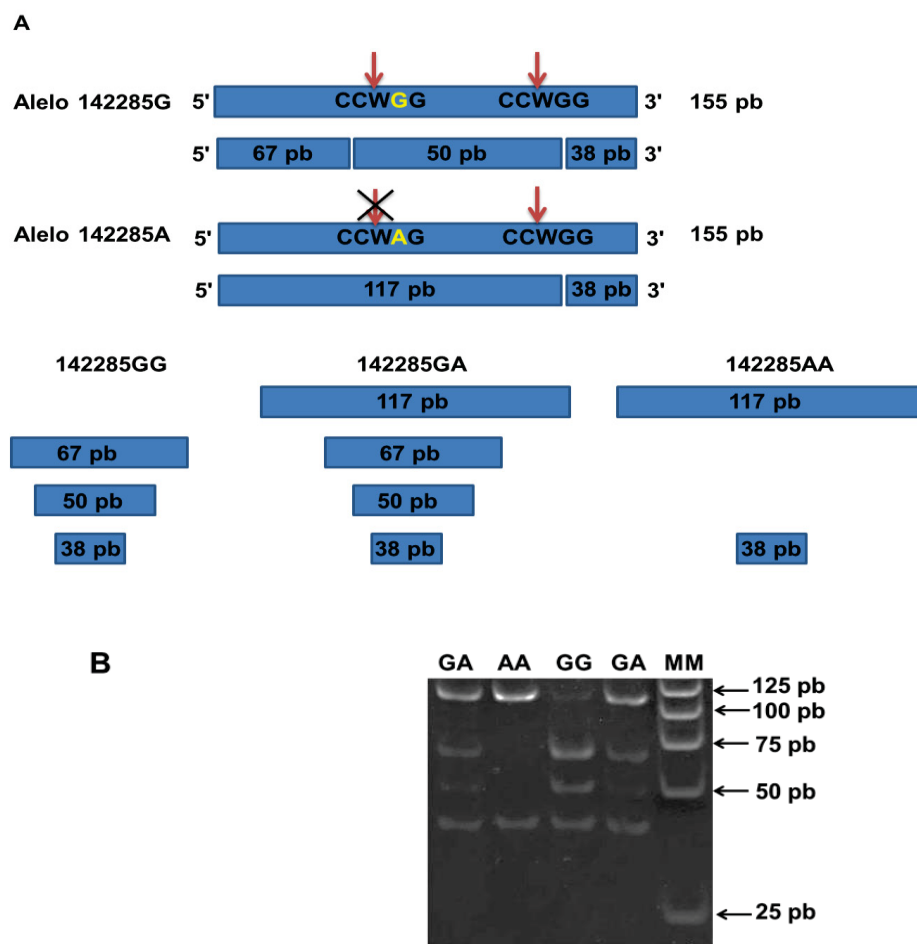


Figura 24 – Genotipagem por RFLP do polimorfismo 142285G>A (rs2227983) do gene *EGFR*.. **Painel A. Mapa de restrição do produto de PCR.** As setas indicam os sítios de restrição para a enzima *BstN* I. Os nucleotídeos em amarelo encontram-se na posição 142285. Em destaque a ausência do sítio de restrição (x) no alelo 142285A. Quando o alelo G está presente no fragmento de 155 pb a digestão com a enzima de restrição *BstN* I gera os fragmentos 67 pb, 50 pb e 38 pb, quando o alelo A está presente a digestão com a enzima de restrição *BstN* I gera os fragmentos 117 pb e 38 pb. Assim, o indivíduo homocigoto GG apresenta o perfil de restrição com 3 fragmentos (67 pb, 50 pb e 38 pb); o heterocigoto GA com 4 fragmentos (117 pb, 67 pb, 50 pb e 38 pb) e o homocigoto AA com dois fragmentos (117 pb e 38 pb). **Painel B. Perfil eletroforético dos genótipos do polimorfismo 142285G>A (rs2227983) no exon 3 do gene *EGFR*.** Os fragmentos de restrição foram separados em gel de poliacrilamida (29:1) a 10% em tampão TBE 1X, corados com brometo de etídeo e visualizados sob luz ultravioleta (302 nm) com imagem capturada em sistema L.PIX (Loccus). Linha MM: marcador de massa molecular de 25 pb. As linhas GA, AA, GG e GA mostram respectivamente, os perfis de restrição para os genótipos 142285GA, 142285AA, 142285GG e 142285GA. À direita do gel estão indicados com flechas a massa molecular dos fragmentos de 25 pb, 50 pb, 75 pb, 100 pb e 125 pb do marcador de massa e à esquerda os fragmentos que podem ser gerados dependendo do genótipo após restrição do produto de PCR com a enzima *BstN* I.
Fonte: O autor (2018).

As frequências alélicas e genóticas da variante 142285G>A (rs2227983) do gene *EGFR* estão de acordo com o esperado pelo equilíbrio de *Hardy-Weinberg* e não diferiram significativamente entre os grupos em estudo (Tabela 24).

Tabela 24 – Frequências genótípicas e alélicas do polimorfismo 142285G>A (rs2227983) da região do exon 13 do gene *EGFR* para os grupos Controles, DM1 e DM2.

Gene/SNP	Modelo	Genótipos	Saudáveis			Diabéticos			Valores de P		
			Controle n=354	DM1 n=143	DM2 n=293	C vs DM1	C vs DM2	DM1 vs DM2			
EGFR rs2227983 142285G>A	Codominante	GG	(202) 57,1	(78) 54,5	(157) 53,6	0,866	0,643	0,906			
		GA	(123) 34,7	(52) 36,4	(112) 38,2						
		AA	(29) 8,2	(13) 9,1	(24) 8,2						
	Frequência Alelo A (%)			25,6	27,3	27,3	0,578	0,479	0,992		
	IC 95%			[22-29]	[22-32]	[24-31]					
	Dominante	GG/GA+AA	202/152	78/65	157/136	0,608	0,375	0,850			
	Recessivo	AA/GG+GA	29/325	13/130	24/269	0,744	0,996	0,751			

Genótipos descritos em n (%). P: probabilidade, Teste do Chi-quadrado ou Teste Exato de Fisher bidirecional. IC 95%: Intervalo de confiança de 95%. Todos os grupos estão em equilíbrio de *Hardy-Weinberg* ($P>0,05$), para grupo controle ($P=0,101$), DM1 ($P=0,319$) e DM2 ($P=0,525$). Fonte: O autor (2018).

Existem muitas evidências que suportam o papel da ativação de EGFR e sinalização na patogenicidade de malignidades (LIN *et al.*, 2001, YARDEN, 2001, ARTEAGA, 2002, JORISSEN *et al.*, 2003, BIANCO *et al.*, 2007). Recentemente foi mostrado que a interconexão entre DM e certos tipos de câncer ocorre através da geração de AGEs e sua interação com RAGE (Hu and Cheng 2013, Sharaf, Matou-Nasri *et al.* 2015, Matou-Nasri, Sharaf *et al.* 2017, Takata, Ueda *et al.* 2017), e que o aumento intracelular de ROS mediado pela interação de AGE com RAGE aumenta a fosforilação de EGFR e proteínas ERK1/2, induzindo mitogênese (Chen *et al.*, 2010). Também foi detectado autoanticorpos contra EGFR em doenças autoimunes (BERNATSKY *et al.*, 2005), sugerindo ligação entre a imunologia de doenças autoimunes e tumorais em relação a EGFR. Assim, polimorfismos no gene *EGFR* poderiam estar associados ao risco para o desenvolvimento do DM, contudo esta hipótese não foi suportada por nossos resultados.

A frequência do alelo A no grupo controle (O.R. 5,6% - 95% IC, 22–29%) foi inferior a descrita para a população Chinesa, mas similar à descrita para Tunisiana e Egípcia (Tabela 25). Não foi encontrado na literatura a frequência do polimorfismo para indivíduos com DM1 e DM2.

Tabela 25 - Comparações entre as frequências genóticas e alélicas do polimorfismo 142285G>A (rs2227983) da região do exon 13 do gene *EGFR* com dados da literatura.

Grupos étnicos	Características	N	Genótipos			Alelo (%)
			GG	GA	AA	A
Euro-brasileiros (Presente estudo)	Controles	354	57,1	34,7	8,2	25,6
	DM1	143	54,5	36,4	9,1	27,3
	DM2	293	53,6	38,2	8,2	27,3
Chineses (HUANG <i>et al.</i> , 2017)	Controles	326	20,8	53,1	26,1	52,6
Han Chineses (ZHANG <i>et al.</i> , 2013)	Controles	386	30,1	53,1	16,8	43,4
Egípcios (ABDRABOH <i>et al.</i> , 2013)	Controles	86	55,8	41,9	2,3	23,3
Chineses (GUO <i>et al.</i> , 2016)	AP com metástase pleural	432	40,5	47,5	12,0	35,8
	AP sem metástase pleural	424	25,2	51,4	23,4	49,1
Tunisianos (REBAI <i>et al.</i> , 2009)	Controles	302	57,6	32,5	9,9	25,7
Chineses Han (LO <i>et al.</i> , 2012)	Câncer de Tireoide	106	55,7	38,7	5,6	25,9
	Artrite reumatoide	188	16,5	51,6	31,9	57,7
Amsterdã	Controles	128	21,1	55,5	23,4	51,2
Brasileiros (SOBRAL-LEITE <i>et al.</i> , 2017)	Câncer de mama	255	58,4	34,2	7,5	24,5
	Câncer de mama	288	66,7	27,8	5,6	19,4

Em negrito, dados obtidos neste estudo: DM1: *Diabetes mellitus* tipo 1; DM2: *Diabetes mellitus* tipo 2; AP: Adenocarcinoma pulmonar. As frequências do alelo A em itálico e negrito estão fora do intervalo de confiança de 95% dos grupos do presente estudo calculados na Tabela 24.

Fonte: O autor (2018).

5.4 Associação dos Polimorfismos com Biomarcadores

Todos os polimorfismos em estudo foram avaliados para possível associação com os biomarcadores. Os parâmetros utilizados foram IMC, glicemia, HbA1c, 1,5-AG, ureia, creatinina, ácido úrico, proteínas totais, albumina, colesterol total, LDL-colesterol, HDL-colesterol e triglicérides. Aqueles biomarcadores que apresentaram ANOVA significativa ($P < 0,05$) com os genótipos de um polimorfismo foram avaliados com o teste Post-hoc de Tuckey (para tamanhos amostrais desiguais).

O único polimorfismo que apresentou associação significativa entre os genótipos e biomarcadores foi o rs1800624 do gene *RAGE* com o colesterol total e com o LDL-colesterol como mostrado na Figura 25.

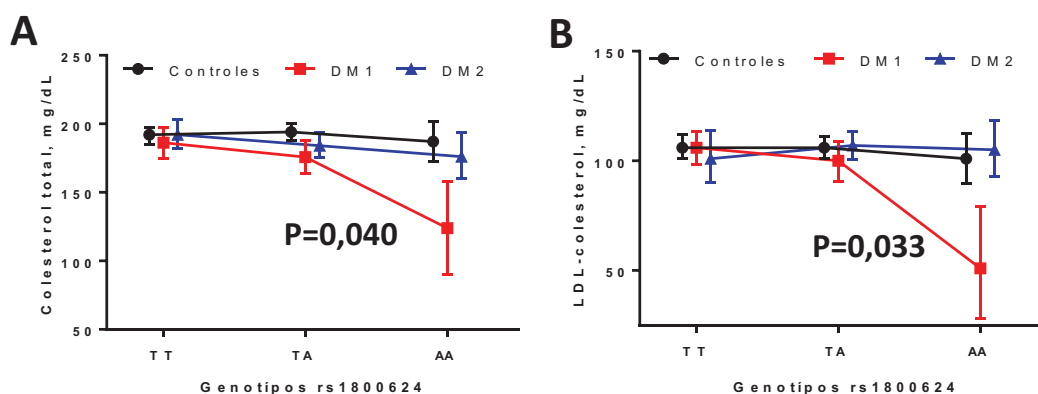


Figura 25 - Relação entre genótipos do rs1800624 de RAGE e colesterol total e LDL-colesterol. A. Colesterol total e B. LDL-colesterol. Os valores são médias e as barras verticais o Intervalo de Confiança de 95%. Colesterol ANOVA ($P=0,004$) e LDL-c ANOVA ($P=0,001$). Comparações entre os genótipos e biomarcadores para o grupo controle saudável e diabéticos tipo 2 (DM2) não foram significativas ($P>0,05$). Probabilidade, corrigida por Tuckey, para as comparações entre os genótipos TT e AA, estão mostrados nas Figuras A e B. Comparações entre TT e TA ($P>0,05$)
Fonte: O autor (2018).

Como observado na Figura 25, pacientes com DM1 portadores do genótipo AA (homozigose) do polimorfismo rs1800624 do gene RAGE, apresentaram uma redução significativa do colesterol total (33%) e redução (51%) da principal forma de transporte do colesterol no plasma, a lipoproteína de baixa densidade (LDL-colesterol) quando comparados aos portadores do genótipos TT. Este efeito não foi observado para pacientes com DM2.

O gene *RAGE* está localizado na região do complexo maior de histocompatibilidade (MHC) no cromossoma 6, um região densa em genes (SUGAYA *et al.*, 1994).

A presença do alelo A na região promotora de RAGE condiciona a um incremento na transcrição da ordem de três vezes em relação ao alelo T em homozigose da proteína RAGE (HUDSON *et al.*, 2001a). O genótipo AA do rs1800624 (-374T>A) de RAGE, foi associado à proteção da severidade da doença cardiovascular em pacientes com DM2 (PICHETH *et al.*, 2007a), e o caráter protetor também descrito em outros estudos (SANTOS *et al.*, 2005, FALCONE *et al.*, 2007, BOIOCCHI *et al.*, 2011, KAWAI *et al.*, 2013, TRIPATHI *et al.*, 2014). O efeito observado, de redução do colesterol sérico, aponta para uma redução de risco para doença cardiovascular. Portanto, o genótipo AA do -374T>A de RAGE, tem seu efeito “protetor” à complicações cardiovasculares do diabetes reforçada com as observações identificadas neste projeto.

O desenho experimental não permite análise aprofundada da observada associação do genótipo -374AA com a redução do colesterol total e do LDL-c. Também não é possível descartar que o efeito observado possa ser resultante do tamanho amostral, adequado apenas para estudos de prospecção do polimorfismo com o DM.

Uma análise da literatura, também não contempla descrições da associação ora descrita.

Nossa hipótese fica centrada na possibilidade do polimorfismo rs1800624 (-374T>A) de *RAGE* estar em desequilíbrio de ligação com outro gene ou mesmo outros genes, sendo estes os responsáveis pelo efeito observado. Certamente, o efeito observado deve ser explorado em novo projeto, com maior tamanho amostral, para confirmar o achado neste estudo.

6 CONCLUSÕES

- Concentrações séricas de 1,5-anidroglicitol ($>15 \mu\text{g/mL}$) discriminam indivíduos com DM2 (AUC 0,573, $P<0,001$) de normoglicêmicos saudáveis com sensibilidade 65% e especificidade 91%, perfil de discriminação similar à glicemia em jejum ($> 113 \text{ mg/dL}$).
- A concentração de hemoglobina glicada (HbA1c $>5,8\%$) foi o biomarcador que melhor discriminou indivíduos com DM2 (AUC 0,815; $P<0,001$) de normoglicêmicos saudáveis com sensibilidade 87% e especificidade 94%.
- O alelo A do polimorfismo rs1800624 (-374T>A) do gene *RAGE* foi associado à proteção ($P=0,023$) do DM1 (OR 0,69; 95%IC, 0,51–0,95).
- O alelo C do polimorfismo rs1800625 (-429T>C) do gene *RAGE* foi associado a maior risco ($P=0,045$) para o DM1 (OR 1,54; 95%IC, 1,01–2,34).
- Os polimorfismos de *RAGE* (63Del e rs2070600), respectivamente da região promotora e do exon 3, não foram associados DM1 ou DM2.
- O alelo G do polimorfismo rs2280788 (-28C>G) de *RANTES* foi associado ao aumento do risco ($P=0,003$) para o DM2 (OR 5,78, 95%IC, 3,37-10,22).
- O alelo A do polimorfismo rs2107538 (-403G>A) de *RANTES* foi associado ao aumento do risco ($P=0,003$) para o DM1 (OR 1,55; 95%IC, 1,15-2,07).
- O alelo T do polimorfismo rs1001179 (-262C>T) do gene *CAT* apresentou associação diferenciada quanto ao risco e o tipo de DM em estudo. No DM1, foi associado ($P<0,001$) ao risco (OR, 2,38; 95%IC, 1,73-3,28) e no DM2 como fator de proteção associado ($P=0,003$); (OR 0,60; 95%IC, 0,43-0,60).
- O alelo T do polimorfismo rs3918242 (-1562C>T) do gene *MMP9* foi associado ($P= 0,049$) ao maior risco para o DM1 (OR 1,61; 95%IC 1,00-2,60).

- O polimorfismo rs2227983 (142285G>A) do gene *EGFR* não foi associado ao diabetes.
- A frequência do alelo de menor frequência (“alelo raro”) para o grupo controle nos polimorfismos em estudo, no geral, foi similar ao observado a outras populações Caucásicas.
- O alelo A em homozigose do polimorfismo rs1800624 (-374T>A) do gene RAGE foi associado à redução no colesterol total e LDL-colesterol em DM1.

REFERÊNCIAS

ABBASI, A., *et al.* **Role of HDL cholesterol and estimates of HDL particle composition in future development of type 2 diabetes in the general population: the PREVEND study.** J Clin Endocrinol Metab 98(8): E1352-1359,2013.

ABDEL-AZEEZ, H. A.ÉA. M. EL-OKELY. **Association of the receptor for advanced glycation end products (RAGE) -374 T/A gene polymorphism and circulating soluble RAGE with nephropathy in type 1 diabetic patients.** Egypt J Immunol 16(1): 95-106,2009.

ABDI, R., *et al.* **The role of CC chemokine receptor 5 (CCR5) in islet allograft rejection.** Diabetes 51(8): 2489-2495,2002.

ABDRABOH, N. R., *et al.* **HER1 R497K and HER2 I655V polymorphisms are linked to development of breast cancer.** Dis Markers 34(6): 407-417,2013.

ABDUL-GHANI, M. A., *et al.* **Insulin secretion and action in subjects with impaired fasting glucose and impaired glucose tolerance: results from the Veterans Administration Genetic Epidemiology Study.** Diabetes 55(5): 1430-1435,2006a.

ABDUL-GHANI, M. A., *et al.* **Contributions of beta-cell dysfunction and insulin resistance to the pathogenesis of impaired glucose tolerance and impaired fasting glucose.** Diabetes Care 29(5): 1130-1139,2006b.

ABOU-SEIF, M. A.ÉA. A. YOUSSEF. **Evaluation of some biochemical changes in diabetic patients.** Clin Chim Acta 346(2): 161-170,2004.

ADA. **Type 2 diabetes in children and adolescents.** American Diabetes Association. Diabetes Care 23(3): 381-389,2000.

ADA. **Diagnosis and classification of diabetes mellitus.** Diabetes Care 37 Suppl 1: S81-90,2014.

ADA. **Standards of Medical Care in Diabetes - 2018.** Diabetes Care 41(1): 172,2018.

ADLER, A. I., *et al.* **Development and progression of nephropathy in type 2 diabetes: the United Kingdom Prospective Diabetes Study (UKPDS 64).** Kidney Int 63(1): 225-232,2003.

ADLER, A. I., *et al.* **Association of systolic blood pressure with macrovascular and microvascular complications of type 2 diabetes (UKPDS 36): prospective observational study.** *BMJ* 321(7258): 412-419,2000.

AHLQVIST, E., *et al.* **Genetics of type 2 diabetes.** *Clin Chem* 57(2): 241-254,2011.

AHLUWALIA, T. S., *et al.* **Common variants of inflammatory cytokine genes are associated with risk of nephropathy in type 2 diabetes among Asian Indians.** *PLoS One* 4(4): e5168,2009.

AHN, J., *et al.* **Associations between breast cancer risk and the catalase genotype, fruit and vegetable consumption, and supplement use.** *Am J Epidemiol* 162(10): 943-952,2005.

AKAHANE, M., *et al.* **Association of the polymorphisms of chemokine genes (IL8, RANTES, MIG, IP10, MCP1 and IL16) with the pathogenesis of autoimmune thyroid diseases.** *Autoimmunity* 49(5): 312-319,2016.

AKIRAV, E., *et al.* **Beta-cell mass and type 1 diabetes: going, going, gone?** *Diabetes* 57(11): 2883-2888,2008.

AKTER, S., *et al.* **Smoking and the risk of type 2 diabetes in Japan: A systematic review and meta-analysis.** *J Epidemiol* 27(12): 553-561,2017.

ALVARENGA, M. A., *et al.* **[Cardiovascular assessment of diabetic patients].** *Arq Bras Endocrinol Metabol* 51(2): 281-284,2007.

AMERICAN DIABETES, A. **Standards of medical care in diabetes--2012.** *Diabetes Care* 35 Suppl 1: S11-63,2012.

AMERICAN DIABETES, A. **15. Diabetes Advocacy: Standards of Medical Care in Diabetes-2018.** *Diabetes Care* 41(Suppl 1): S152-S153,2018.

AN, P., *et al.* **Modulating influence on HIV/AIDS by interacting RANTES gene variants.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(15): 10002-10007,2002.

ANDO, H., *et al.* **The specific p38 mitogen-activated protein kinase pathway inhibitor FR167653 keeps insulinitis benign in nonobese diabetic mice.** *Life Sci* 74(14): 1817-1827,2004.

ANISUZZAMAN, *et al.* **Longistatin in tick saliva blocks advanced glycation end-product receptor activation.** J Clin Invest 124(10): 4429-4444,2014.

ARAUJO, J., *et al.* **Prevalence of autoimmune thyroid disease and thyroid dysfunction in young Brazilian patients with type 1 diabetes.** Pediatr Diabetes 9(4 Pt 1): 272-276,2008.

ARAÚJO, R. B., *et al.* **Assessment of diabetic patient management at primary health care level.** Rev. Saúde Pública 33(1): 9,1999.

ARTEAGA, C. L. **Overview of epidermal growth factor receptor biology and its role as a therapeutic target in human neoplasia.** Semin Oncol 29(5 Suppl 14): 3-9,2002.

BADMAN, M. K.ET. A. CHOWDHURY. **Should thyroid function tests be done annually in all patients with diabetes?** Diabet Med 19 Suppl 3: 7-9,2002.

BAHIA, L., *et al.* **Coronary artery disease, microalbuminuria and lipid profile in patients with non-insulin dependent diabetes mellitus.** Arq Bras Cardiol 73(1): 11-22,1999.

BAIGENT, C., *et al.* **Efficacy and safety of cholesterol-lowering treatment: prospective meta-analysis of data from 90,056 participants in 14 randomised trials of statins.** Lancet 366(9493): 1267-1278,2005.

BALASUBBU, S., *et al.* **Association analysis of nine candidate gene polymorphisms in Indian patients with type 2 diabetic retinopathy.** BMC Med Genet 11: 158,2010.

BALIS, D. A., *et al.* **Effect of canagliflozin, a sodium-glucose cotransporter 2 inhibitor, on measurement of serum 1,5-anhydroglucitol.** J Diabetes 6(4): 378-380,2014.

BANERJEE, M.ET. VATS. **Reactive metabolites and antioxidant gene polymorphisms in Type 2 diabetes mellitus.** Redox Biol 2: 170-177,2014.

BANSAL, S., *et al.* **Association of RAGE gene polymorphism with circulating AGEs level and paraoxonase activity in relation to macro-vascular complications in Indian type 2 diabetes mellitus patients.** Gene 526(2): 325-330,2013.

BARONE, B., *et al.* **Family history of type 2 diabetes is increased in patients with type 1 diabetes.** *Diabetes Res Clin Pract* 82(1): e1-4,2008.

BARRA, G. B., *et al.* **Association of the rs7903146 single nucleotide polymorphism at the Transcription Factor 7-like 2 (TCF7L2) locus with type 2 diabetes in Brazilian subjects.** *Arq Bras Endocrinol Metabol* 56(8): 479-484,2012.

BARROS, B. S. V., *et al.* **Type 1 Diabetes and Non-Alcoholic Fatty Liver Disease: When Should We Be Concerned? A Nationwide Study in Brazil.** *Nutrients* 9(8),2017.

BASTAKI, M., *et al.* **Genotype-activity relationship for Mn-superoxide dismutase, glutathione peroxidase 1 and catalase in humans.** *Pharmacogenet Genomics* 16(4): 279-286,2006.

BERANEK, M., *et al.* **Genetic variations and plasma levels of gelatinase A (matrix metalloproteinase-2) and gelatinase B (matrix metalloproteinase-9) in proliferative diabetic retinopathy.** *Mol Vis* 14: 1114-1121,2008.

BERNATSKY, S., *et al.* **An international cohort study of cancer in systemic lupus erythematosus.** *Arthritis Rheum* 52(5): 1481-1490,2005.

BIANCO, R., *et al.* **Rational bases for the development of EGFR inhibitors for cancer treatment.** *Int J Biochem Cell Biol* 39(7-8): 1416-1431,2007.

BJORNHOLT, J. V., *et al.* **Type 2 diabetes and maternal family history: an impact beyond slow glucose removal rate and fasting hyperglycemia in low-risk individuals? Results from 22.5 years of follow-up of healthy nondiabetic men.** *Diabetes Care* 23(9): 1255-1259,2000.

BLACKER, D.ER. E. TANZI. **The genetics of Alzheimer disease: current status and future prospects.** *Arch Neurol* 55(3): 294-296,1998.

BLANKENBERG, S., *et al.* **Plasma concentrations and genetic variation of matrix metalloproteinase 9 and prognosis of patients with cardiovascular disease.** *Circulation* 107(12): 1579-1585,2003.

BOER, J. M., *et al.* **Characteristics of non-insulin-dependent diabetes mellitus in elderly men: effect modification by family history.** *Int J Epidemiol* 25(2): 394-402,1996.

BOGER, C. A., *et al.* **RANTES gene polymorphisms predict all-cause and cardiac mortality in type 2 diabetes mellitus hemodialysis patients.** *Atherosclerosis* 183(1): 121-129,2005.

BOIOCCHI, C., *et al.* **Age of onset of myocardial infarction: is promoter polymorphism of the RAGE gene implicated?** *Rejuvenation Res* 14(1): 67-73,2011.

BONNEFONT-ROUSSELOT, D. **Glucose and reactive oxygen species.** *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 5(5): 561-568,2002.

BONNEFONT-ROUSSELOT, D., *et al.* **Consequences of the diabetic status on the oxidant/antioxidant balance.** *Diabetes Metab* 26(3): 163-176,2000.

BOWMAN, T., *et al.* **STATs in oncogenesis.** *Oncogene* 19(21): 2474-2488,2000.

BOYLE, J. P., *et al.* **Estimating prevalence of type 1 and type 2 diabetes in a population of African Americans with diabetes mellitus.** *Am J Epidemiol* 149(1): 55-63,1999.

BRADLEY, L. M., *et al.* **Islet-specific Th1, but not Th2, cells secrete multiple chemokines and promote rapid induction of autoimmune diabetes.** *J Immunol* 162(5): 2511-2520,1999.

BRILL, A., *et al.* **Augmentation of RANTES-induced extracellular signal-regulated kinase mediated signaling and T cell adhesion by elastase-treated fibronectin.** *J Immunol* 166(12): 7121-7127,2001.

BROWN, N. K., *et al.* **Perivascular adipose tissue in vascular function and disease: a review of current research and animal models.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 34(8): 1621-1630,2014.

BROWNLEE, M. **Advanced protein glycosylation in diabetes and aging.** *Annu Rev Med* 46: 223-234,1995.

BROWNLEE, M. **Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications.** *Nature* 414(6865): 813-820,2001.

BRUNETTI, A., *et al.* **Recent advances in the molecular genetics of type 2 diabetes mellitus.** *World J Diabetes* 5(2): 128-140,2014.

BRUNO, G., *et al.* **Incidence of type 1 and type 2 diabetes in adults aged 30-49 years: the population-based registry in the province of Turin, Italy.** *Diabetes Care* 28(11): 2613-2619,2005.

BUSE, J. B., *et al.* **Serum 1,5-anhydroglucitol (GlycoMark): a short-term glycemetic marker.** *Diabetes Technol Ther* 5(3): 355-363,2003.

BUSTAMANTE, C. D., *et al.* **Genomics for the world.** *Nature* 475(7355): 163-165,2011.

CAKAN, N., *et al.* **Changing spectrum of diabetes mellitus in children: challenges with initial classification.** *Clin Pediatr (Phila)* 51(10): 939-944,2012.

CANARIS, G. J., *et al.* **The Colorado thyroid disease prevalence study.** *Arch Intern Med* 160(4): 526-534,2000.

CANIVELL, S.ER. GOMIS. **Diagnosis and classification of autoimmune diabetes mellitus.** *Autoimmun Rev* 13(4-5): 403-407,2014.

CARVALHO-PINTO, C., *et al.* **Leukocyte attraction through the CCR5 receptor controls progress from insulinitis to diabetes in non-obese diabetic mice.** *Eur J Immunol* 34(2): 548-557,2004.

CAVALLARO, U. EE. DEJANA. **Adhesion molecule signalling: not always a sticky business.** *Nat Rev Mol Cell Biol* 12(3): 189-197,2011.

CAVARAPE, A., *et al.* **High-fructose diet decreases catalase mRNA levels in rat tissues.** *J Endocrinol Invest* 24(11): 838-845,2001.

CELANI, M. F., *et al.* **Prevalence of abnormal thyrotropin concentrations measured by a sensitive assay in patients with type 2 diabetes mellitus.** *Diabetes Res* 27(1): 15-25,1994.

CETKOVIC-CVRLJE, M., *et al.* **Targeting JAK3 with JANEX-1 for prevention of autoimmune type 1 diabetes in NOD mice.** *Clin Immunol* 106(3): 213-225,2003.

CHADZINSKA, M., *et al.* **Expression profiles of matrix metalloproteinase 9 in teleost fish provide evidence for its active role in initiation and resolution of inflammation.** *Immunology* 125(4): 601-610,2008.

CHAKRAVARTY, E.EM. GENOVESE (2005). **Chakravarty EF, Genovese MC Kelley's textbook of rheumatology.** E. D. Harris, S. Ruddy and W. N. Kelley. Philadelphia, Pa., Elsevier/Saunders : Elsevier: 1916.

CHAN, C. L., *et al.* **Screening for type 2 diabetes and prediabetes in obese youth: evaluating alternate markers of glycemia - 1,5-anhydroglucitol, fructosamine, and glycated albumin.** *Pediatr Diabetes*,2015.

CHAPMAN, M. J., *et al.* **Triglyceride-rich lipoproteins and high-density lipoprotein cholesterol in patients at high risk of cardiovascular disease: evidence and guidance for management.** *Eur Heart J* 32(11): 1345-1361,2011.

CHATTERJEE, T. K., *et al.* **Human coronary artery perivascular adipocytes overexpress genes responsible for regulating vascular morphology, inflammation, and hemostasis.** *Physiol Genomics* 45(16): 697-709,2013.

CHAUDHURI, R., *et al.* **Sputum matrix metalloproteinase-12 in patients with chronic obstructive pulmonary disease and asthma: relationship to disease severity.** *J Allergy Clin Immunol* 129(3): 655-663 e658,2012.

CHAVAKIS, T., *et al.* **The pattern recognition receptor (RAGE) is a counterreceptor for leukocyte integrins: a novel pathway for inflammatory cell recruitment.** *J Exp Med* 198(10): 1507-1515,2003.

CHAWLA, A., *et al.* **Microvascular and macrovascular complications in diabetes mellitus: Distinct or continuum?** *Indian J Endocrinol Metab* 20(4): 546-551,2016.

CHEN, H., *et al.* **Polymorphic variations in manganese superoxide dismutase (MnSOD), glutathione peroxidase-1 (GPX1), and catalase (CAT) contribute to elevated plasma triglyceride levels in Chinese patients with type 2 diabetes or diabetic cardiovascular disease.** *Mol Cell Biochem* 363(1-2): 85-91,2012.

CHEN, S. C., *et al.* **Advanced glycation end-products activate extracellular signal-regulated kinase via the oxidative stress-EGF receptor pathway in renal fibroblasts.** *J Cell Biochem* 109(1): 38-48,2010.

CHIANG, J. L., *et al.* **Type 1 diabetes through the life span: a position statement of the American Diabetes Association.** *Diabetes Care* 37(7): 2034-2054,2014.

CHISTIYAKOV, D. A., *et al.* **A new type 1 diabetes susceptibility locus containing the catalase gene (chromosome 11p13) in a Russian population.** *Diabetes Metab Res Rev* 20(3): 219-224,2004.

CHISTIYAKOV, D. A., *et al.* **The 262T>C promoter polymorphism of the catalase gene is associated with diabetic neuropathy in type 1 diabetic Russian patients.** *Diabetes Metab* 32(1): 63-68,2006.

CHO, Y. S., *et al.* **Genetics of type 2 diabetes in East Asian populations.** *Curr Diab Rep* 12(6): 686-696,2012.

CHOLESTEROL TREATMENT TRIALISTS, C., *et al.* **Efficacy of cholesterol-lowering therapy in 18,686 people with diabetes in 14 randomised trials of statins: a meta-analysis.** *Lancet* 371(9607): 117-125,2008.

CHOU, S. Y., *et al.* **CCL5/RANTES contributes to hypothalamic insulin signaling for systemic insulin responsiveness through CCR5.** *Sci Rep* 6: 37659,2016.

CHU, S. F., *et al.* **Association between RANTES functional polymorphisms and tuberculosis in Hong Kong Chinese.** *Genes Immun* 8(6): 475-479,2007.

CINTRA, D. E., *et al.* **Interleukin-10 is a protective factor against diet-induced insulin resistance in liver.** *J Hepatol* 48(4): 628-637,2008.

CLAIR, C., *et al.* **Association of smoking cessation and weight change with cardiovascular disease among adults with and without diabetes.** *JAMA* 309(10): 1014-1021,2013.

CNOP, M., *et al.* **Mechanisms of pancreatic beta-cell death in type 1 and type 2 diabetes: many differences, few similarities.** *Diabetes* 54 Suppl 2: S97-107,2005.

COBAS, R., *et al.* **[Type 1 diabetic patients evolution to hypertension].** *Arq Bras Endocrinol Metabol* 52(4): 628-634,2008.

COBAS, R. A., *et al.* **Progression to microalbuminuria in patients with type 1 diabetes: a seven-year prospective study.** *Diabetol Metab Syndr* 3: 21,2011.

COCKRAM, C. S. **The epidemiology of diabetes mellitus in the Asia-Pacific region.** *Hong Kong Med J* 6(1): 43-52,2000.

COHEN, C. R., *et al.* **Association study of polymorphisms in the receptor for advanced glycation end-products (RAGE) gene with susceptibility and prognosis of heart failure.** *Gene* 510(1): 7-13,2012.

COLHOUN, H. M., *et al.* **Primary prevention of cardiovascular disease with atorvastatin in type 2 diabetes in the Collaborative Atorvastatin Diabetes Study (CARDS): multicentre randomised placebo-controlled trial.** *Lancet* 364(9435): 685-696,2004.

CONCANNON, P., *et al.* **Genetics of type 1A diabetes.** *N Engl J Med* 360(16): 1646-1654,2009.

CONSORTIUM, G. T. **Human genomics. The Genotype-Tissue Expression (GTEx) pilot analysis: multitissue gene regulation in humans.** *Science* 348(6235): 648-660,2015.

CONWAY, B., *et al.* **Temporal patterns in overweight and obesity in Type 1 diabetes.** *Diabet Med* 27(4): 398-404,2010.

CORDELL, H. J.ED. G. CLAYTON. **Genetic association studies.** *Lancet* 366(9491): 1121-1131,2005.

COUPER, J. EK. C. DONAGHUE. **Phases of diabetes in children and adolescents.** *Pediatr Diabetes* 10 Suppl 12: 13-16,2009.

CRAIG, M. E., *et al.* **ISPAD Clinical Practice Consensus Guidelines 2014. Definition, epidemiology, and classification of diabetes in children and adolescents.** *Pediatr Diabetes* 15 Suppl 20: 4-17,2014.

CRAWFORD, A., *et al.* **Glutathione peroxidase, superoxide dismutase and catalase genotypes and activities and the progression of chronic kidney disease.** *Nephrol Dial Transplant* 26(9): 2806-2813,2011.

CRAWFORD, A., *et al.* **Relationships between single nucleotide polymorphisms of antioxidant enzymes and disease.** *Gene* 501(2): 89-103,2012.

CRISPIM, D., *et al.* **Familial history of type 2 diabetes in patients from Southern Brazil and its influence on the clinical characteristics of this disease.** *Arq Bras Endocrinol Metabol* 50(5): 862-868,2006.

DA COSTA, L. A., *et al.* **Genetic determinants of dietary antioxidant status.** *Prog Mol Biol Transl Sci* 108: 179-200,2012.

DABELEA, D., *et al.* **Prevalence of type 1 and type 2 diabetes among children and adolescents from 2001 to 2009.** *JAMA* 311(17): 1778-1786,2014.

DAL SANTO FRANCISCO BONAMICHI, B., *et al.* **Management of type 2 diabetes mellitus patients and prevalence of complications in a reference center.** Integrative Obesity and Diabetes 2(2),2016.

DANQUAH, I., *et al.* **The TCF7L2 rs7903146 (T) allele is associated with type 2 diabetes in urban Ghana: a hospital-based case-control study.** BMC Med Genet 14: 96,2013.

DE ALMEIDA-PITITTO, B., *et al.* **Type 2 diabetes in Brazil: epidemiology and management.** Diabetes Metab Syndr Obes 8: 17-28,2015.

DE COEK, N. M. **Serum urate and urate clearance in diabetes mellitus.** Australas Ann Med 14(3): 205-209,1965.

DE HOOG, V. C., *et al.* **BLT1 antagonist LSN2792613 reduces infarct size in a mouse model of myocardial ischaemia-reperfusion injury.** Cardiovasc Res 108(3): 367-376,2015.

DE SOUZA, L. J., *et al.* **Prevalence of dyslipidemia and risk factors in Campos dos Goytacazes, in the Brazilian state of Rio de Janeiro.** Arq Bras Cardiol 81(3): 249-264,2003.

DEAN, J. D. EP. N. DURRINGTON. **Treatment of dyslipoproteinaemia in diabetes mellitus.** Diabet Med 13(4): 297-312,1996.

DEFURIA, J., *et al.* **B cells promote inflammation in obesity and type 2 diabetes through regulation of T-cell function and an inflammatory cytokine profile.** Proc Natl Acad Sci U S A 110(13): 5133-5138,2013.

DEMITROST, L.ES. RANABIR. **Thyroid dysfunction in type 2 diabetes mellitus: A retrospective study.** Indian J Endocrinol Metab 16(Suppl 2): S334-335,2012.

DESCAMPS, F. J., *et al.* **Gelatinase B is diabetogenic in acute and chronic pancreatitis by cleaving insulin.** FASEB J 17(8): 887-889,2003.

DEVENDRA, D., *et al.* **Type 1 diabetes: recent developments.** BMJ 328(7442): 750-754,2004.

DIEZ, J. J., *et al.* **Prevalence of thyroid dysfunction in patients with type 2 diabetes.** Exp Clin Endocrinol Diabetes 119(4): 201-207,2011.

DODSON, P. M. **Hypertension and diabetes.** *Curr Med Res Opin* 18 Suppl 1: s48-57,2002.

DONATH, M. Y. **Targeting inflammation in the treatment of type 2 diabetes: time to start.** *Nat Rev Drug Discov* 13(6): 465-476,2014.

DORIA, A., *et al.* **The emerging genetic architecture of type 2 diabetes.** *Cell Metab* 8(3): 186-200,2008.

DOS SANTOS, K. G., *et al.* **The catalase -262C/T promoter polymorphism and diabetic complications in Caucasians with type 2 diabetes.** *Dis Markers* 22(5-6): 355-359,2006.

DOSI, R. V. EN. TANDON. **A study on prevalence of thyroid auto-immunity in type 1 diabetes mellitus.** *J Indian Med Assoc* 108(6): 349-350, 355-346,2010.

DRAY-SPIRA, R., *et al.* **Educational disparities in mortality among adults with diabetes in the U.S.** *Diabetes Care* 33(6): 1200-1205,2010.

DRUET, C., *et al.* **Characterization of insulin secretion and resistance in type 2 diabetes of adolescents.** *J Clin Endocrinol Metab* 91(2): 401-404,2006.

DUNTAS, L. H., *et al.* **The Interface between thyroid and diabetes mellitus.** *Clin Endocrinol (Oxf)*,2011.

DWORACKA, M., *et al.* **Increased circulating RANTES in type 2 diabetes.** *Eur Cytokine Netw* 25(3): 46-51,2014.

EL-SERAG, H. B., *et al.* **Diabetes increases the risk of chronic liver disease and hepatocellular carcinoma.** *Gastroenterology* 126(2): 460-468,2004.

ENGELEN, L., *et al.* **The association between the -374T/A polymorphism of the receptor for advanced glycation endproducts gene and blood pressure and arterial stiffness is modified by glucose metabolism status: the Hoorn and CoDAM studies.** *J Hypertens* 28(2): 285-293,2010.

ERDBERG, A., *et al.* **Urine uric acid excretion in patients with insulin-dependent diabetes mellitus.** *Nephron* 60(2): 134-137,1992.

ERLICH, H., *et al.* **HLA DR-DQ haplotypes and genotypes and type 1 diabetes risk: analysis of the type 1 diabetes genetics consortium families.** *Diabetes* 57(4): 1084-1092,2008.

ESIH, K., *et al.* **The association between antioxidant enzyme polymorphisms and cerebral palsy after perinatal hypoxic-ischaemic encephalopathy.** *Eur J Paediatr Neurol* 20(5): 704-708,2016.

ESPARZA MARTIN, N.EV. GARCIA NIETO. **Hypouricemia and tubular transport of uric acid.** *Nefrologia* 31(1): 44-50,2011.

ESTACIO, R. O., *et al.* **Relation of reduction in urinary albumin excretion to ten-year cardiovascular mortality in patients with type 2 diabetes and systemic hypertension.** *Am J Cardiol* 109(12): 1743-1748,2012.

ESTEVEZ, J. F., *et al.* **Prevalence of diabetic retinopathy in patients with type 1 diabetes mellitus.** *Rev Assoc Med Bras (1992)* 55(3): 268-273,2009.

EVANS, J. M., *et al.* **Socio-economic status, obesity and prevalence of Type 1 and Type 2 diabetes mellitus.** *Diabet Med* 17(6): 478-480,2000.

FAGOT-CAMPAGNA, A., *et al.* **Type 2 diabetes among North American children and adolescents: an epidemiologic review and a public health perspective.** *J Pediatr* 136(5): 664-672,2000.

FALCONE, C., *et al.* **-374T/A polymorphism of the RAGE gene promoter in relation to severity of coronary atherosclerosis.** *Clin Chim Acta* 354(1-2): 111-116,2005.

FALCONE, C., *et al.* **Relationship between the -374T/A RAGE gene polymorphism and angiographic coronary artery disease.** *Int J Mol Med* 14(6): 1061-1064,2004.

FALCONE, C., *et al.* **The -374T/A variant of the rage gene promoter is associated with clinical restenosis after coronary stent placement.** *Int J Immunopathol Pharmacol* 20(4): 771-777,2007.

FALCONE, C., *et al.* **The -374T/A RAGE polymorphism protects against future cardiac events in nondiabetic patients with coronary artery disease.** *Arch Med Res* 39(3): 320-325,2008.

FALUDI, A. A., *et al.* **Atualização da diretriz Brasileira de dislipidemias e prevenção da aterosclerose 2017.** Arq Bras Cardiol 109(2): 76,2017a.

FALUDI, A. A., *et al.* **Atualização da Diretriz Brasileira de Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose – 2017.** Arq Bras Cardiol 109: 76,2017b.

FANJUL-FERNANDEZ, M., *et al.* **Matrix metalloproteinases: evolution, gene regulation and functional analysis in mouse models.** Biochim Biophys Acta 1803(1): 3-19,2010.

FATEHI-HASSANABAD, Z., *et al.* **Reactive oxygen species and endothelial function in diabetes.** Eur J Pharmacol 636(1-3): 8-17,2010.

FEHRENBACH, H., *et al.* **Receptor for advanced glycation endproducts (RAGE) exhibits highly differential cellular and subcellular localisation in rat and human lung.** Cell Mol Biol (Noisy-le-grand) 44(7): 1147-1157,1998.

FENG, S., *et al.* **Matrix Metalloproteinase-9 -1562C/T Gene Polymorphism Is Associated with Diabetic Nephropathy.** Biomed Res Int 2016: 1627143,2016.

FERGUSON, M. A.ES. S. WAIKAR. **Established and emerging markers of kidney function.** Clin Chem 58(4): 680-689,2012.

FERREIRA, R. C., *et al.* **A type I interferon transcriptional signature precedes autoimmunity in children genetically at risk for type 1 diabetes.** Diabetes 63(7): 2538-2550,2014.

FESTA, A., *et al.* **Differences in insulin resistance in nondiabetic subjects with isolated impaired glucose tolerance or isolated impaired fasting glucose.** Diabetes 53(6): 1549-1555,2004.

FESTA, A., *et al.* **Chronic subclinical inflammation as part of the insulin resistance syndrome: the Insulin Resistance Atherosclerosis Study (IRAS).** Circulation 102(1): 42-47,2000.

FEUERER, M., *et al.* **Lean, but not obese, fat is enriched for a unique population of regulatory T cells that affect metabolic parameters.** Nat Med 15(8): 930-939,2009.

FICHNA, M., *et al.* **Elevated serum RANTES chemokine levels in autoimmune Addison disease.** Pol Arch Intern Med 128(4): 216-221,2018.

FLEKAC, M., *et al.* **Gene polymorphisms of superoxide dismutases and catalase in diabetes mellitus.** BMC Med Genet 9: 30,2008.

FLOREZ, J. C. **Genetics and biobanks converge to resolve a vexing knowledge gap in diabetes.** Lancet Diabetes Endocrinol 6(2): 87-89,2018.

FORBES, J. M., *et al.* **Receptor for advanced glycation end-products (RAGE) provides a link between genetic susceptibility and environmental factors in type 1 diabetes.** Diabetologia 54(5): 1032-1042,2011.

FORLENZA, G. P.EM. REWERS. **The epidemic of type 1 diabetes: what is it telling us?** Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes 18(4): 248-251,2011.

FORSBERG, L., *et al.* **A common functional C-T substitution polymorphism in the promoter region of the human catalase gene influences transcription factor binding, reporter gene transcription and is correlated to blood catalase levels.** Free Radic Biol Med 30(5): 500-505,2001.

FRANKO, B., *et al.* **RAGE and CYBA polymorphisms are associated with microalbuminuria and end-stage renal disease onset in a cohort of type 1 diabetes mellitus patients over a 20-year follow-up.** Acta Diabetol 53(3): 469-475,2016.

FRAYLING, T. M. **A new era in finding Type 2 diabetes genes-the unusual suspects.** Diabet Med 24(7): 696-701,2007.

FREIJE, J. M., *et al.* **Matrix metalloproteinases and tumor progression.** Adv Exp Med Biol 532: 91-107,2003.

FRITZ, G. **RAGE: a single receptor fits multiple ligands.** Trends Biochem Sci 36(12): 625-632,2011.

FULLERTON, B., *et al.* **Intensive glucose control versus conventional glucose control for type 1 diabetes mellitus.** Cochrane Database Syst Rev(2): CD009122,2014.

GAETANI, G. F., *et al.* **Predominant role of catalase in the disposal of hydrogen peroxide within human erythrocytes.** Blood 87(4): 1595-1599,1996.

GALL, M. A., *et al.* **Prevalence of micro- and macroalbuminuria, arterial hypertension, retinopathy and large vessel disease in European type 2 (non-insulin-dependent) diabetic patients.** Diabetologia 34(9): 655-661,1991.

GAO, J. X., *et al.* **[Association of Gly82Ser polymorphism of receptor for advanced glycation end products gene in a type 2 diabetic Chinese population]**. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao* 27(2): 219-222,2007.

GAO, L. B., *et al.* **R497K polymorphism in epidermal growth factor receptor gene is associated with the risk of acute coronary syndrome**. *BMC Med Genet* 9: 74,2008.

GATLING, W., *et al.* **The Poole Diabetes Study: how many cases of Type 2 diabetes are diagnosed each year during normal health care in a defined community?** *Diabetes Res Clin Pract* 53(2): 107-112,2001.

GBD. **Global, regional, and national comparative risk assessment of 79 behavioural, environmental and occupational, and metabolic risks or clusters of risks in 188 countries, 1990-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013**. *Lancet* 386(10010): 2287-2323,2015.

GEETHA, A., *et al.* **Study on the impact of family history of diabetes among type 2 diabetes mellitus patients in an urban area of Kancheepuram district, Tamil Nadu**. *International Journal Of Community Medicine And Public Health* 4(11): 4151,2017.

GIACCO, F.EM. BROWNLEE. **Oxidative stress and diabetic complications**. *Circ Res* 107(9): 1058-1070,2010.

GINSBERG-FELLNER, F., *et al.* **Diabetes mellitus and autoimmunity in patients with the congenital rubella syndrome**. *Rev Infect Dis* 7 Suppl 1: S170-176,1985.

GIUGLIANO, D., *et al.* **Oxidative stress and diabetic vascular complications**. *Diabetes Care* 19(3): 257-267,1996.

GLOBOCNIK PETROVIC, M., *et al.* **The - 429 T/C and - 374 T/A gene polymorphisms of the receptor of advanced glycation end products gene are not risk factors for diabetic retinopathy in Caucasians with type 2 diabetes**. *Klin Monbl Augenheilkd* 220(12): 873-876,2003.

GOLDENBERG, P., *et al.* **Prevalência de diabetes mellitus: diferenças de gênero e igualdade entre os sexos**. *Rev. Bras. Epidemiol.* 6(1): 11,2003.

GOLDFINE, A. B., *et al.* **Insulin resistance is a poor predictor of type 2 diabetes in individuals with no family history of disease**. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(5): 2724-2729,2003.

GOLDSTEIN, D. E., *et al.* **Tests of glycemia in diabetes.** Diabetes Care 27(7): 1761-1773,2004.

GOLIK, A., *et al.* **Renal uric acid handling in non-insulin-dependent diabetic patients with elevated glomerular filtration rates.** Clin Sci (Lond) 85(6): 713-716,1993.

GOMES, L. C., *et al.* **Functional promoter polymorphisms of the receptor for advanced glycation end products in children and adolescents with type 1 diabetes.** Mol Cell Probes 29(6): 503-506,2015.

GOMES, M. B., *et al.* **Prevalence of adults with type 1 diabetes who meet the goals of care in daily clinical practice: a nationwide multicenter study in Brazil.** Diabetes Res Clin Pract 97(1): 63-70,2012.

GOMES, M. B., *et al.* **Prevalence, awareness, and treatment of hypertension in patients with type 1 diabetes: a nationwide multicenter study in Brazil.** Int J Hypertens 2013: 565263,2013.

GOPINATH, B., *et al.* **Type 2 diabetes does not predict incident thyroid dysfunction in the elderly.** Diabetes Res Clin Pract 82(3): e11-13,2008.

GOSSELINK, J. V., *et al.* **Differential expression of tissue repair genes in the pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease.** Am J Respir Crit Care Med 181(12): 1329-1335,2010.

GOTFREDSEN, A., *et al.* **Renal hypouricaemia in insulin treated diabetes mellitus.** Clin Chim Acta 120(3): 355-361,1982.

GOTH, L. **Catalase deficiency and type 2 diabetes.** Diabetes Care 31(12): e93,2008.

GOTH, L.EJ. W. EATON. **Hereditary catalase deficiencies and increased risk of diabetes.** Lancet 356(9244): 1820-1821,2000.

GOTH, L., *et al.* **Blood catalase deficiency and diabetes in Hungary.** Diabetes Care 24(10): 1839-1840,2001.

GOTH, L.ET. NAGY. **Acatlasemia and diabetes mellitus.** Arch Biochem Biophys 525(2): 195-200,2012.

GOTH, L., *et al.* **Effects of rs769217 and rs1001179 polymorphisms of catalase gene on blood catalase, carbohydrate and lipid biomarkers in diabetes mellitus.** *Free Radic Res* 46(10): 1249-1257,2012.

GOTO, M., *et al.* **Correlation between baseline serum 1,5-anhydroglucitol levels and 2-hour post-challenge glucose levels during oral glucose tolerance tests.** *Endocr J* 58(1): 13-17,2011.

GOULART, A. C., *et al.* **Polymorphisms in advanced glycosylation end product-specific receptor (AGER) gene, insulin resistance, and type 2 diabetes mellitus.** *Clin Chim Acta* 398(1-2): 95-98,2008.

GOULAS, A., *et al.* **Association of the Common Catalase Gene Polymorphism rs1001179 With Glycated Hemoglobin and Plasma Lipids in Hyperlipidemic Patients.** *Biochem Genet* 55(1): 77-86,2017.

GREVEN, W. L., *et al.* **Glycemic variability in inadequately controlled type 1 diabetes and type 2 diabetes on intensive insulin therapy: a cross-sectional, observational study.** *Diabetes Technol Ther* 12(9): 695-699,2010.

GROSS, J. L., *et al.* **Diabetic nephropathy: diagnosis, prevention, and treatment.** *Diabetes Care* 28(1): 164-176,2005.

GROSS, J. L. E. A. **Diabetes melito: Diagnóstico, Classificação e Avaliação do Controle Glicêmico.** *Arq Bras Endocrinol Metabol* 46: 16-26,2002.

GROUP, U. P. D. S. **Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33). UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group.** *Lancet* 352(9131): 837-853,1998a.

GROUP, U. P. D. S. **Tight blood pressure control and risk of macrovascular and microvascular complications in type 2 diabetes: UKPDS 38. UK Prospective Diabetes Study Group.** *BMJ* 317(7160): 703-713,1998b.

GUERRERO-ROMERO, F.EM. RODRIGUEZ-MORAN. **[Diabetes family history is associated with early insulin response, in healthy Hispanic-Mexican subjects].** *Gac Med Mex* 137(6): 529-534,2001a.

GUERRERO-ROMERO, F.EM. RODRIGUEZ-MORAN. **Glucose intolerance is predicted by the high Fasting Insulin-to-Glucose ratio.** *Diabetes Metab* 27(2 Pt 1): 117-121,2001b.

GUERRERO-ROMERO, F.EM. RODRIGUEZ-MORAN. **Impaired glucose tolerance is a more advanced stage of alteration in the glucose metabolism than impaired fasting glucose.** J Diabetes Complications 15(1): 34-37,2001c.

GUO, H., *et al.* **Correlations between EGFR gene polymorphisms and pleural metastasis of lung adenocarcinoma.** Onco Targets Ther 9: 5257-5270,2016.

GUZIK, T. J., *et al.* **Adipocytokines - novel link between inflammation and vascular function?** J Physiol Pharmacol 57(4): 505-528,2006.

GUZIK, T. J., *et al.* **Perivascular adipose tissue as a messenger of the brain-vessel axis: role in vascular inflammation and dysfunction.** J Physiol Pharmacol 58(4): 591-610,2007.

GUZIK, T. J., *et al.* **The role of infiltrating immune cells in dysfunctional adipose tissue.** Cardiovasc Res 113(9): 1009-1023,2017.

HAAK, T. **Combination of linagliptin and metformin for the treatment of patients with type 2 diabetes.** Clin Med Insights Endocrinol Diabetes 8: 1-6,2015.

HACKEL, P. O., *et al.* **Epidermal growth factor receptors: critical mediators of multiple receptor pathways.** Curr Opin Cell Biol 11(2): 184-189,1999.

HAFFNER, S. M., *et al.* **Cardiovascular risk factors in confirmed prediabetic individuals. Does the clock for coronary heart disease start ticking before the onset of clinical diabetes?** JAMA 263(21): 2893-2898,1990.

HALBAN, P. A., *et al.* **beta-cell failure in type 2 diabetes: postulated mechanisms and prospects for prevention and treatment.** Diabetes Care 37(6): 1751-1758,2014.

HALDAR, S. R., *et al.* **Oxidative stress-related genes in type 2 diabetes: association analysis and their clinical impact.** Biochem Genet 53(4-6): 93-119,2015.

HALEY, J., *et al.* **The human EGF receptor gene: structure of the 110 kb locus and identification of sequences regulating its transcription.** Oncogene Res 1(4): 375-396,1987.

HALMOS, T., *et al.* **[Remission in juvenile diabetes mellitus].** Orv Hetil 125(16): 931-933,1984.

HAMATY, M. **Insulin treatment for type 2 diabetes: when to start, which to use.** Cleve Clin J Med 78(5): 332-342,2011.

HANIFI-MOGHADDAM, P., *et al.* **Altered chemokine levels in individuals at risk of Type 1 diabetes mellitus.** Diabet Med 23(2): 156-163,2006.

HARFORD, K. A., *et al.* **Fats, inflammation and insulin resistance: insights to the role of macrophage and T-cell accumulation in adipose tissue.** Proc Nutr Soc 70(4): 408-417,2011.

HASSLACHER, C.EF. KULOZIK. **Effect of renal function on serum concentration of 1,5-anhydroglucitol in type 2 diabetic patients in chronic kidney disease stages I-III: A comparative study with HbA1c and glycated albumin.** J Diabetes 8(5): 712-719,2016.

HEISS, G., *et al.* **Lipoprotein-cholesterol distributions in selected North American populations: the lipid research clinics program prevalence study.** Circulation 61(2): 302-315,1980.

HENNESSY, B. T., *et al.* **Exploiting the PI3K/AKT pathway for cancer drug discovery.** Nat Rev Drug Discov 4(12): 988-1004,2005.

HERDER, C., *et al.* **Association of systemic chemokine concentrations with impaired glucose tolerance and type 2 diabetes: results from the Cooperative Health Research in the Region of Augsburg Survey S4 (KORA S4).** Diabetes 54 Suppl 2: S11-17,2005.

HERDER, C., *et al.* **RANTES/CCL5 gene polymorphisms, serum concentrations, and incident type 2 diabetes: results from the MONICA/KORA Augsburg case-cohort study, 1984-2002.** Eur J Endocrinol 158(5): R1-5,2008.

HERDER, C., *et al.* **Systemic immune mediators and lifestyle changes in the prevention of type 2 diabetes: results from the Finnish Diabetes Prevention Study.** Diabetes 55(8): 2340-2346,2006.

HERMAN, J. B.EA. KEYNAN. **Hyperglycemia and uric acid.** Isr J Med Sci 5(5): 1048-1052,1969.

HERMAN, J. B., *et al.* **Diabetes, prediabetes and uricaemia.** Diabetologia 12(1): 47-52,1976.

HERMAN, W. H., *et al.* **Racial and ethnic differences in mean plasma glucose, hemoglobin A1c, and 1,5-anhydroglucitol in over 2000 patients with type 2 diabetes.** J Clin Endocrinol Metab 94(5): 1689-1694,2009.

HEWAPATHIRANA, N.ES. PAGE. **Diabetic microvascular complications – screening, diagnosis and prevention.** Clinical Focus Primary Care 6(3): 13,2012.

HIRAI, F. E., *et al.* **Severe hypoglycemia and smoking in a long-term type 1 diabetic population: Wisconsin Epidemiologic Study of Diabetic Retinopathy.** Diabetes Care 30(6): 1437-1441,2007.

HISATOME, I., *et al.* **Two cases of persistent hypouricemia associated with diabetes mellitus.** Nephron 61(2): 196-199,1992.

HIZAWA, N., *et al.* **A functional polymorphism in the RANTES gene promoter is associated with the development of late-onset asthma.** Am J Respir Crit Care Med 166(5): 686-690,2002.

HLADIK, F., *et al.* **Combined effect of CCR5-Delta32 heterozygosity and the CCR5 promoter polymorphism -2459 A/G on CCR5 expression and resistance to human immunodeficiency virus type 1 transmission.** J Virol 79(18): 11677-11684,2005.

HODGE, A. M., *et al.* **Serum lipids and modernization in coastal and highland Papua New Guinea.** Am J Epidemiol 144(12): 1129-1142,1996.

HOGLUND, P., *et al.* **Initiation of autoimmune diabetes by developmentally regulated presentation of islet cell antigens in the pancreatic lymph nodes.** J Exp Med 189(2): 331-339,1999.

HOLMAN, N., *et al.* **Current prevalence of Type 1 and Type 2 diabetes in adults and children in the UK.** Diabet Med 32(9): 1119-1120,2015.

HONG, E. G., *et al.* **Interleukin-10 prevents diet-induced insulin resistance by attenuating macrophage and cytokine response in skeletal muscle.** Diabetes 58(11): 2525-2535,2009.

HOUSLAY, M. D. **'Crosstalk': a pivotal role for protein kinase C in modulating relationships between signal transduction pathways.** Eur J Biochem 195(1): 9-27,1991.

HOWARD, B. V., *et al.* **LDL cholesterol as a strong predictor of coronary heart disease in diabetic individuals with insulin resistance and low LDL: The Strong Heart Study.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20(3): 830-835,2000.

HOWSON, J. M., *et al.* **Evidence that HLA class I and II associations with type 1 diabetes, autoantibodies to GAD and autoantibodies to IA-2, are distinct.** *Diabetes* 60(10): 2635-2644,2011.

HU, F. B., *et al.* **The impact of diabetes mellitus on mortality from all causes and coronary heart disease in women: 20 years of follow-up.** *Arch Intern Med* 161(14): 1717-1723,2001.

HU, J., *et al.* **Matrix metalloproteinase inhibitors as therapy for inflammatory and vascular diseases.** *Nat Rev Drug Discov* 6(6): 480-498,2007.

HU, X.EY. CHENG. **Possible participation of receptor for advanced glycation end products (RAGE) in the origin of cancer stem cells in diabetic patients with colon cancer.** *Med Hypotheses* 80(5): 620-623,2013.

HUANG, C. M., *et al.* **Rheumatoid arthritis is associated with rs17337023 polymorphism and increased serum level of the EGFR protein.** *PLoS One* 12(7): e0180604,2017.

HUBER, J., *et al.* **CC chemokine and CC chemokine receptor profiles in visceral and subcutaneous adipose tissue are altered in human obesity.** *J Clin Endocrinol Metab* 93(8): 3215-3221,2008.

HUDSON, B. I., *et al.* **Interaction of the RAGE cytoplasmic domain with diaphanous-1 is required for ligand-stimulated cellular migration through activation of Rac1 and Cdc42.** *J Biol Chem* 283(49): 34457-34468,2008.

HUDSON, B. I.EM. E. LIPPMAN. **Targeting RAGE Signaling in Inflammatory Disease.** *Annu Rev Med* 69: 349-364,2018.

HUDSON, B. I., *et al.* **Effects of novel polymorphisms in the RAGE gene on transcriptional regulation and their association with diabetic retinopathy.** *Diabetes* 50(6): 1505-1511,2001a.

HUDSON, B. I., *et al.* **Study of the -429 T/C and -374 T/A receptor for advanced glycation end products promoter polymorphisms in diabetic and nondiabetic subjects with macrovascular disease.** *Diabetes Care* 24(11): 2004,2001b.

HUDSON, B. I., *et al.* **Identification of polymorphisms in the receptor for advanced glycation end products (RAGE) gene: prevalence in type 2 diabetes and ethnic groups.** *Diabetes* 47(7): 1155-1157,1998.

HYPONEN, E., *et al.* **Intake of vitamin D and risk of type 1 diabetes: a birth-cohort study.** *Lancet* 358(9292): 1500-1503,2001.

IBRAHIM, M. M. **Subcutaneous and visceral adipose tissue: structural and functional differences.** *Obes Rev* 11(1): 11-18,2010.

IDF. **Global guideline for type 2 diabetes.** *Diabetes Res Clin Pract* 104(1): 1-52,2014.

IDF. **IDF DIABETES ATLAS.** International Diabetes Federation,2017.

ILAN, Y., *et al.* **Induction of regulatory T cells decreases adipose inflammation and alleviates insulin resistance in ob/ob mice.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(21): 9765-9770,2010.

INZUCCHI, S. E. **Clinical practice. Diagnosis of diabetes.** *N Engl J Med* 367(6): 542-550,2012.

ISHIHARA, K., *et al.* **The receptor for advanced glycation end-products (RAGE) directly binds to ERK by a D-domain-like docking site.** *FEBS Lett* 550(1-3): 107-113,2003.

IWATA, M., *et al.* **Genetic risk score constructed using 14 susceptibility alleles for type 2 diabetes is associated with the early onset of diabetes and may predict the future requirement of insulin injections among Japanese individuals.** *Diabetes Care* 35(8): 1763-1770,2012.

JAMALI, Z., *et al.* **Expression of CC chemokines CCL2, CCL5, and CCL11 is associated with duration of disease and complications in type-1 diabetes: a study on Iranian diabetic patients.** *Clin Lab* 59(9-10): 993-1001,2013.

JANG, Y., *et al.* **The RANTES -403G>A promoter polymorphism in Korean men: association with serum RANTES concentration and coronary artery disease.** *Clin Sci (Lond)* 113(8): 349-356,2007a.

JANG, Y., *et al.* **Association of the Gly82Ser polymorphism in the receptor for advanced glycation end products (RAGE) gene with circulating levels of**

soluble RAGE and inflammatory markers in nondiabetic and nonobese Koreans. *Metabolism* 56(2): 199-205,2007b.

JANKOWICH, M., *et al.* **Age-, race-, and gender-specific prevalence of diabetes among smokers.** *Diabetes Res Clin Pract* 93(3): e101-105,2011.

JERRAM, S. T.ER. D. LESLIE. **The Genetic Architecture of Type 1 Diabetes.** *Genes (Basel)* 8(8),2017.

JIANG, F., *et al.* **Association of the G1057D polymorphism in insulin receptor substrate 2 gene with type 2 diabetes mellitus: a meta-analysis.** *J Diabetes Complications* 29(5): 731-736,2015.

JIXIONG, X., *et al.* **-429T/C and -374T/A polymorphisms of RAGE gene promoter are not associated with diabetic retinopathy in Chinese patients with type 2 diabetes.** *Diabetes Care* 26(9): 2696-2697,2003.

JOHANSEN, J. S., *et al.* **Oxidative stress and the use of antioxidants in diabetes: linking basic science to clinical practice.** *Cardiovasc Diabetol* 4: 5,2005.

JOO, K. W., *et al.* **MCP-1 and RANTES polymorphisms in Korean diabetic end-stage renal disease.** *J Korean Med Sci* 22(4): 611-615,2007.

JORISSEN, R. N., *et al.* **Epidermal growth factor receptor: mechanisms of activation and signalling.** *Exp Cell Res* 284(1): 31-53,2003.

JOURDAN, T., *et al.* **Activation of the Nlrp3 inflammasome in infiltrating macrophages by endocannabinoids mediates beta cell loss in type 2 diabetes.** *Nat Med* 19(9): 1132-1140,2013.

JURANEK, J. K., *et al.* **RAGE deficiency improves postinjury sciatic nerve regeneration in type 1 diabetic mice.** *Diabetes* 62(3): 931-943,2013.

JURASCHEK, S. P., *et al.* **Associations of alternative markers of glycemia with hemoglobin A(1c) and fasting glucose.** *Clin Chem* 58(12): 1648-1655,2012.

KAHALY, G. J.EM. P. HANSEN. **Type 1 diabetes associated autoimmunity.** *Autoimmun Rev* 15(7): 644-648,2016.

KALEA, A. Z., *et al.* **RAGE: a novel biological and genetic marker for vascular disease.** *Clin Sci (Lond)* 116(8): 621-637,2009.

KALEA, A. Z., *et al.* **Alternative splicing of RAGE: roles in biology and disease.** Front Biosci (Landmark Ed) 16: 2756-2770,2011.

KALEV, I., *et al.* **CC-chemokine receptor CCR5-del32 mutation as a modifying pathogenetic factor in type I diabetes.** J Diabetes Complications 17(6): 387-391,2003.

KALLIONPAA, H., *et al.* **Innate immune activity is detected prior to seroconversion in children with HLA-conferred type 1 diabetes susceptibility.** Diabetes 63(7): 2402-2414,2014.

KALOUSOVA, M., *et al.* **Genetic predisposition to advanced glycation end products toxicity is related to prognosis of chronic hemodialysis patients.** Kidney Blood Press Res 33(1): 30-36,2010.

KAMAL, A., *et al.* **Association of vascular endothelial growth factor -634G/C and receptor for advanced glycation end products G82S gene polymorphisms with diabetic retinopathy.** Int J Ophthalmol 9(8): 1106-1111,2016.

KANDULA, R. S., V.E. **A Study of Lipid Profile in Patients with Type -2 Diabetes Mellitus.** Journal of Health Sciences 1(1): 23-26,2013.

KANG, P., *et al.* **Association of RAGE gene polymorphisms with type 2 diabetes mellitus, diabetic retinopathy and diabetic nephropathy.** Gene 500(1): 1-9,2012.

KANKOVA, K., *et al.* **Polymorphisms 1704G/T and 2184A/G in the RAGE gene are associated with antioxidant status.** Metabolism 50(10): 1152-1160,2001a.

KANKOVA, K., *et al.* **Haplotype analysis of the RAGE gene: identification of a haplotype marker for diabetic nephropathy in type 2 diabetes mellitus.** Nephrol Dial Transplant 20(6): 1093-1102,2005.

KANKOVA, K., *et al.* **Association of G82S polymorphism in the RAGE gene with skin complications in type 2 diabetes.** Diabetes Care 22(10): 1745,1999.

KANKOVA, K., *et al.* **Polymorphisms in the RAGE gene influence susceptibility to diabetes-associated microvascular dermatoses in NIDDM.** J Diabetes Complications 15(4): 185-192,2001b.

KANNEGANTI, T. D.EV. D. DIXIT. **Immunological complications of obesity.** Nat Immunol 13(8): 707-712,2012.

KARAVANAKI, K., *et al.* **Screening for associated autoimmunity in children and adolescents with type 1 diabetes mellitus (T1DM).** *Horm Res* 71(4): 201-206,2009.

KARTER, A. J., *et al.* **Educational disparities in rates of smoking among diabetic adults: the translating research into action for diabetes study.** *Am J Public Health* 98(2): 365-370,2008.

KARUNAKARAN, U.EK. G. PARK. **A systematic review of oxidative stress and safety of antioxidants in diabetes: focus on islets and their defense.** *Diabetes Metab J* 37(2): 106-112,2013.

KAWAI, T., *et al.* **-374 T/A polymorphism in RAGE gene is associated with onset of diabetes mellitus, atherosclerosis, and renal dysfunction in patients with hypertension.** *Clin Exp Hypertens* 35(3): 236-241,2013.

KENNEDY, A., *et al.* **Loss of CCR5 results in glucose intolerance in diet-induced obese mice.** *Am J Physiol Endocrinol Metab* 305(7): E897-906,2013.

KEOPHIPHATH, M., *et al.* **CCL5 promotes macrophage recruitment and survival in human adipose tissue.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 30(1): 39-45,2010.

KERSHNAR, A. K., *et al.* **Lipid abnormalities are prevalent in youth with type 1 and type 2 diabetes: the SEARCH for Diabetes in Youth Study.** *J Pediatr* 149(3): 314-319,2006.

KESHAVARZ, P., *et al.* **Lack of genetic susceptibility of KCNJ11 E23K polymorphism with risk of type 2 diabetes in an Iranian population.** *Endocr Res* 39(3): 120-125,2014.

KHARROUBI, A. T.EH. M. DARWISH. **Diabetes mellitus: The epidemic of the century.** *World J Diabetes* 6(6): 850-867,2015.

KIERDORF, K.EG. FRITZ. **RAGE regulation and signaling in inflammation and beyond.** *J Leukoc Biol* 94(1): 55-68,2013.

KIKUMOTO, Y., *et al.* **Sensitization to alloxan-induced diabetes and pancreatic cell apoptosis in acatalasemic mice.** *Biochim Biophys Acta* 1802(2): 240-246,2010.

KIM, W. J.EC. Y. PARK. **1,5-Anhydroglucitol in diabetes mellitus.** *Endocrine* 43(1): 33-40,2013.

KIM, W. U., *et al.* **Elevated matrix metalloproteinase-9 in patients with systemic sclerosis.** *Arthritis Res Ther* 7(1): R71-79,2005.

KINTSCHER, U., *et al.* **T-lymphocyte infiltration in visceral adipose tissue: a primary event in adipose tissue inflammation and the development of obesity-mediated insulin resistance.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 28(7): 1304-1310,2008.

KIRBIS, J., *et al.* **The -429 T/C and -374 T/A gene polymorphisms of the receptor of advanced glycation end products gene (RAGE) are not risk factors for coronary artery disease in Slovene population with type 2 diabetes.** *Coll Antropol* 28(2): 611-616,2004.

KIRKMAN, H. N. EG. F. GAETANI. **Mammalian catalase: a venerable enzyme with new mysteries.** *Trends Biochem Sci* 32(1): 44-50,2007.

KISLINGER, T., *et al.* **N(epsilon)-(carboxymethyl)lysine adducts of proteins are ligands for receptor for advanced glycation end products that activate cell signaling pathways and modulate gene expression.** *J Biol Chem* 274(44): 31740-31749,1999.

KITADE, H., *et al.* **CCR5 plays a critical role in obesity-induced adipose tissue inflammation and insulin resistance by regulating both macrophage recruitment and M1/M2 status.** *Diabetes* 61(7): 1680-1690,2012.

KITTUR, S. D., *et al.* **Linkage map of the short arm of human chromosome 11: location of the genes for catalase, calcitonin, and insulin-like growth factor II.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 82(15): 5064-5067,1985.

KLEIN, R., *et al.* **The Wisconsin epidemiologic study of diabetic retinopathy. II. Prevalence and risk of diabetic retinopathy when age at diagnosis is less than 30 years.** *Arch Ophthalmol* 102(4): 520-526,1984.

KLEINJAN, D. A. EL. A. LETTICE. **Long-range gene control and genetic disease.** *Adv Genet* 61: 339-388,2008.

KNIP, M., *et al.* **Dietary intervention in infancy and later signs of beta-cell autoimmunity.** *N Engl J Med* 363(20): 1900-1908,2010.

KOCH, M., *et al.* **Structural basis for ligand recognition and activation of RAGE.** *Structure* 18(10): 1342-1352,2010.

KODYDKOVA, J., *et al.* **Human catalase, its polymorphisms, regulation and changes of its activity in different diseases.** Folia Biol (Praha) 60(4): 153-167,2014.

KONDOH, K., *et al.* **Control of MAP kinase signaling to the nucleus.** Chromosoma 114(2): 86-91,2005.

KOONER, J. S., *et al.* **Genome-wide association study in individuals of South Asian ancestry identifies six new type 2 diabetes susceptibility loci.** Nat Genet 43(10): 984-989,2011.

KOSTELI, A., *et al.* **Weight loss and lipolysis promote a dynamic immune response in murine adipose tissue.** J Clin Invest 120(10): 3466-3479,2010.

KRAEMER, F. B.EH. N. GINSBERG. **Gerald M. Reaven, MD: Demonstration of the central role of insulin resistance in type 2 diabetes and cardiovascular disease.** Diabetes Care 37(5): 1178-1181,2014.

KRISHNAN, E., *et al.* **Hyperuricemia in young adults and risk of insulin resistance, prediabetes, and diabetes: a 15-year follow-up study.** Am J Epidemiol 176(2): 108-116,2012.

KROLEWSKI, A. S., *et al.* **Magnitude and determinants of coronary artery disease in juvenile-onset, insulin-dependent diabetes mellitus.** Am J Cardiol 59(8): 750-755,1987.

KUHTREIBER, W. M., *et al.* **Low levels of C-peptide have clinical significance for established Type 1 diabetes.** Diabet Med 32(10): 1346-1353,2015.

KUMARAMANICKAVEL, G., *et al.* **Association of Gly82Ser polymorphism in the RAGE gene with diabetic retinopathy in type II diabetic Asian Indian patients.** J Diabetes Complications 16(6): 391-394,2002.

KUZIEL, W. A., *et al.* **CCR5 deficiency is not protective in the early stages of atherogenesis in apoE knockout mice.** Atherosclerosis 167(1): 25-32,2003.

LAFKY, J. M., *et al.* **Clinical implications of the ErbB/epidermal growth factor (EGF) receptor family and its ligands in ovarian cancer.** Biochim Biophys Acta 1785(2): 232-265,2008.

LAHIRI, D. K.E.J. I. NURNBERGER, JR. **A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies.** Nucleic Acids Res 19(19): 5444,1991.

LAING, S. P., *et al.* **Mortality from cerebrovascular disease in a cohort of 23 000 patients with insulin-treated diabetes.** Stroke 34(2): 418-421,2003a.

LAING, S. P., *et al.* **Mortality from heart disease in a cohort of 23,000 patients with insulin-treated diabetes.** Diabetologia 46(6): 760-765,2003b.

LANGENBERG, C.EL. A. LOTTA. **Genomic insights into the causes of type 2 diabetes.** Lancet 391(10138): 2463-2474,2018.

LEITE, N. C., *et al.* **Prevalence and associated factors of non-alcoholic fatty liver disease in patients with type-2 diabetes mellitus.** Liver Int 29(1): 113-119,2009.

LENZEN, S., *et al.* **Low antioxidant enzyme gene expression in pancreatic islets compared with various other mouse tissues.** Free Radic Biol Med 20(3): 463-466,1996.

LERARIO, A. C. **Diabete melito: aspectos epidemiológicos.** Arq Bras Cardiol 8(5): 7,1998.

LERARIO, A. C., *et al.* **Risk factors in obese women, with particular reference to visceral fat component.** Diabetes Metab 23(1): 68-74,1997.

LESLIE, R. D., *et al.* **Diabetes classification: grey zones, sound and smoke: Action LADA 1.** Diabetes Metab Res Rev 24(7): 511-519,2008.

LI, C., *et al.* **Metabolic syndrome, diabetes, and hyperuricemia.** Curr Opin Rheumatol 25(2): 210-216,2013.

LI, S., *et al.* **Prevalence of diabetes mellitus and impaired fasting glucose, associated with risk factors in rural Kazakh adults in Xinjiang, China.** Int J Environ Res Public Health 12(1): 554-565,2015.

LIN, S. Y., *et al.* **Nuclear localization of EGF receptor and its potential new role as a transcription factor.** Nat Cell Biol 3(9): 802-808,2001.

LINDHOLM, E., *et al.* **Association between LTA, TNF and AGER polymorphisms and late diabetic complications.** PLoS One 3(6): e2546,2008.

LINDHOLM, E., *et al.* **The -374 T/A polymorphism in the gene encoding RAGE is associated with diabetic nephropathy and retinopathy in type 1 diabetic patients.** *Diabetologia* 49(11): 2745-2755,2006.

LINDSEY, J. B., *et al.* **Receptor for advanced glycation end-products (RAGE) and soluble RAGE (sRAGE): cardiovascular implications.** *Diab Vasc Dis Res* 6(1): 7-14,2009.

LIPINSKI, B. **Pathophysiology of oxidative stress in diabetes mellitus.** *J Diabetes Complications* 15(4): 203-210,2001.

LIU, B., *et al.* **The novel chemokine receptor, G-protein-coupled receptor 75, is expressed by islets and is coupled to stimulation of insulin secretion and improved glucose homeostasis.** *Diabetologia* 56(11): 2467-2476,2013.

LIU, H., *et al.* **Polymorphism in RANTES chemokine promoter affects HIV-1 disease progression.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(8): 4581-4585,1999a.

LIU, H., *et al.* **Distribution of HIV-1 disease modifying regulated on activation normal T cell expressed and secreted haplotypes in Asian, African and Caucasian individuals. French ALT and IMMUNOCO Study Group.** *AIDS* 13(18): 2602-2603,1999b.

LIU, Y., *et al.* **Association between catalase gene polymorphisms and risk of chronic hepatitis B, hepatitis B virus-related liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma in Guangxi population: a case-control study.** *Medicine (Baltimore)* 94(13): e702,2015.

LO, S. F., *et al.* **Association of rheumatoid arthritis risk with EGFR genetic polymorphisms in Taiwan's Han Chinese population.** *Rheumatol Int* 32(8): 2301-2306,2012.

LOGUE, J., *et al.* **BMI and mortality among adults with incident type 2 diabetes.** *N Engl J Med* 370(14): 1362,2014.

LOHMANN, T., *et al.* **Reduced expression of Th1-associated chemokine receptors on peripheral blood lymphocytes at diagnosis of type 1 diabetes.** *Diabetes* 51(8): 2474-2480,2002.

LONG, A. N.ES. DAGOGO-JACK. **Comorbidities of diabetes and hypertension: mechanisms and approach to target organ protection.** *J Clin Hypertens (Greenwich)* 13(4): 244-251,2011.

LONTCHI-YIMAGOU, E., *et al.* **Diabetes mellitus and inflammation.** *Curr Diab Rep* 13(3): 435-444,2013.

LOTTA, L. A., *et al.* **Association Between Low-Density Lipoprotein Cholesterol-Lowering Genetic Variants and Risk of Type 2 Diabetes: A Meta-analysis.** *JAMA* 316(13): 1383-1391,2016.

LOTUFO, P. A., *et al.* **Diabetes and all-cause and coronary heart disease mortality among US male physicians.** *Arch Intern Med* 161(2): 242-247,2001.

LU, C. C., *et al.* **1,5-Anhydroglucitol Levels in Type 2 Diabetic and Non-Diabetic Subjects in Southern Taiwan.** *Arq Bras Endocrinol Metab* 47(6): 05,2003.

LU, L., *et al.* **Increased glycated albumin and decreased esRAGE concentrations are associated with in-stent restenosis in Chinese diabetic patients.** *Clin Chim Acta* 396(1-2): 33-37,2008.

LUMENG, C. N., *et al.* **Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization.** *J Clin Invest* 117(1): 175-184,2007a.

LUMENG, C. N., *et al.* **Increased inflammatory properties of adipose tissue macrophages recruited during diet-induced obesity.** *Diabetes* 56(1): 16-23,2007b.

LUTEREK-PUSZYNSKA, K., *et al.* **CD28, CTLA-4 and CCL5 gene polymorphisms in patients with rheumatoid arthritis.** *Clin Rheumatol* 36(5): 1129-1135,2017.

LYSSENKO, V., *et al.* **Clinical risk factors, DNA variants, and the development of type 2 diabetes.** *N Engl J Med* 359(21): 2220-2232,2008.

MAAHS, D. M., *et al.* **Hypertension prevalence, awareness, treatment, and control in an adult type 1 diabetes population and a comparable general population.** *Diabetes Care* 28(2): 301-306,2005.

MACISAAC, R. J., *et al.* **Markers of and risk factors for the development and progression of diabetic kidney disease.** *Am J Kidney Dis* 63(2 Suppl 2): S39-62,2014.

MACKAY, C. R. **Chemokines: what chemokine is that?** *Curr Biol* 7(6): R384-386,1997.

MADONNA, R.ER. DE CATERINA. **Cellular and molecular mechanisms of vascular injury in diabetes--part I: pathways of vascular disease in diabetes.** Vascul Pharmacol 54(3-6): 68-74,2011.

MAGALHÃES, M. J. S., *et al.* **Epidemiological profile of diabetes mellitus in the population of a maranhense municipal.** Revista Eletrônica Acervo Saúde 9: 8,2017.

MAHMOODI, K., *et al.* **Plasma concentration, genetic variation, and gene expression levels of matrix metalloproteinase 9 in Iranian patients with coronary artery disease.** J Res Med Sci 22: 8,2017.

MAK, J. C., *et al.* **Polymorphisms in manganese superoxide dismutase and catalase genes: functional study in Hong Kong Chinese asthma patients.** Clin Exp Allergy 36(4): 440-447,2006.

MAKRILAKIS, K., *et al.* **Correlation of family history of obesity and diabetes mellitus with the BMI of Greek medical students.** Nutr Metab Cardiovasc Dis 18(3): e7-8,2008.

MAKRYGIANNIS, G., *et al.* **Risk Factor Assessment in a Greek Cohort of Patients With Large Abdominal Aortic Aneurysms.** Angiology: 3319718774474,2018.

MALACHIAS, M. V. B., *et al.* **7ª Diretriz Brasileira de Hipertensão Arterial.** Arquivos Brasileiros de Cardiologia 107(3): 83,2016.

MALERBI, D. A.EL. J. FRANCO. **Multicenter study of the prevalence of diabetes mellitus and impaired glucose tolerance in the urban Brazilian population aged 30-69 yr. The Brazilian Cooperative Group on the Study of Diabetes Prevalence.** Diabetes Care 15(11): 1509-1516,1992.

MANTOVANI, A., *et al.* **Severe hypoglycemia in patients with known diabetes requiring emergency department care: A report from an Italian multicenter study.** J Clin Transl Endocrinol 5: 46-52,2016.

MARTIN, P., *et al.* **Epidermal Growth Factor Receptor-Targeted Agents for Lung Cancer.**2006.

MARTIN, P., *et al.* **Epidermal growth factor receptor-targeted agents for lung cancer.** Cancer Control 13(2): 129-140,2006.

MARTINSON, J. J., *et al.* **Global distribution of the CCR5 gene 32-basepair deletion.** *Nat Genet* 16(1): 100-103,1997.

MASUOKA, N., *et al.* **Characterization of hydrogen peroxide removal reaction by hemoglobin in the presence of reduced pyridine nucleotides.** *Biochim Biophys Acta* 1637(1): 46-54,2003.

MASUOKA, N., *et al.* **Spectrophotometric determination of hydrogen peroxide: catalase activity and rates of hydrogen peroxide removal by erythrocytes.** *Clin Chim Acta* 254(2): 101-112,1996.

MATES, J. M. EF. SANCHEZ-JIMENEZ. **Antioxidant enzymes and their implications in pathophysiologic processes.** *Front Biosci* 4: D339-345,1999.

MATHEUS, A. S., *et al.* **[Dyslipidemias in type 1 diabetes: a current approach].** *Arq Bras Endocrinol Metabol* 52(2): 334-339,2008.

MATHEUS, A. S. M., *et al.* **Dislipidemias no Diabetes Mellito Tipo 1: Abordagem Atual.** *Arq Bras Endocrinol Metab* 52(2): 6,2008.

MATOU-NASRI, S., *et al.* **Biological impact of advanced glycation endproducts on estrogen receptor-positive MCF-7 breast cancer cells.** *Biochim Biophys Acta* 1863(11): 2808-2820,2017.

MATSUSHIMA, M., *et al.* **Geographic variation in mortality among individuals with youth-onset diabetes mellitus across the world. DERI Mortality Study Group. Diabetes Epidemiology Research International.** *Diabetologia* 40(2): 212-216,1997.

MATTER, C. M. EC. HANDSCHIN. **RANTES (regulated on activation, normal T cell expressed and secreted), inflammation, obesity, and the metabolic syndrome.** *Circulation* 115(8): 946-948,2007.

MAYER-DAVIS, E. J., *et al.* **Incidence Trends of Type 1 and Type 2 Diabetes among Youths, 2002-2012.** *N Engl J Med* 377(3): 301,2017.

MAYER, T. K. EZ. R. FREEDMAN. **Protein glycosylation in diabetes mellitus: a review of laboratory measurements and of their clinical utility.** *Clin Chim Acta* 127(2): 147-184,1983.

MCCARTHY, M. I. **Genomics, type 2 diabetes, and obesity.** *N Engl J Med* 363(24): 2339-2350,2010.

MCCARTHY, M. I. **The importance of global studies of the genetics of type 2 diabetes.** *Diabetes Metab J* 35(2): 91-100,2011.

MCDERMOTT, D. H., *et al.* **Chemokine RANTES promoter polymorphism affects risk of both HIV infection and disease progression in the Multicenter AIDS Cohort Study.** *AIDS* 14(17): 2671-2678,2000.

MCDERMOTT, D. H., *et al.* **CCL2 polymorphisms are associated with serum monocyte chemoattractant protein-1 levels and myocardial infarction in the Framingham Heart Study.** *Circulation* 112(8): 1113-1120,2005.

MCEVER, R. P. **Selectins: initiators of leucocyte adhesion and signalling at the vascular wall.** *Cardiovasc Res* 107(3): 331-339,2015.

MCINTOSH, E. D.EM. A. MENSER. **A fifty-year follow-up of congenital rubella.** *Lancet* 340(8816): 414-415,1992.

MCLAUGHLIN, T., *et al.* **T-cell profile in adipose tissue is associated with insulin resistance and systemic inflammation in humans.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 34(12): 2637-2643,2014.

MEDLEY, T. L., *et al.* **Matrix metalloproteinase-9 genotype influences large artery stiffness through effects on aortic gene and protein expression.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24(8): 1479-1484,2004.

MENKE, A., *et al.* **The prevalence of type 1 diabetes in the United States.** *Epidemiology* 24(5): 773-774,2013.

MERGER, S. R., *et al.* **Prevalence and comorbidities of double diabetes.** *Diabetes Res Clin Pract* 119: 48-56,2016.

MESHKANI, R.ES. VAKILI. **Tissue resident macrophages: Key players in the pathogenesis of type 2 diabetes and its complications.** *Clin Chim Acta* 462: 77-89,2016.

MHMOUD, N., *et al.* **Association of IL-10 and CCL5 single nucleotide polymorphisms with tuberculosis in the Sudanese population.** *Trop Med Int Health* 18(9): 1119-1127,2013.

MIKOLAJCZYK, T. P., *et al.* **Role of chemokine RANTES in the regulation of perivascular inflammation, T-cell accumulation, and vascular dysfunction in hypertension.** *FASEB J* 30(5): 1987-1999,2016.

MIRHAFEZ, S. R., *et al.* **Cytokine and growth factor profiling in patients with the metabolic syndrome.** Br J Nutr 113(12): 1911-1919,2015.

MISHRA, G., *et al.* **Genetic polymorphisms of CCL2, CCL5, CCR2 and CCR5 genes in Sahariya tribe of North Central India: an association study with pulmonary tuberculosis.** Infect Genet Evol 12(5): 1120-1127,2012.

MISSIOU, A., *et al.* **CD40L induces inflammation and adipogenesis in adipose cells--a potential link between metabolic and cardiovascular disease.** Thromb Haemost 103(4): 788-796,2010.

MITCHELL, B. D., *et al.* **Differences in the prevalence of diabetes and impaired glucose tolerance according to maternal or paternal history of diabetes.** Diabetes Care 16(9): 1262-1267,1993.

MOGENSEN, C. E. **Microalbuminuria and hypertension with focus on type 1 and type 2 diabetes.** J Intern Med 254(1): 45-66,2003.

MOGHAL, N.EP. W. STERNBERG. **Multiple positive and negative regulators of signaling by the EGF-receptor.** Curr Opin Cell Biol 11(2): 190-196,1999.

MOLBAK, A. G., *et al.* **Incidence of insulin-dependent diabetes mellitus in age groups over 30 years in Denmark.** Diabet Med 11(7): 650-655,1994.

MOLET, S., *et al.* **Increase in macrophage elastase (MMP-12) in lungs from patients with chronic obstructive pulmonary disease.** Inflamm Res 54(1): 31-36,2005.

MONNEY, L., *et al.* **Th1-specific cell surface protein Tim-3 regulates macrophage activation and severity of an autoimmune disease.** Nature 415(6871): 536-541,2002.

MORIAI, T., *et al.* **A variant epidermal growth factor receptor exhibits altered type alpha transforming growth factor binding and transmembrane signaling.** Proc Natl Acad Sci U S A 91(21): 10217-10221,1994.

MORIUCHI, H., *et al.* **Nuclear factor-kappa B potently up-regulates the promoter activity of RANTES, a chemokine that blocks HIV infection.** J Immunol 158(7): 3483-3491,1997.

MORIWAKI, Y., *et al.* **Renal clearances of purine bases and oxypurinol during glucose infusion.** Adv Exp Med Biol 370: 39-42,1994.

MORRISH, N. J., *et al.* **Mortality and causes of death in the WHO Multinational Study of Vascular Disease in Diabetes.** Diabetologia 44 Suppl 2: S14-21,2001.

MUIR, A., *et al.* **The pathogenesis, prediction, and prevention of insulin-dependent diabetes mellitus.** Endocrinol Metab Clin North Am 21(2): 199-219,1992.

MURDOCH, C.EA. FINN. **Chemokine receptors and their role in inflammation and infectious diseases.** Blood 95(10): 3032-3043,2000.

MUSCAT, J. E., *et al.* **Cholesterol screening in a community health promotion program: epidemiologic results from a biracial population.** Public Health Rep 109(1): 93-98,1994.

NAKA, C. L., *et al.* **The Gly82Ser polymorphism of the receptor of advanced glycation end product (RAGE) gene is not associated with type 1 or type 2 diabetes in a Brazilian population.** Diabetes Care 29(3): 712-713,2006.

NAKA, Y., *et al.* **RAGE axis: Animal models and novel insights into the vascular complications of diabetes.** Arterioscler Thromb Vasc Biol 24(8): 1342-1349,2004.

NAKAJIMA, K., *et al.* **RANTES promoter genotype is associated with diabetic nephropathy in type 2 diabetic subjects.** Diabetes Care 26(3): 892-898,2003.

NATHAN, D. M. **Navigating the choices for diabetes prevention.** N Engl J Med 362(16): 1533-1535,2010.

NATHAN, D. M., *et al.* **Intensive diabetes therapy and carotid intima-media thickness in type 1 diabetes mellitus.** N Engl J Med 348(23): 2294-2303,2003.

NAUCK, M., *et al.* **Efficacy and safety comparison of liraglutide, glimepiride, and placebo, all in combination with metformin, in type 2 diabetes: the LEAD (liraglutide effect and action in diabetes)-2 study.** Diabetes Care 32(1): 84-90,2009.

NAVRATILOVA, Z. **Polymorphisms in CCL2&CCL5 chemokines/chemokine receptors genes and their association with diseases.** Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub 150(2): 191-204,2006.

NAVRATILOVA, Z., *et al.* **Matrix Metalloproteinases and Their Inhibitors in Chronic Obstructive Pulmonary Disease.** Arch Immunol Ther Exp (Warsz) 64(3): 177-193,2016.

NAZIR, N., *et al.* **Meta-analysis of diabetic nephropathy associated genetic variants in inflammation and angiogenesis involved in different biochemical pathways.** BMC Med Genet 15: 103,2014.

NEDERSTIGT, C., *et al.* **Incidence and prevalence of thyroid dysfunction in type 1 diabetes.** J Diabetes Complications 30(3): 420-425,2016.

NEEPER, M., *et al.* **Cloning and expression of a cell surface receptor for advanced glycosylation end products of proteins.** J Biol Chem 267(21): 14998-15004,1992.

NG, Z. X., *et al.* **Association analysis of -429T/C and -374T/A polymorphisms of receptor of advanced glycation end products (RAGE) gene in Malaysian with type 2 diabetic retinopathy.** Diabetes Res Clin Pract 95(3): 372-377,2012.

NGUYEN, K. D., *et al.* **Alternatively activated macrophages produce catecholamines to sustain adaptive thermogenesis.** Nature 480(7375): 104-108,2011.

NGUYEN, M., *et al.* **Human endothelial gelatinases and angiogenesis.** Int J Biochem Cell Biol 33(10): 960-970,2001.

NGUYEN, M. T., *et al.* **A subpopulation of macrophages infiltrates hypertrophic adipose tissue and is activated by free fatty acids via Toll-like receptors 2 and 4 and JNK-dependent pathways.** J Biol Chem 282(48): 35279-35292,2007.

NICKEL, R. G., *et al.* **Atopic dermatitis is associated with a functional mutation in the promoter of the C-C chemokine RANTES.** J Immunol 164(3): 1612-1616,2000.

NILSSON, A. L., *et al.* **Serological evaluation of possible exposure to Ljungan virus and related parechovirus in autoimmune (type 1) diabetes in children.** J Med Virol 87(7): 1130-1140,2015.

NISHINAKA, T. & C. YABE-NISHIMURA. **EGF receptor-ERK pathway is the major signaling pathway that mediates upregulation of aldose reductase expression under oxidative stress.** Free Radic Biol Med 31(2): 205-216,2001.

NIU, W., *et al.* **A meta-analysis of receptor for advanced glycation end products gene: four well-evaluated polymorphisms with diabetes mellitus.** Mol Cell Endocrinol 358(1): 9-17,2012.

NOSALSKI, R.ET. J. GUZIK. **Perivascular adipose tissue inflammation in vascular disease.** Br J Pharmacol 174(20): 3496-3513,2017.

NYATI, M. K., *et al.* **Integration of EGFR inhibitors with radiochemotherapy.** Nat Rev Cancer 6(11): 876-885,2006.

O'ROURKE, R. W., *et al.* **Hypoxia-induced inflammatory cytokine secretion in human adipose tissue stromovascular cells.** Diabetologia 54(6): 1480-1490,2011.

ODEGAARD, J. I., *et al.* **Macrophage-specific PPARgamma controls alternative activation and improves insulin resistance.** Nature 447(7148): 1116-1120,2007.

OH, D. Y., *et al.* **Increased macrophage migration into adipose tissue in obese mice.** Diabetes 61(2): 346-354,2012.

OLIVA, J. L., *et al.* **PKC isozymes and diacylglycerol-regulated proteins as effectors of growth factor receptors.** Growth Factors 23(4): 245-252,2005.

OLIVEIRA, L. B., *et al.* **Prevalência de dislipidemias e fatores de riscos associados.** J. Health Biol. Sci. 5(4): 6,2017.

OPDENAKKER, G.EJ. VAN DAMME. **Cytokine-regulated proteases in autoimmune diseases.** Immunol Today 15(3): 103-107,1994.

ORAM, R. A., *et al.* **A Type 1 Diabetes Genetic Risk Score Can Aid Discrimination Between Type 1 and Type 2 Diabetes in Young Adults.** Diabetes Care 39(3): 337-344,2016.

OSAKI, A., *et al.* **Renal threshold for glucose reabsorption predicts diabetes improvement by sodium-glucose cotransporter 2 inhibitor therapy.** J Diabetes Investig 7(5): 751-754,2016.

OTT, C., *et al.* **Role of advanced glycation end products in cellular signaling.** Redox Biol 2: 411-429,2014.

OWEN, K. R.EM. I. MCCARTHY. **Genetics of type 2 diabetes.** Curr Opin Genet Dev 17(3): 239-244,2007.

PACAL, L., *et al.* **Parameters of oxidative stress, DNA damage and DNA repair in type 1 and type 2 diabetes mellitus.** Arch Physiol Biochem 117(4): 222-230,2011.

PAGE-MCCAW, A., *et al.* **Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling.** *Nat Rev Mol Cell Biol* 8(3): 221-233,2007.

PALMA, C. C., *et al.* **Prevalence of thyroid dysfunction in patients with diabetes mellitus.** *Diabetol Metab Syndr* 5(1): 58,2013.

PAN, H., *et al.* **The relationship between RAGE gene four common polymorphisms and breast cancer risk in northeastern Han Chinese.** *Sci Rep* 4: 4355,2014.

PAN, H., *et al.* **Contributory role of five common polymorphisms of RAGE and APE1 genes in lung cancer among Han Chinese.** *PLoS One* 8(7): e69018,2013.

PARRINELLO, C. M.EE. SELVIN. **Beyond HbA1c and glucose: the role of nontraditional glycemic markers in diabetes diagnosis, prognosis, and management.** *Curr Diab Rep* 14(11): 548,2014.

PASK, R., *et al.* **No evidence for a major effect of two common polymorphisms of the catalase gene in type 1 diabetes susceptibility.** *Diabetes Metab Res Rev* 22(5): 356-360,2006.

PENAFORTE-SABOIA, J. G., *et al.* **Microvascular Complications in Type 1 Diabetes: A Comparative Analysis of Patients Treated with Autologous Nonmyeloablative Hematopoietic Stem-Cell Transplantation and Conventional Medical Therapy.** *Front Endocrinol (Lausanne)* 8: 331,2017.

PENG, W. H., *et al.* **RAGE gene polymorphisms are associated with circulating levels of endogenous secretory RAGE but not with coronary artery disease in Chinese patients with type 2 diabetes mellitus.** *Arch Med Res* 40(5): 393-398,2009.

PERIANAYAGAM, M. C., *et al.* **NADPH oxidase p22phox and catalase gene variants are associated with biomarkers of oxidative stress and adverse outcomes in acute renal failure.** *J Am Soc Nephrol* 18(1): 255-263,2007.

PERROS, P., *et al.* **Frequency of thyroid dysfunction in diabetic patients: value of annual screening.** *Diabet Med* 12(7): 622-627,1995.

PETROVIC, D. **Association of the -262C/T polymorphism in the catalase gene promoter and the C242T polymorphism of the NADPH oxidase P22phox gene with essential arterial hypertension in patients with diabetes mellitus type 2.** *Clin Exp Hypertens* 36(1): 36-39,2014.

PETTERSSON-FERNHOLM, K., *et al.* **The functional -374 T/A RAGE gene polymorphism is associated with proteinuria and cardiovascular disease in type 1 diabetic patients.** *Diabetes* 52(3): 891-894,2003.

PETTIGREW, K. A., *et al.* **Resequencing of the CCL5 and CCR5 genes and investigation of variants for association with diabetic nephropathy.** *J Hum Genet* 55(4): 248-251,2010.

PFEIFFER, A.EH. SCHATZ. **Diabetic microvascular complications and growth factors.** *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 103(1): 7-14,1995.

PFLEGER, C., *et al.* **Relation of circulating concentrations of chemokine receptor CCR5 ligands to C-peptide, proinsulin and HbA1c and disease progression in type 1 diabetes.** *Clin Immunol* 128(1): 57-65,2008.

PICHETH, G., *et al.* **The -374A allele of the receptor for advanced glycation end products (RAGE) gene promoter is a protective factor against cardiovascular lesions in type 2 diabetes mellitus patients.** *Clin Chem Lab Med* 45(10): 1268-1272,2007a.

PICHETH, G., *et al.* **The -429 T>C polymorphism of the receptor for advanced glycation end products (RAGE) is associated with type 1 diabetes in a Brazilian population.** *Clin Chim Acta* 383(1-2): 163-164,2007b.

PICHETH, G., *et al.* (2007c). **The -429 T>C polymorphism of the receptor for advanced glycation end products (RAGE) is associated with type 1 diabetes in a Brazilian population.** *Clin Chim Acta*. Netherlands. 383: 163-164.

PIMENTA, W. P., *et al.* **[Thyroid disorders in diabetic patients].** *Arq Bras Endocrinol Metabol* 49(2): 234-240,2005.

PITKANEN, E. **Serum 1,5-anhydroglucitol in normal subjects and in patients with insulin-dependent diabetes mellitus.** *Scand J Clin Lab Invest* 42(5): 445-448,1982.

PLESKOVIC, A., *et al.* **Matrix metalloproteinase-3 gene polymorphism (rs3025058) affects markers atherosclerosis in type 2 diabetes mellitus.** *Vasa* 46(5): 363-369,2017.

POGGI, M., *et al.* **CD40L deficiency ameliorates adipose tissue inflammation and metabolic manifestations of obesity in mice.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 31(10): 2251-2260,2011.

POGGI, M., *et al.* **The inflammatory receptor CD40 is expressed on human adipocytes: contribution to crosstalk between lymphocytes and adipocytes.** *Diabetologia* 52(6): 1152-1163,2009.

POIRIER, O., *et al.* **Polymorphism screening of four genes encoding advanced glycation end-product putative receptors. Association study with nephropathy in type 1 diabetic patients.** *Diabetes* 50(5): 1214-1218,2001.

POON, P. Y., *et al.* **Relation between polymorphisms of receptor for advanced glycation end products (RAGE) and cardiovascular diseases in Chinese patients with diabetic nephropathy.** *Clin Nephrol* 73(1): 44-50,2010.

POSADAS-ROMERO, C., *et al.* **Cholesterol levels and prevalence of hypercholesterolemia in a Mexican adult population.** *Atherosclerosis* 118(2): 275-284,1995.

POZZILLI, P. EU. DI MARIO. **Autoimmune diabetes not requiring insulin at diagnosis (latent autoimmune diabetes of the adult): definition, characterization, and potential prevention.** *Diabetes Care* 24(8): 1460-1467,2001.

PRASAD, P., *et al.* **Association analysis of ADPRT1, AKR1B1, RAGE, GFPT2 and PAI-1 gene polymorphisms with chronic renal insufficiency among Asian Indians with type-2 diabetes.** *BMC Med Genet* 11: 52,2010.

PREVOST, G., *et al.* **Human RAGE GLY82SER dimorphism and HLA class II DRB1-DQA1-DQB1 haplotypes in type 1 diabetes.** *Eur J Immunogenet* 26(5): 343-348,1999.

PRICE, P., *et al.* **Can MHC class II genes mediate resistance to type 1 diabetes?** *Immunol Cell Biol* 79(6): 602-606,2001.

QIAO, Q., *et al.* **Age- and sex-specific prevalence of diabetes and impaired glucose regulation in 11 Asian cohorts.** *Diabetes Care* 26(6): 1770-1780,2003.

QIN, X., *et al.* **The RANTES gene promoter polymorphisms are associated with the risk of atherothrombotic cerebral infarction in Northern Han Chinese.** *Clin Chim Acta* 412(11-12): 1112-1115,2011.

QIU, Y., *et al.* **Eosinophils and type 2 cytokine signaling in macrophages orchestrate development of functional beige fat.** *Cell* 157(6): 1292-1308,2014.

RADAIDEH, A. R., et al. Thyroid dysfunction in patients with type 2 diabetes mellitus in Jordan. Saudi Med J 25(8): 1046-1050,2004.

RAHIMI, R., et al. A review on the role of antioxidants in the management of diabetes and its complications. Biomed Pharmacother 59(7): 365-373,2005.

RAI, V., et al. Signal transduction in receptor for advanced glycation end products (RAGE): solution structure of C-terminal rage (ctRAGE) and its binding to mDia1. J Biol Chem 287(7): 5133-5144,2012.

RAM, M., et al. Matrix metalloproteinase-9 and autoimmune diseases. J Clin Immunol 26(4): 299-307,2006.

RAM, R.EG. MORAHAN. Effects of Type 1 Diabetes Risk Alleles on Immune Cell Gene Expression. Genes (Basel) 8(6),2017.

RAMACHANDRAN, A., et al. Type 2 diabetes in Asian-Indian urban children. Diabetes Care 26(4): 1022-1025,2003.

RAMAKRISHNA, V.ER. JAILKHANI. Oxidative stress in non-insulin-dependent diabetes mellitus (NIDDM) patients. Acta Diabetol 45(1): 41-46,2008.

RAMAN, R., et al. Prevalence and risk factors for diabetic microvascular complications in newly diagnosed type II diabetes mellitus. Sankara Nethralaya Diabetic Retinopathy Epidemiology and Molecular Genetic Study (SN-DREAMS, report 27). J Diabetes Complications 26(2): 123-128,2012.

RAMASAMY, V., et al. Value of baseline serum thyrotropin as a predictor of hypothyroidism in patients with diabetes mellitus. Endocr Pract 17(1): 26-32,2011.

RAMNATH, R. D.EM. BHATIA. Substance P treatment stimulates chemokine synthesis in pancreatic acinar cells via the activation of NF-kappaB. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 291(6): G1113-1119,2006.

RAMOS, A. J. S., et al. Prevalência de doença tireoideana em pacientes com diabetes tipo 1. Arq. Bras. Endocrinol. Metabol. 47(02): 06,2003.

RAMPRASAD, S., et al. Rage gene promoter polymorphisms and diabetic retinopathy in a clinic-based population from South India. Eye (Lond) 21(3): 395-401,2007.

RASHID, K., *et al.* **An update on oxidative stress-mediated organ pathophysiology.** Food Chem Toxicol 62: 584-600,2013.

RASKA, I., JR., *et al.* **Prevalence and Risk Factors of Osteoporosis in Postmenopausal Women with Type 2 Diabetes Mellitus.** Cent Eur J Public Health 25(1): 3-10,2017.

RASTOGI KALYANI, R. M. D. M. H. S.EV. M. D. WALKER HARRIS. **Alternative markers of glycemia: fructosamine, glycated albumin, 1,5-AG.**2014.

RAUSCH, M. E., *et al.* **Obesity in C57BL/6J mice is characterized by adipose tissue hypoxia and cytotoxic T-cell infiltration.** Int J Obes (Lond) 32(3): 451-463,2008.

RAY, P., *et al.* **Statistical evaluation of a biomarker.** Anesthesiology 112(4): 1023-1040,2010.

REAVEN, G. M. **Banting lecture 1988. Role of insulin resistance in human disease.** Diabetes 37(12): 1595-1607,1988.

REBAI, M., *et al.* **Association of EGFR and HER2 polymorphisms with risk and clinical features of thyroid cancer.** Genet Test Mol Biomarkers 13(6): 779-784,2009.

RECH, T. F., *et al.* **Matrix metalloproteinase gene polymorphisms and susceptibility to systemic sclerosis.** Genet Mol Res 15(4),2016.

REDONDO, M. J. **LADA: time for a new definition.** Diabetes 62(2): 339-340,2013.

REDONDO, M. J., *et al.* **Genetics of type 1 diabetes.** Pediatr Diabetes,2017.

REDONDO, M. J., *et al.* **Genetics of type 1 diabetes.** Pediatr Diabetes 19(3): 346-353,2018.

REMIG, V., *et al.* **Trans fats in America: a review of their use, consumption, health implications, and regulation.** J Am Diet Assoc 110(4): 585-592,2010.

REUSCH, J. E. **Diabetes, microvascular complications, and cardiovascular complications: what is it about glucose?** J Clin Invest 112(7): 986-988,2003.

REYNOLDS, K., *et al.* **Prevalence of tobacco use and association between cardiometabolic risk factors and cigarette smoking in youth with type 1 or type 2 diabetes mellitus.** J Pediatr 158(4): 594-601 e591,2011.

RICHARDSON, A. C.EM. W. CARPENTER. **Inflammatory mediators in gestational diabetes mellitus.** Obstet Gynecol Clin North Am 34(2): 213-224, viii,2007.

RICHARDSON, S. J.EM. S. HORWITZ. **Is type 1 diabetes "going viral"?** Diabetes 63(7): 2203-2205,2014.

RITTER, A. M. V., *et al.* **The rs243866/243865 polymorphisms in MMP-2 gene and the relationship with BP control in obese resistant hypertensive subjects.** Gene 646: 129-135,2018.

ROBERTSON, D. A., *et al.* **Is serum anhydroglucitol an alternative to the oral glucose tolerance test for diabetes screening? The Mauritius Noncommunicable Diseases Study Group.** Diabet Med 10(1): 56-60,1993.

ROBINSON, N., *et al.* **Social deprivation and mortality in adults with diabetes mellitus.** Diabet Med 15(3): 205-212,1998.

RODRIGUES, T. C., *et al.* **[Characterization of patients with type 1 diabetes mellitus in southern Brazil: chronic complications and associated factors].** Rev Assoc Med Bras (1992) 56(1): 67-73,2010.

RODRIGUEZ-FRADE, J. M., *et al.* **Similarities and differences in RANTES- and (AOP)-RANTES-triggered signals: implications for chemotaxis.** J Cell Biol 144(4): 755-765,1999.

ROGLIC, G., *et al.* **The burden of mortality attributable to diabetes: realistic estimates for the year 2000.** Diabetes Care 28(9): 2130-2135,2005.

ROLANDSSON, O.EJ. P. PALMER. **Latent autoimmune diabetes in adults (LADA) is dead: long live autoimmune diabetes!** Diabetologia 53(7): 1250-1253,2010.

RONTI, T., *et al.* **The endocrine function of adipose tissue: an update.** Clin Endocrinol (Oxf) 64(4): 355-365,2006.

ROPER, N. A., *et al.* **Excess mortality in a population with diabetes and the impact of material deprivation: longitudinal, population based study.** BMJ 322(7299): 1389-1393,2001.

ROSENBLOOM, A. L., *et al.* **Type 2 diabetes in children and adolescents.** *Pediatr Diabetes* 10 Suppl 12: 17-32,2009.

ROSENSON, R. S., *et al.* **Does microvascular disease predict macrovascular events in type 2 diabetes?** *Atherosclerosis* 218(1): 13-18,2011.

ROSENSTOCK, J. **Insulin therapy: optimizing control in type 1 and type 2 diabetes.** *Clin Cornerstone* 4(2): 50-64,2001.

ROSHAN, B.ER. C. STANTON. **A story of microalbuminuria and diabetic nephropathy.** *J Nephropathol* 2(4): 234-240,2013.

ROSSI, D.EA. ZLOTNIK. **The biology of chemokines and their receptors.** *Annu Rev Immunol* 18: 217-242,2000.

ROUHIAINEN, A., *et al.* **RAGE-mediated cell signaling.** *Methods Mol Biol* 963: 239-263,2013.

RUDOFISKY, G., JR., *et al.* **A 63bp deletion in the promoter of rage correlates with a decreased risk for nephropathy in patients with type 2 diabetes.** *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 112(3): 135-141,2004.

RYDEN, L., *et al.* **ESC Guidelines on diabetes, pre-diabetes, and cardiovascular diseases developed in collaboration with the EASD: the Task Force on diabetes, pre-diabetes, and cardiovascular diseases of the European Society of Cardiology (ESC) and developed in collaboration with the European Association for the Study of Diabetes (EASD).** *Eur Heart J* 34(39): 3035-3087,2013.

SAADI, H., *et al.* **Association of TCF7L2 polymorphism with diabetes mellitus, metabolic syndrome, and markers of beta cell function and insulin resistance in a population-based sample of Emirati subjects.** *Diabetes Res Clin Pract* 80(3): 392-398,2008.

SABBAH, E., *et al.* **Genetic, autoimmune, and clinical characteristics of childhood- and adult-onset type 1 diabetes.** *Diabetes Care* 23(9): 1326-1332,2000.

SACKS, D. B. **A1C versus glucose testing: a comparison.** *Diabetes Care* 34(2): 518-523,2011.

SACKS, D. B. **Hemoglobin A1c in diabetes: panacea or pointless?** Diabetes 62(1): 41-43,2013.

SACKS, D. B.EJ. M. MCDONALD. **The pathogenesis of type II diabetes mellitus. A polygenic disease.** Am J Clin Pathol 105(2): 149-156,1996.

SAEIDNIA, S.EM. ABDOLLAHI. **Toxicological and pharmacological concerns on oxidative stress and related diseases.** Toxicol Appl Pharmacol 273(3): 442-455,2013.

SAISHO, Y., *et al.* **Postprandial serum C-peptide to plasma glucose ratio as a predictor of subsequent insulin treatment in patients with type 2 diabetes.** Endocr J 58(4): 315-322,2011.

SAKAGUCHI, M., *et al.* **TIRAP, an adaptor protein for TLR2/4, transduces a signal from RAGE phosphorylated upon ligand binding.** PLoS One 6(8): e23132,2011.

SAKURAI, S., *et al.* **The AGE-RAGE system and diabetic nephropathy.** J Am Soc Nephrol 14(8 Suppl 3): S259-263,2003.

SALONEN, K. M., *et al.* **Circulating concentrations of soluble receptor for AGE are associated with age and AGER gene polymorphisms in children with newly diagnosed type 1 diabetes.** Diabetes Care 37(7): 1975-1981,2014.

SAMSON, M., *et al.* **Resistance to HIV-1 infection in caucasian individuals bearing mutant alleles of the CCR-5 chemokine receptor gene.** Nature 382(6593): 722-725,1996.

SANCHEZ-CASTANON, M., *et al.* **Polymorphisms in CCL5 promoter are associated with pulmonary tuberculosis in northern Spain.** Int J Tuberc Lung Dis 13(4): 480-485,2009.

SANTOS, K. G., *et al.* **The -374A allele of the receptor for advanced glycation end products gene is associated with a decreased risk of ischemic heart disease in African-Brazilians with type 2 diabetes.** Mol Genet Metab 85(2): 149-156,2005.

SARFRAZ, M., *et al.* **Prevalence and pattern of dyslipidemia in hyperglycemic patients and its associated factors among Pakistani population.** Saudi J Biol Sci 23(6): 761-766,2016.

SASAKI, H., *et al.* **EGFR R497K polymorphism is a favorable prognostic factor for advanced lung cancer.** J Cancer Res Clin Oncol 135(2): 313-318,2009.

SBD. CLANNAD. **Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes 2017-2018.**2017.

SCHEFFEL, R. S., *et al.* **[Prevalence of micro and macroangiopathic chronic complications and their risk factors in the care of out patients with type 2 diabetes mellitus].** Rev Assoc Med Bras (1992) 50(3): 263-267,2004.

SCHMIDT, A. M., *et al.* **Isolation and characterization of two binding proteins for advanced glycosylation end products from bovine lung which are present on the endothelial cell surface.** J Biol Chem 267(21): 14987-14997,1992.

SCOTT, M. D. **H₂O₂ injury in beta thalassemic erythrocytes: protective role of catalase and the prooxidant effects of GSH.** Free Radic Biol Med 40(7): 1264-1272,2006.

SCOTT, R. A., *et al.* **The link between family history and risk of type 2 diabetes is not explained by anthropometric, lifestyle or genetic risk factors: the EPIC-InterAct study.** Diabetologia 56(1): 60-69,2013.

SCOTT, W. K., *et al.* **Complete genomic screen in Parkinson disease: evidence for multiple genes.** JAMA 286(18): 2239-2244,2001.

SEBOLT-LEOPOLD, J. S.ER. HERRERA. **Targeting the mitogen-activated protein kinase cascade to treat cancer.** Nat Rev Cancer 4(12): 937-947,2004.

SEGURA-VALDEZ, L., *et al.* **Upregulation of gelatinases A and B, collagenases 1 and 2, and increased parenchymal cell death in COPD.** Chest 117(3): 684-694,2000.

SEIJKENS, T., *et al.* **CD40-CD40L: linking pancreatic, adipose tissue and vascular inflammation in type 2 diabetes and its complications.** Diab Vasc Dis Res 10(2): 115-122,2013.

SELVARAJ, P., *et al.* **CCL5 (RANTES) gene polymorphisms in pulmonary tuberculosis patients of south India.** Int J Immunogenet 38(5): 397-402,2011.

SESSA, L., *et al.* **The receptor for advanced glycation end-products (RAGE) is only present in mammals, and belongs to a family of cell adhesion molecules (CAMs).** PLoS One 9(1): e86903,2014.

SHAH, S., *et al.* **Screening for type 2 diabetes in obese youth.** *Pediatrics* 124(2): 573-579,2009.

SHAO, L., *et al.* **The role of adipose-derived inflammatory cytokines in type 1 diabetes.** *Adipocyte* 5(3): 270-274,2016.

SHARAF, H., *et al.* **Advanced glycation endproducts increase proliferation, migration and invasion of the breast cancer cell line MDA-MB-231.** *Biochim Biophys Acta* 1852(3): 429-441,2015.

SHI, Z., *et al.* **Association between the RAGE gene -374T/A, -429T/C polymorphisms and diabetic nephropathy: a meta-analysis.** *Ren Fail* 37(5): 751-756,2015.

SHICHIRI, M., *et al.* **Diabetic hypouricemia as an indicator of clinical nephropathy.** *Am J Nephrol* 10(2): 115-122,1990.

SHICHIRI, M., *et al.* **Diabetic renal hypouricemia.** *Arch Intern Med* 147(2): 225-228,1987.

SHIN, C. S., *et al.* **Serum 8-hydroxy-guanine levels are increased in diabetic patients.** *Diabetes Care* 24(4): 733-737,2001.

SHU, X. O., *et al.* **Identification of new genetic risk variants for type 2 diabetes.** *PLoS Genet* 6(9): e1001127,2010.

SINGH, K., *et al.* **Differential Expression of Matrix Metalloproteinase-9 Gene in Wounds of Type 2 Diabetes Mellitus Cases With Susceptible -1562C>T Genotypes and Wound Severity.** *Int J Low Extrem Wounds* 13(2): 94-102,2014.

SINGH, K., *et al.* **A functional single nucleotide polymorphism -1562C>T in the matrix metalloproteinase-9 promoter is associated with type 2 diabetes and diabetic foot ulcers.** *Int J Low Extrem Wounds* 12(3): 199-204,2013.

SINGH, K., *et al.* **Association of functional SNP-1562C>T in MMP9 promoter with proliferative diabetic retinopathy in north Indian type 2 diabetes mellitus patients.** *J Diabetes Complications* 31(12): 1648-1651,2017.

SIQUEIRA, A. F., *et al.* **[Cardiovascular disease in diabetes mellitus: classical and non-classical risk factors].** *Arq Bras Endocrinol Metabol* 51(2): 257-267,2007.

SIROIS, C. M., *et al.* **RAGE is a nucleic acid receptor that promotes inflammatory responses to DNA.** J Exp Med 210(11): 2447-2463,2013.

SKIBA, D. S., *et al.* **Anti-atherosclerotic effect of the angiotensin 1-7 mimetic AVE0991 is mediated by inhibition of perivascular and plaque inflammation in early atherosclerosis.** Br J Pharmacol 174(22): 4055-4069,2017.

SKRHA, J., JR., *et al.* **Fructosamine 3-kinase and glyoxalase I polymorphisms and their association with soluble RAGE and adhesion molecules in diabetes.** Physiol Res 63 Suppl 2: S283-291,2014.

SKURK, T., *et al.* **Relationship between adipocyte size and adipokine expression and secretion.** J Clin Endocrinol Metab 92(3): 1023-1033,2007.

SLATTER, D. A., *et al.* **The importance of lipid-derived malondialdehyde in diabetes mellitus.** Diabetologia 43(5): 550-557,2000.

SOBRAL-LEITE, M., *et al.* **Evaluation of the EGFR polymorphism R497K in two cohorts of neoadjuvantly treated breast cancer patients.** PLoS One 12(12): e0189750,2017.

SOBTI, R. C., *et al.* **Genetic variants of EGFR (142285G>A) and ESR1 (2014G>A) gene polymorphisms and risk of breast cancer.** Mol Cell Biochem 369(1-2): 217-225,2012.

SOEDAMAH-MUTHU, S. S., *et al.* **Risk factors for coronary heart disease in type 1 diabetic patients in Europe: the EURODIAB Prospective Complications Study.** Diabetes Care 27(2): 530-537,2004.

SOUSA, M. G., *et al.* **Clinical study of the oral manifestations and related factors in type 2 diabetics patients.** Braz J Otorhinolaryngol 77(2): 145-152,2011.

SOUZA, O. L., *et al.* **[Prevalence of thyroid autoimmunity in a group of patients with type 1 diabetes mellitus in Londrina, PR].** Arq Bras Endocrinol Metabol 49(2): 228-233,2005.

STADLER, M., *et al.* **Prevalence of elevated liver enzymes in adults with type 1 diabetes: A multicentre analysis of the German/Austrian DPV database.** Diabetes Obes Metab 19(8): 1171-1178,2017.

STAIGER, H., *et al.* **Pathomechanisms of type 2 diabetes genes.** Endocr Rev 30(6): 557-585,2009.

STAMLER, J., *et al.* **Diabetes, other risk factors, and 12-yr cardiovascular mortality for men screened in the Multiple Risk Factor Intervention Trial.** *Diabetes Care* 16(2): 434-444,1993.

STEFFES, M. W., *et al.* **Beta-cell function and the development of diabetes-related complications in the diabetes control and complications trial.** *Diabetes Care* 26(3): 832-836,2003.

STEINBERG, D., *et al.* **Beyond cholesterol. Modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity.** *N Engl J Med* 320(14): 915-924,1989.

STENE, L. C., *et al.* **Enterovirus infection and progression from islet autoimmunity to type 1 diabetes: the Diabetes and Autoimmunity Study in the Young (DAISY).** *Diabetes* 59(12): 3174-3180,2010.

STONE, M. A., *et al.* **Incorrect and incomplete coding and classification of diabetes: a systematic review.** *Diabet Med* 27(5): 491-497,2010.

SU, S., *et al.* **RAGE gene polymorphism and environmental factor in the risk of oral cancer.** *J Dent Res* 94(3): 403-411,2015.

SU, S. C., *et al.* **Effects of RAGE Gene Polymorphisms on the Risk and Progression of Hepatocellular Carcinoma.** *Medicine (Baltimore)* 94(34): e1396,2015.

SUGAYA, K., *et al.* **Three genes in the human MHC class III region near the junction with the class II: gene for receptor of advanced glycosylation end products, PBX2 homeobox gene and a notch homolog, human counterpart of mouse mammary tumor gene int-3.** *Genomics* 23(2): 408-419,1994.

SUGIHARA, S., *et al.* **Survey of current medical treatments for childhood-onset type 2 diabetes mellitus in Japan.** *Clin Pediatr Endocrinol* 14(2): 65-75,2005.

SUH, S.EK. W. KIM. **Diabetes and cancer: is diabetes causally related to cancer?** *Diabetes Metab J* 35(3): 193-198,2011.

SUN, K., *et al.* **Fibrosis and adipose tissue dysfunction.** *Cell Metab* 18(4): 470-477,2013.

SURESH, R.ED. M. MOSSER. **Pattern recognition receptors in innate immunity, host defense, and immunopathology.** *Adv Physiol Educ* 37(4): 284-291,2013.

SURKS, M. I., *et al.* **Subclinical thyroid disease: scientific review and guidelines for diagnosis and management.** JAMA 291(2): 228-238,2004.

TABATABAEI-MALAZY, O., *et al.* **Polymorphisms of Antioxidant Genes as a Target for Diabetes Management.** Int J Mol Cell Med 6(3): 135-147,2017.

TABATABAEI-MALAZY, O., *et al.* **A systematic review of in vitro studies conducted on effect of herbal products on secretion of insulin from Langerhans islets.** J Pharm Pharm Sci 15(3): 447-466,2012.

TABATABAEI-MALAZY, O., *et al.* **Influence of ascorbic acid supplementation on type 2 diabetes mellitus in observational and randomized controlled trials; a systematic review with meta-analysis.** J Pharm Pharm Sci 17(4): 554-582,2014.

TAKATA, T., *et al.* **Generation of glyceraldehyde-derived advanced glycation end-products in pancreatic cancer cells and the potential of tumor promotion.** World J Gastroenterol 23(27): 4910-4919,2017.

TAKEMOTO, K., *et al.* **Low catalase activity in blood is associated with the diabetes caused by alloxan.** Clin Chim Acta 407(1-2): 43-46,2009.

TANIGUCHI, Y., *et al.* **Serum uric acid and the risk for hypertension and Type 2 diabetes in Japanese men: The Osaka Health Survey.** J Hypertens 19(7): 1209-1215,2001.

TAO, D., *et al.* **Association between the RAGE (receptor for advanced glycation end-products) -374T/A gene polymorphism and diabetic retinopathy in T2DM.** Rev Assoc Med Bras (1992) 63(11): 971-977,2017.

TARGHER, G., *et al.* **Nonalcoholic fatty liver disease is independently associated with an increased incidence of cardiovascular events in type 2 diabetic patients.** Diabetes Care 30(8): 2119-2121,2007.

TARNAI, I., *et al.* **Effect of C111T polymorphism in exon 9 of the catalase gene on blood catalase activity in different types of diabetes mellitus.** Free Radic Res 41(7): 806-811,2007.

TELER, J., *et al.* **CCL2, CCL5, IL4 and IL15 Gene Polymorphisms in Women with Gestational Diabetes Mellitus.** Horm Metab Res 49(1): 10-15,2017.

THIO, C. L., *et al.* **Interaction between RANTES promoter variant and CCR5Delta32 favors recovery from hepatitis B.** *J Immunol* 181(11): 7944-7947,2008.

THOMAS, D. C.ED. G. CLAYTON. **Betting odds and genetic associations.** *J Natl Cancer Inst* 96(6): 421-423,2004.

THOMAS, N. J., *et al.* **Frequency and phenotype of type 1 diabetes in the first six decades of life: a cross-sectional, genetically stratified survival analysis from UK Biobank.** *Lancet Diabetes Endocrinol* 6(2): 122-129,2018.

THORNALLEY, P. J., *et al.* **Formation of glyoxal, methylglyoxal and 3-deoxyglucosone in the glycation of proteins by glucose.** *Biochem J* 344 Pt 1: 109-116,1999.

THUNANDER, M., *et al.* **Incidence of type 1 and type 2 diabetes in adults and children in Kronoberg, Sweden.** *Diabetes Res Clin Pract* 82(2): 247-255,2008.

THUNANDER, M., *et al.* **Levels of C-peptide, body mass index and age, and their usefulness in classification of diabetes in relation to autoimmunity, in adults with newly diagnosed diabetes in Kronoberg, Sweden.** *Eur J Endocrinol* 166(6): 1021-1029,2012.

TIAN, J., *et al.* **RAGE inhibits human respiratory syncytial virus syncytium formation by interfering with F-protein function.** *J Gen Virol* 94(Pt 8): 1691-1700,2013.

TIAN, J., *et al.* **The association between quitting smoking and weight gain: a systemic review and meta-analysis of prospective cohort studies.** *Obes Rev* 17(10): 1014,2016.

TIEDGE, M., *et al.* **Relation between antioxidant enzyme gene expression and antioxidative defense status of insulin-producing cells.** *Diabetes* 46(11): 1733-1742,1997.

TORRES, M. C., *et al.* **Polymorphisms of the promoter and exon 3 of the receptor for advanced glycation end products (RAGE) in Euro- and Afro-Brazilians.** *Int J Immunogenet* 39(2): 155-160,2012.

TRIPATHI, A. K., *et al.* **Association of RAGE gene polymorphism with vascular complications in Indian type 2 diabetes mellitus patients.** *Diabetes Res Clin Pract* 103(3): 474-481,2014.

TRUE, M. W. **Circulating biomarkers of glycemia in diabetes management and implications for personalized medicine.** J Diabetes Sci Technol 3(4): 743-747,2009.

TSUKUI, S.EI. KOBAYASHI. **Effects of age and obesity on glycated haemoglobin and 1,5-anhydroglucitol in screening for type 2 diabetes mellitus.** Diabet Med 12(10): 899-903,1995.

TUOMILEHTO, J., *et al.* **Plasma uric acid level and its association with diabetes mellitus and some biologic parameters in a biracial population of Fiji.** Am J Epidemiol 127(2): 321-336,1988.

ULLRICH, A., *et al.* **Human epidermal growth factor receptor cDNA sequence and aberrant expression of the amplified gene in A431 epidermoid carcinoma cells.** Nature 309(5967): 418-425,1984.

UMEDA, F., *et al.* **Serum 1,5-anhydro-D-glucitol and glycemic control in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus.** Tohoku J Exp Med 163(2): 93-100,1991.

UTHRA, S., *et al.* **Diabetic retinopathy: Validation study of ALR2, RAGE, iNOS and TNFB gene variants in a south Indian cohort.** Ophthalmic Genet 31(4): 244-251,2010.

UTTRA, K. M., *et al.* **Lipid Profile of Patients with Diabetes mellitus (A Multidisciplinary Study).** World Applied Sciences Journal 12(9): 1382-1384,2011.

VAISHYA, S., *et al.* **MicroRNA, Proteins, and Metabolites as Novel Biomarkers for Prediabetes, Diabetes, and Related Complications.** Front Endocrinol (Lausanne) 9: 180,2018.

VAN DEN DRIESSCHE, A., *et al.* **Type 1 diabetes and autoimmune polyglandular syndrome: a clinical review.** Neth J Med 67(11): 376-387,2009.

VAN DEN STEEN, P. E., *et al.* **Cleavage of denatured natural collagen type II by neutrophil gelatinase B reveals enzyme specificity, post-translational modifications in the substrate, and the formation of remnant epitopes in rheumatoid arthritis.** FASEB J 16(3): 379-389,2002.

VAN GIESON, E. J.ET. C. SKALAK. **Chronic vasodilation induces matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) expression during microvascular remodeling in rat skeletal muscle.** *Microcirculation* 8(1): 25-31,2001.

VAN LEEUWEN, A. M.EM. L. BLADH. **Davis's comprehensive handbook of laboratory diagnostic tests with nursing implications**

Philadelphia, F. A. Davis Company: 1824.2015.

VAN ZOELLEN, M. A., *et al.* **Role of toll-like receptors 2 and 4, and the receptor for advanced glycation end products in high-mobility group box 1-induced inflammation in vivo.** *Shock* 31(3): 280-284,2009.

VANDANMAGSAR, B., *et al.* **The NLRP3 inflammasome instigates obesity-induced inflammation and insulin resistance.** *Nat Med* 17(2): 179-188,2011.

VANDERPUMP, M. P., *et al.* **The incidence of thyroid disorders in the community: a twenty-year follow-up of the Wickham Survey.** *Clin Endocrinol (Oxf)* 43(1): 55-68,1995.

VANDEWALLE, C. L., *et al.* **Epidemiology, clinical aspects, and biology of IDDM patients under age 40 years. Comparison of data from Antwerp with complete ascertainment with data from Belgium with 40% ascertainment. The Belgian Diabetes Registry.** *Diabetes Care* 20(10): 1556-1561,1997a.

VANDEWALLE, C. L., *et al.* **Associations of GAD65- and IA-2- autoantibodies with genetic risk markers in new-onset IDDM patients and their siblings. The Belgian Diabetes Registry.** *Diabetes Care* 20(10): 1547-1552,1997b.

VANDOOREN, J., *et al.* **Biochemistry and molecular biology of gelatinase B or matrix metalloproteinase-9 (MMP-9): the next decade.** *Crit Rev Biochem Mol Biol* 48(3): 222-272,2013.

VANITA, V. **Association of RAGE (p.Gly82Ser) and MnSOD (p.Val16Ala) polymorphisms with diabetic retinopathy in T2DM patients from north India.** *Diabetes Res Clin Pract* 104(1): 155-162,2014.

VEAL, E.EA. DAY. **Hydrogen peroxide as a signaling molecule.** *Antioxid Redox Signal* 15(1): 147-151,2011.

VEILLARD, N. R.EF. MACH. **Statins: the new aspirin?** *Cell Mol Life Sci* 59(11): 1771-1786,2002.

VERMA, S., *et al.* **An Overview of Matrix Metalloproteinase 9 Polymorphism and Gastric Cancer Risk.** Asian Pac J Cancer Prev 16(17): 7393-7400,2015.

VERMEULEN, I., *et al.* **Contribution of antibodies against IA-2beta and zinc transporter 8 to classification of diabetes diagnosed under 40 years of age.** Diabetes Care 34(8): 1760-1765,2011.

VINIK, A. I., *et al.* **Management of hyperlipidemia in diabetes.** Compr Ther 21(10): 602-609,1995.

VOCKLEY, C. M., *et al.* **Decoding the role of regulatory element polymorphisms in complex disease.** Curr Opin Genet Dev 43: 38-45,2017.

VOGIATZI, K., *et al.* **Genetic diversity of RANTES gene promoter and susceptibility to coronary artery disease and restenosis after percutaneous coronary intervention.** Thromb Res 124(1): 84-89,2009.

VOULGARI, C., *et al.* **Smoking cessation predicts amelioration of microalbuminuria in newly diagnosed type 2 diabetes mellitus: a 1-year prospective study.** Metabolism 60(10): 1456-1464,2011.

WACHOLDER, S., *et al.* **Assessing the probability that a positive report is false: an approach for molecular epidemiology studies.** J Natl Cancer Inst 96(6): 434-442,2004.

WANG, D., *et al.* **A multicenter matched case-control analysis on seven polymorphisms from HMGB1 and RAGE genes in predicting hepatocellular carcinoma risk.** Oncotarget 8(30): 50109-50116,2017.

WANG, W. S., *et al.* **Epidermal growth factor receptor R497K polymorphism is a favorable prognostic factor for patients with colorectal carcinoma.** Clin Cancer Res 13(12): 3597-3604,2007.

WANG, W. Y., *et al.* **Genome-wide association studies: theoretical and practical concerns.** Nat Rev Genet 6(2): 109-118,2005.

WANG, Y., *et al.* **Genetic polymorphism c.1562C>T of the MMP-9 is associated with macroangiopathy in type 2 diabetes mellitus.** Biochem Biophys Res Commun 391(1): 113-117,2010.

WANG, Y., *et al.* **Serum 1,5-anhydroglucitol level as a screening tool for diabetes mellitus in a community-based population at high risk of diabetes.** *Acta Diabetol* 54(5): 425-431,2017.

WANGNOO, S. K. **Initiating insulin therapy in children and adolescents with type 1 diabetes mellitus.** *Indian J Endocrinol Metab* 19(Suppl 1): S68-70,2015.

WARD, R. J., *et al.* **Should we be screening for thyroid dysfunction in patients with type 2 diabetes mellitus?** *Br J Gen Pract* 68(667): 94-95,2018.

WARRAM, J. H., *et al.* **Epidemiology of non-insulin-dependent diabetes mellitus and its macrovascular complications. A basis for the development of cost-effective programs.** *Endocrinol Metab Clin North Am* 26(1): 165-188,1997.

WARREN, B., *et al.* **Comparative prognostic performance of definitions of prediabetes: a prospective cohort analysis of the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) study.** *Lancet Diabetes Endocrinol* 5(1): 34-42,2017.

WARREN, R. E., *et al.* **Serum thyrotropin is a better predictor of future thyroid dysfunction than thyroid autoantibody status in biochemically euthyroid patients with diabetes: implications for screening.** *Thyroid* 14(10): 853-857,2004.

WEI, J. N., *et al.* **Low birth weight and high birth weight infants are both at an increased risk to have type 2 diabetes among schoolchildren in taiwan.** *Diabetes Care* 26(2): 343-348,2003.

WEISBERG, S. P., *et al.* **Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue.** *J Clin Invest* 112(12): 1796-1808,2003.

WELLS, A. **EGF receptor.** *Int J Biochem Cell Biol* 31(6): 637-643,1999.

WENDEL, H. G., *et al.* **Survival signalling by Akt and eIF4E in oncogenesis and cancer therapy.** *Nature* 428(6980): 332-337,2004.

WENTEN, M., *et al.* **Functional variants in the catalase and myeloperoxidase genes, ambient air pollution, and respiratory-related school absences: an example of epistasis in gene-environment interactions.** *Am J Epidemiol* 170(12): 1494-1501,2009.

WEST, I. C. **Radicals and oxidative stress in diabetes.** *Diabet Med* 17(3): 171-180,2000.

WEST, K. M., *et al.* **The role of circulating glucose and triglyceride concentrations and their interactions with other "risk factors" as determinants of arterial disease in nine diabetic population samples from the WHO multinational study.** *Diabetes Care* 6(4): 361-369,1983.

WHO.). "Obesity : preventing and managing the global epidemic : report of a WHO consultation. ." 2000.

WHO. **Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases.** World Health Organ Tech Rep Ser 916: i-viii, 1-149, backcover,2003.

WHO/IDF.). "Definition and diagnosis of diabetes mellitus and intermediate hyperglycemia: report of a WHO/IDF consultation." 2006.

WILLIAMSON, D. F., *et al.* **Smoking cessation and severity of weight gain in a national cohort.** *N Engl J Med* 324(11): 739-745,1991.

WINER, D. A., *et al.* **B cells promote insulin resistance through modulation of T cells and production of pathogenic IgG antibodies.** *Nat Med* 17(5): 610-617,2011.

WINKLER, C., *et al.* **Feature ranking of type 1 diabetes susceptibility genes improves prediction of type 1 diabetes.** *Diabetologia* 57(12): 2521-2529,2014.

WOLF, A. M., *et al.* **Adiponectin induces the anti-inflammatory cytokines IL-10 and IL-1RA in human leukocytes.** *Biochem Biophys Res Commun* 323(2): 630-635,2004.

WONG, M., *et al.* **Rantes activates Jak2 and Jak3 to regulate engagement of multiple signaling pathways in T cells.** *J Biol Chem* 276(14): 11427-11431,2001.

WONG, M. M.EE. N. FISH. **Chemokines: attractive mediators of the immune response.** *Semin Immunol* 15(1): 5-14,2003.

WOOSTER, R., *et al.* **Identification of the breast cancer susceptibility gene BRCA2.** *Nature* 378(6559): 789-792,1995.

WU, H., *et al.* **T-cell accumulation and regulated on activation, normal T cell expressed and secreted upregulation in adipose tissue in obesity.** *Circulation* 115(8): 1029-1038,2007.

WU, P., MD, FACE, FRCP. **Thyroid Disease and Diabetes.** CLINICAL DIABETES 18(1),2000.

XAVIER, H. T., *et al.* [**V Brazilian Guidelines on Dyslipidemias and Prevention of Atherosclerosis**]. Arq Bras Cardiol 101(4 Suppl 1): 1-20,2013.

XIA, C., *et al.* **Role of T Lymphocytes in Type 2 Diabetes and Diabetes-Associated Inflammation.** J Diabetes Res 2017: 6494795,2017.

XIE, J., *et al.* **Cellular signalling of the receptor for advanced glycation end products (RAGE).** Cell Signal 25(11): 2185-2197,2013.

XU, H., *et al.* **Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance.** J Clin Invest 112(12): 1821-1830,2003.

XU, J., *et al.* **Association between RAGE gene promoter-374T/A polymorphism and type 2 diabetes and nephropathy.** Chin J Prev Contr Chron Non-Commun Dis 13: 39-40,2005.

YADAV, D., *et al.* **Prevalence of dyslipidemia and hypertension in Indian type 2 diabetic patients with metabolic syndrome and its clinical significance.** Osong Public Health Res Perspect 5(3): 169-175,2014.

YAMAMOTO, K., *et al.* **DOCK7 is a critical regulator of the RAGE-Cdc42 signaling axis that induces formation of dendritic pseudopodia in human cancer cells.** Oncol Rep 29(3): 1073-1079,2013.

YAMAMOTO, Y., *et al.* **Septic shock is associated with receptor for advanced glycation end products ligation of LPS.** J Immunol 186(5): 3248-3257,2011.

YAMAMOTO, Y., *et al.* **Development and prevention of advanced diabetic nephropathy in RAGE-overexpressing mice.** J Clin Invest 108(2): 261-268,2001.

YAMANOUCHI, T., *et al.* **Reduction and recovery of plasma 1,5-anhydro-D-glucitol level in diabetes mellitus.** Diabetes 36(6): 709-715,1987.

YAMANOUCHI, T., *et al.* **Reduction of plasma 1,5-anhydroglucitol (1-deoxyglucose) concentration in diabetic patients.** Diabetologia 31(1): 41-45,1988.

YAMANOUCHI, T.EY. AKANUMA. **Serum 1,5-anhydroglucitol (1,5 AG): new clinical marker for glycemic control.** Diabetes Res Clin Pract 24 Suppl: S261-268,1994.

YAMANOUCHI, T., *et al.* **Comparison of 1,5-anhydroglucitol, HbA1c, and fructosamine for detection of diabetes mellitus.** Diabetes 40(1): 52-57,1991.

YAMANOUCHI, T., *et al.* **Plasma 1,5-anhydro-D-glucitol as new clinical marker of glycemic control in NIDDM patients.** Diabetes 38(6): 723-729,1989.

YAMANOUCHI, T., *et al.* **Estimation of plasma glucose fluctuation with a combination test of hemoglobin A1c and 1,5-anhydroglucitol.** Metabolism 41(8): 862-867,1992a.

YAMANOUCHI, T., *et al.* **Origin and disposal of 1,5-anhydroglucitol, a major polyol in the human body.** Am J Physiol 263(2 Pt 1): E268-273,1992b.

YAMAUCHI, T., *et al.* **A genome-wide association study in the Japanese population identifies susceptibility loci for type 2 diabetes at UBE2E2 and C2CD4A-C2CD4B.** Nat Genet 42(10): 864-868,2010.

YAN, H.EJ. J. HARDING. **Glycation-induced inactivation and loss of antigenicity of catalase and superoxide dismutase.** Biochem J 328 (Pt 2): 599-605,1997.

YAN, J., *et al.* **Steroid receptor coactivator-3/AIB1 promotes cell migration and invasiveness through focal adhesion turnover and matrix metalloproteinase expression.** Cancer Res 68(13): 5460-5468,2008.

YANG, H., *et al.* **Genetic Variants of the Receptor for Advanced Glycation End-products in Susceptibility to Type 2 Diabetes Mellitus in Primary Hypertensive Patients.** Sci Rep 7(1): 17207,2017.

YANG, L., *et al.* **Association of the receptor for advanced glycation end products gene polymorphisms and circulating RAGE levels with diabetic retinopathy in the Chinese population.** J Diabetes Res 2013: 264579,2013.

YANG, Y., *et al.* **Paraoxonase 2 decreases renal reactive oxygen species production, lowers blood pressure, and mediates dopamine D2 receptor-induced inhibition of NADPH oxidase.** Free Radic Biol Med 53(3): 437-446,2012.

YAO, T. C., *et al.* **Association of RANTES promoter polymorphism with juvenile rheumatoid arthritis.** Arthritis Rheum 60(4): 1173-1178,2009.

YARDEN, Y. The EGFR family and its ligands in human cancer. signalling mechanisms and therapeutic opportunities. Eur J Cancer 37 Suppl 4: S3-8,2001.

YATIME, L. EG. R. ANDERSEN. Structural insights into the oligomerization mode of the human receptor for advanced glycation end-products. FEBS J 280(24): 6556-6568,2013.

YE, J., et al. Hypoxia is a potential risk factor for chronic inflammation and adiponectin reduction in adipose tissue of ob/ob and dietary obese mice. Am J Physiol Endocrinol Metab 293(4): E1118-1128,2007.

YE, S. Influence of matrix metalloproteinase genotype on cardiovascular disease susceptibility and outcome. Cardiovasc Res 69(3): 636-645,2006.

YEUNG, E. H., et al. Increased risk of type 2 diabetes from a family history of coronary heart disease and type 2 diabetes. Diabetes Care 30(1): 154-156,2007.

YEUNG, W. C., et al. Enterovirus infection and type 1 diabetes mellitus: systematic review and meta-analysis of observational molecular studies. BMJ 342: d35,2011.

YOO, H. G., et al. Prevalence of insulin resistance and metabolic syndrome in patients with gouty arthritis. Rheumatol Int 31(4): 485-491,2011.

YOON, S. J., et al. Association of RAGE gene polymorphisms with coronary artery disease in the Korean population. Coron Artery Dis 18(1): 1-8,2007.

YOSHIE, O., et al. Chemokines in immunity. Adv Immunol 78: 57-110,2001.

YOSHIOKA, K., et al. Association study of G1704T and G82S polymorphisms of RAGE gene for microalbuminuria in Japanese type 2 diabetic patients. Metabolism 54(4): 488-491,2005a.

YOSHIOKA, K., et al. Relation between Polymorphisms G1704T and G82S of RAGE Gene and Diabetic Retinopathy in Japanese Type 2 Diabetic Patients. Internal Medicine 44(5): 5,2005b.

YU, K., et al. Methionine synthase A2756G polymorphism and cancer risk: a meta-analysis. Eur J Hum Genet 18(3): 370-378,2010.

ZAMORA-GINEZ, I., *et al.* **Risk factors for diabetes, but not for cardiovascular disease, are associated with family history of Type 2 diabetes in subjects from central Mexico.** *Ann Hum Biol* 39(2): 102-107,2012.

ZHANG, B., *et al.* **Functional polymorphism in the regulatory region of gelatinase B gene in relation to severity of coronary atherosclerosis.** *Circulation* 99(14): 1788-1794,1999.

ZHANG, H. M., *et al.* **Association of 1704G/T and G82S polymorphisms in the receptor for advanced glycation end products gene with diabetic retinopathy in Chinese population.** *J Endocrinol Invest* 32(3): 258-262,2009.

ZHANG, J., *et al.* **Association among polymorphisms in EGFR gene exons, lifestyle and risk of gastric cancer with gender differences in Chinese Han subjects.** *PLoS One* 8(3): e59254,2013.

ZHANG, Y., *et al.* **Revisiting regulatory T cells in type 1 diabetes.** *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 19(4): 271-278,2012.

ZHANG, Y., *et al.* **Association of single-nucleotide polymorphisms in the RAGE gene and its gene- environment interactions with diabetic nephropathy in Chinese patients with type 2 diabetes.** *Oncotarget* 8(57): 96885-96892,2017.

ZHANG, Z., *et al.* **Matrix Metalloproteinase 9 Gene Promoter (rs 3918242) Mutation Reduces the Risk of Diabetic Microvascular Complications.** *Int J Environ Res Public Health* 12(7): 8023-8033,2015.

ZHERNAKOVA, A., *et al.* **Genetic variants of RANTES are associated with serum RANTES level and protection for type 1 diabetes.** *Genes Immun* 7(7): 544-549,2006.

ZONG, H., *et al.* **Hyperglycaemia-induced pro-inflammatory responses by retinal Muller glia are regulated by the receptor for advanced glycation end-products (RAGE).** *Diabetologia* 53(12): 2656-2666,2010.

ZOTOVA, E. V., *et al.* **[Search for the association of polymorphic markers for genes coding for antioxidant defense enzymes, with development of diabetic polyneuropathies in patients with type 1 diabetes mellitus].** *Mol Biol (Mosk)* 38(2): 244-249,2004.

ZULFIQAR, S., *et al.* **Association of RAGE gene polymorphism with Type-2 diabetes mellitus in local population.** *Pak J Med Sci* 34(1): 226-229,2018.

ZYLKE, J. W. & DEANGELIS, D. **Pediatric chronic diseases--stealing childhood.**
JAMA 297(24): 2765-2766,2007.