

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA GERAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA



DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**ASSOCIAÇÃO DE POLIMORFISMOS EM GENES DE
CITOCINAS COM COMPLICAÇÕES
MICROVASCULARES E COMORBIDADES NO
DIABETES MELLITUS TIPO 2**

ORIENTANDA: Kathryna Fontana Rodrigues

ORIENTADORA: Profa. Dra. Karina Braga Gomes Borges

BELO HORIZONTE - MG

Novembro - 2013

KATHRYNA FONTANA RODRIGUES

**ASSOCIAÇÃO DE POLIMORFISMOS EM GENES DE CITOCINAS
COM COMPLICAÇÕES MICROVASCULARES E
COMORBIDADES NO DIABETES MELLITUS TIPO 2**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Genética do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Genética.

Orientadora: Prof^a. Dra. Karina Braga Gomes Borges

BELO HORIZONTE - MG

Novembro - 2013

043

Rodrigues, Kathryna Fontana.

Associação de polimorfismos em genes de citocinas com complicações microvasculares e comorbidades no Diabetes Mellitus tipo [manuscrito] / Kathryna Fontana Rodrigues. – 2013.

112f.: il. ; 29,5 cm.

Orientadora: Karina Braga Gomes Borges.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas.

1. Diabetes – Complicações e seqüelas – Teses. 2. Diabetes Mellitus. 3. Citocinas – Teses. 4. Inflamação – Teses. 5. Polimorfismo (Genética) – Teses. 6. Genética – Teses I. Borges, Karina Braga Gomes. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 575

Mestranda:

Kathryna Fontana Rodrigues

Orientadora:

Profa. Dra. Karina Braga Gomes Borges

Colaboradores:

Dra. Adriana Aparecida Bosco

Dra. Cláudia Maria Andrade Fernandes Vieira

Dra. Valéria Cristina Sandrim

Linha de Pesquisa:

Bases Moleculares de Patologias Humanas

Área de Conhecimento:

Genética

Instituições Participantes:

Instituto de Ciências Biológicas – UFMG

Faculdade de Farmácia – UFMG

Santa Casa de Belo Horizonte

*“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos
é senão uma gota de água no mar. Mas o mar
seria menor se lhe faltasse uma gota.”*

(Madre Teresa de Calcutá)

Dedico este trabalho aos meus pais, fonte inesgotável de compreensão, apoio e amor. Sem eles a realização desse projeto não seria possível. Essa vitória é de vocês.

AGRADECIMENTOS

À Deus, presença constante em minha vida, dando-me força e paciência para enfrentar os momentos mais críticos desta caminhada. Agradeço por ter colocado no meu caminho tantas “pessoas-anjos” que foram fundamentais para a realização deste trabalho.

À minha orientadora, professora Dra. Karina Braga Gomes Borges, pela paciência, compreensão, dedicação e amizade. Você é meu grande exemplo de mulher e profissional. Obrigada por despertar em mim o desejo pelo conhecimento e pelo raciocínio crítico que tanto contribuíram para meu crescimento profissional.

Ao programa de Pós-graduação em Genética por ter me acolhido como aluna. Agradeço aos professores, às secretárias Mary e Enaile e aos colegas pelo convívio e troca de conhecimentos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro concedido durante o mestrado.

Aos professores da Faculdade de Farmácia que tanto me ensinaram e me acolheram. Agradeço, em especial, às professoras Dra. Ana Paula Salles Moura Fernandes, Dra. Lirlândia Pires Sousa, Dra. Maria das Graças Carvalho e ao professor Dr. Adriano de Paula Sabino.

Aos funcionários e alunos dos Laboratórios de Bioquímica, Biologia Molecular e Hematologia da Faculdade de Farmácia. Obrigada pelo convívio, amizade e apoio profissional em todas as etapas do projeto. Mais que colegas, somos amigos e nossas loucuras de cada dia não me deixaram perder o bom humor.

À Daniela Diniz pela amizade, troca de conhecimentos e por sempre estar disposta a ajudar. Sem nossas conversas e risadas intermináveis, tudo teria sido mais difícil.

À Nathalia Pietrani, colega de pós-graduação que se tornou uma grande amiga, e dividiu comigo a tarefa árdua de selecionar pacientes.

À equipe de médicos, residentes e enfermeiras do Ambulatório de Endocrinologia da Santa Casa de Belo Horizonte, especialmente à Dra. Adriana Aparecida Bosco e à Dra. Cláudia Maria Andrade Fernandes, que gentilmente me cederam o espaço e todo o suporte para a seleção dos pacientes.

Às secretárias e colhedoras do laboratório da Santa Casa (LabClim) que sempre me receberam com um sorriso e foram fundamentais na realização desse projeto.

Aos pacientes, por terem aceitado participar do projeto. Obrigada pela confiança e por me ensinarem a ter paciência, fé e nunca desanimar diante dos problemas.

Aos meus pais, fonte inesgotável de amor, pelo apoio incondicional. Obrigada por me ajudarem a superar os momentos difíceis e seguir em frente. Vocês sempre acreditaram em mim.

A todos os meus familiares, em especial à minha avó Celina, pelas orações, carinho e apoio.

Ao Alberto, por estar ao meu lado durante esta jornada. Seu amor, carinho e paciência me ajudaram a ter força para seguir em frente.

Aos amigos de Caeté, que sempre torceram por mim e fizeram meus dias de descanso mais leves e divertidos.

A todos que direta ou indiretamente me ajudaram a tornar este sonho realidade.

Muito obrigada!

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	IX
LISTA DE TABELAS	X
LISTA DE QUADROS	XI
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	XII
RESUMO	1
ABSTRACT	2
1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	3
2. REVISÃO DA LITERATURA	6
2.1 Diabetes mellitus	7
2.2 Epidemiologia do diabetes mellitus	8
2.3 Classificação e diagnóstico do diabetes mellitus	9
2.4 Complicações microvasculares do diabetes mellitus	10
2.5 Inflamação, obesidade e resistência à insulina	15
2.6 Polimorfismos em genes de citocinas	20
2.6.1 Fator de necrose tumoral alfa	21
2.6.2 Fator de crescimento transformante beta 1	22
2.6.3 Interleucina 10	25
2.6.4 Interleucina 6	28
2.6.5 Interferon gama	29
3. OBJETIVOS	31
3.1 Objetivo geral	32
3.2 Objetivos específicos	32
CAPÍTULO 1: Artigo “ <i>Association of a large...</i> ”	33
4. DISCUSSÃO	63
5. CONCLUSÕES	73

6. PERSPECTIVAS DO TRABALHO	75
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	77
ANEXOS	98
ANEXO A: Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG	99
ANEXO B: Comitê de Ética em Pesquisa da Santa Casa	100
ANEXO C: Termo de consentimento livre e esclarecido	101
ANEXO D: Ficha clínica	103
ANEXO E: Comprovante de submissão do artigo do capítulo 1	105
ANEXO F: Comprovante de submissão do artigo “The role...”	106
ANEXOS G: Comprovantes de resumos apresentados em congressos	107
ANEXOS H: Aceites de resumos para apresentação em congresso	111

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Principais mecanismos pelos quais a hiperglicemia contribui para as complicações do diabetes mellitus	11
Figura 2: Possíveis mecanismos envolvidos na ativação de vias de sinalização inflamatórias na obesidade	18
Figura 3: O aumento da adiposidade está relacionado com mudanças nas populações celulares do tecido adiposo	20

LISTA DE TABELAS

Table 1: Clinical and laboratorial characteristics in T2D patients considering retinopathy (DRP)	53
Table 2: Clinical and laboratorial characteristics in T2D patients considering nephropathy (DNP)	54
Table 3: Clinical and laboratorial characteristics in T2D patients considering neuropathy (DNR)	55
Table 4: Haplotype distribution of IL-10 promoter gene (-1082G/A, -819T/C and -512C/A) in T2D patients considering complications and comorbidities	56
Table SM1: Distributions of genotypes and alleles frequencies in T2D patients considering complications	57
Table SM2: Distributions of genotypes and alleles frequencies in T2D patients considering comorbidities	60

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Classificação da retinopatia diabética (RD) e significado clínico	12
Quadro 2: Estágios da nefropatia diabética (ND): valores de albuminúria utilizados para o diagnóstico de acordo com o tipo de amostra de urina ..	14
Quadro 3: Estudos que associam polimorfismos de citocinas a nefropatia diabética (ND)	68

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A	<i>Adenine</i> (Adenina)
ADA	<i>American Diabetes Association</i> (Associação Americana de Diabetes)
AER	<i>Albumin excretion rate</i> (Taxa de excreção de albumina)
AGEs	<i>Advanced glycation end-products</i> (Produtos finais de glicação avançada)
AGLs	Ácidos graxos livres
AP-1	<i>Activator protein 1</i> (Proteína ativadora 1)
Arg	<i>Arginine</i> (Arginina)
ATM	<i>Adipose tissue macrophages</i> (Macrófagos do tecido adiposo)
BMI	<i>Body mass index</i> (Índice de massa corporal)
C	<i>Cytosine</i> (Citosina)
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
CRP	<i>C-reactive protein</i> (Proteína C reativa)
DAG	Diacilglicerol
DCCT	<i>Diabetes control and complications trial</i>
DM	Diabetes mellitus
DM1	Diabetes mellitus tipo 1
DM2	Diabetes mellitus tipo 2
DNP	<i>Diabetic nephropathy</i> (Nefropatia diabética)
DNR	<i>Diabetic neuropathy</i> (Neuropatia diabética)
DRP	<i>Diabetic retinopathy</i> (Retinopatia diabética)
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i> (Ácido etilendiaminotetracético)
eNOS	<i>Endothelial nitric oxide synthase</i> (Óxido nítrico sintase endotelial)
FAPEMIG	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais

G	<i>Guanine</i> (Guanina)
g	Gramma
GLUT	<i>Glucose transporter</i> (Transportador de glicose)
HbA1c	<i>Glycated hemoglobin</i> (Hemoglobina glicada)
HDL	<i>High density lipoprotein</i> (Lipoproteína de alta densidade)
HWE	<i>Hardy-Weinberg Equilibrium</i> (Equilíbrio de Hardy-Weinberg)
ICAM-1	<i>Intercellular adhesion molecule 1</i> (Molécula de adesão intercelular 1)
IDF	<i>International Diabetes Federation</i> (Federação Internacional do Diabetes)
IFN- γ	<i>Interferon gamma</i> (Interferon gama)
IKK β	<i>IkappaB kinase beta</i> (Ikapa B quinase beta)
IL	<i>Interleukin</i> (Interleucina)
IMC	Índice de massa corporal
iNOS	<i>Inducible nitric oxide synthase</i> (Óxido nítrico sintase induzida)
IQR	<i>Interquartile range</i> (Intervalo interquartilico)
IRS-1	<i>Insulin receptor substrate 1</i> (Substrato 1 do receptor de insulina)
JNK	<i>c-Jun N-terminal kinase</i> (Quinase c-Jun N-terminal)
Kg/m ²	Quilograma por metro quadrado
LDL	<i>Low density lipoprotein</i> (Lipoproteína de baixa densidade)
Leu	<i>Leucine</i> (Leucina)
MCP-1	<i>Monocyte chemoattractant protein 1</i> (Proteína quimiotática de monócitos 1)
mg/dL	Miligramma por decilitro
mg/g	Miligramma por grama
mg/L	Miligramma por litro
mg/24h	Miligramma por 24 horas
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i> (Complexo de histocompatibilidade principal)

mmHg	Milímetro de mercúrio
ND	Nefropatia diabética
NF-κB	<i>Nuclear factor kappa B</i> (Fator nuclear kapa B)
NO	Óxido nítrico
NR	Neuropatia
OMS	Organização Mundial da Saúde
ox-LDL	<i>Oxidized low density lipoprotein</i> (Lipoproteína de baixa densidade oxidada)
PAI-1	<i>Plasminogen activator inhibitor 1</i> (Inibidor do ativador de plasminogênio 1)
PCR	Proteína C reativa
PCR-SSP	<i>Polymerase chain reaction-specific sequence primers</i>
PDGF	<i>Platelet-derived growth factor</i> (Fator de crescimento derivado de plaqueta)
PKC	<i>Protein kinase C</i> (Proteína quinase C)
Pro	<i>Proline</i> (Prolina)
PRPq	Pró-reitoria de pesquisa
RAGE	<i>Receptor advanced glycation end-products</i> (Receptor de produtos finais de glicação avançada)
RD	Retinopatia diabética
ROS	<i>Reactive oxygen species</i> (Espécies reativas de oxigênio)
SBD	Sociedade Brasileira de Diabetes
Ser	<i>Serine</i> (Serina)
SNP	<i>Single-nucleotide polymorphism</i> (Polimorfismo de nucleotídeo único)
SPSS	<i>Statistical Package of the Social Sciences</i>
SRAA	Sistema renina-angiotensina-aldosterona
T	<i>Thymine</i> (Timina)
T2D	<i>Type 2 diabetes</i> (Diabetes tipo 2)
TGF-β1	<i>Transforming growth factor beta 1</i> (Fator de crescimento transformante beta 1)

TLR	<i>Toll-like receptor</i> (Receptor tipo Toll)
TNF- α	<i>Tumor necrose factor alpha</i> (Fator de necrose tumoral alfa)
TOTG	Teste oral de tolerância à glicose
TZDs	Tiazolidinedionas
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
VCAM-1	<i>Vascular cell adhesion molecule 1</i> (Molécula de adesão da célula vascular 1)
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i> (Fator de crescimento endotelial vascular)

RESUMO

O diabetes mellitus é um grupo de distúrbios metabólicos caracterizados por hiperglicemia e apresenta alta morbi-mortalidade com perdas importantes na qualidade de vida dos pacientes. Nas últimas décadas, vários trabalhos têm discutido que a patogênese do DM2, bem como de suas complicações, estão associadas a um estado inflamatório crônico de baixo grau e à ativação do sistema imune inato. A produção de citocinas pró e anti-inflamatórias, bem como de marcadores de fase aguda, podem ativar uma série de vias de sinalização que culminam na resistência à insulina e no desenvolvimento da doença. O objetivo deste trabalho foi avaliar a associação dos polimorfismos nos genes das citocinas (TNF- α -308G/A, IL-10 -1082G/A, IL-10 -819T/C, IL-10 -592C/A, TGF- β 1 codon 10 T/C, TGF- β 1 codon 25 C/G, IL-6 -174G/C e IFN- γ +874T/A) com a retinopatia, nefropatia e neuropatia, bem como com a hipertensão arterial, dislipidemia e obesidade em indivíduos com DM2. Foram selecionados 102 pacientes com diagnóstico clínico e laboratorial de DM2 e as genotipagens foram feitas por PCR alelo-específica. A classificação das complicações e comorbidades foram realizadas segundo a Associação Americana de Diabetes. A retinopatia foi associada ao genótipo GG e ao alelo G do polimorfismo TGF- β 1 codon 25 C/G e a nefropatia com menor frequência do genótipo GG do polimorfismo IL-10 -1082G/A. A hipertensão arterial foi associada ao genótipo CC e ao alelo C do polimorfismo IL-10 -592C/A. Também foi verificada uma maior frequência dos alelos T (TGF- β 1 codon 10 T/C) e C (IL-10 -819T/C) entre os hipertensos. O polimorfismo TGF- β 1 está associado ao IMC: o genótipo CC é o mais frequente no grupo com IMC < 25 Kg/m² e o genótipo TC é o mais frequente no grupo com IMC \geq 30 Kg/m². Os resultados obtidos sugerem que polimorfismos em genes de citocinas estão relacionados às complicações e comorbidades no DM2, indicando que a inflamação contribui para a patogênese destas alterações clínicas.

Palavras-chave: diabetes mellitus tipo 2, citocinas, inflamação, polimorfismos, complicações

ABSTRACT

Diabetes mellitus is a group of metabolic disorders characterized by hyperglycemia and it shows a high morbidity and mortality with losses in the patients' quality of life. In recent decades, several studies have showed that the pathogenesis of T2D and its complications are associated with a chronic inflammatory state and the low-grade activation of the innate immune system. The production of pro- and anti-inflammatory cytokines as well as acute phase markers can trigger a series of signaling pathways which culminate in insulin resistance and the development of the disease. The aim of this study was to evaluate the association of polymorphisms in cytokines genes (TNF- α - 308G/A, IL-10 -1082G/A, IL-10 -819T/C, IL-10 -592C/A, TGF- β 1 codon 10 T/C, TGF- β 1 codon 25 C/G, IL-6 -174G/C, and IFN- γ +874T/A) with retinopathy, nephropathy, and neuropathy; as well as to hypertension, dyslipidemia, and obesity in individuals with T2D. We selected 102 patients with clinical and laboratorial diagnosis of T2D. The genotyping were performed by allele-specific PCR. The classification of complications and comorbidities were applied according to the American Diabetes Association. Retinopathy was associated with GG genotype and G allele in TGF- β 1 codon 25 C/G polymorphism and the nephropathy was associated with the lower frequency of GG genotype in IL-10 -1082G/A polymorphism. Hypertension was associated with the CC genotype and C allele for IL-10 -592C/A polymorphism, and higher frequencies of T and C alleles of the TGF- β 1 codon 10 T/C and IL-10 -819T/C polymorphisms, respectively. The TGF- β 1 codon 10 T/C polymorphism was associated with the BMI groups: the CC genotype was more frequent in the group with BMI < 25 Kg/m², while the TC genotype was more frequent in the group with BMI \geq 30 Kg/m². The results suggest that polymorphisms in cytokine genes are related to complications and comorbidities in T2D, indicating that inflammation contributes to the pathogenesis of these clinical changes.

Keywords: type 2 diabetes, cytokines, inflammation, polymorphisms, complications

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

O diabetes mellitus (DM) pode ser definido como um grupo de distúrbios metabólicos caracterizados pela hiperglicemia. A elevação dos níveis glicêmicos ocorre principalmente pela produção deficiente de insulina pelo pâncreas ou devido a uma ação ineficiente do hormônio nos tecidos periféricos. O DM apresenta alta morbi-mortalidade, com perdas importantes na qualidade de vida dos pacientes, sendo uma importante causa de morte, principalmente por insuficiência renal, amputação de membros inferiores, cegueira e doença cardiovascular. Segundo o *Internacional Diabetes Federation* (IDF) há cerca de 371 milhões de diabéticos no mundo e projeções indicam que esse número será de 551,9 milhões em 2030. O Brasil atualmente ocupa a quarta posição no *ranking* dos países com maior número de diabéticos no mundo. Entre os diferentes tipos de DM, o diabetes mellitus tipo 2 (DM2) é sem dúvida o mais prevalente, sendo responsável por cerca de 90-95% dos casos de DM.

Recentemente, vários trabalhos têm discutido que a patogênese do DM2 e de suas complicações estão associadas a um estado inflamatório crônico de baixo grau e à ativação do sistema imune inato. A produção de citocinas pró e anti-inflamatórias e de marcadores de fase aguda podem ativar uma série de vias de sinalização que culminam na resistência à insulina e no desenvolvimento do DM2.

Sabe-se que os níveis de expressão destas citocinas (como TNF- α , TGF- β 1, IL-10, IL-6 e IFN- γ) estão sob forte controle genético e que polimorfismos localizados nas regiões regulatórias dos seus genes podem afetar seus níveis de produção. Vários estudos têm sido conduzidos em diferentes populações, buscando avaliar a possível associação de polimorfismos nos genes destas citocinas com as principais complicações microvasculares do DM2, mas até o momento os resultados apresentam-se discrepantes e inconclusivos.

Considerando as proporções epidêmicas que o DM tem alcançado e essa nova abordagem de estudo da sua patogênese, baseada na resposta imune-inflamatória, a avaliação de polimorfismos em genes de citocinas pode servir como uma ferramenta para melhor compreensão de como esses marcadores inflamatórios estão envolvidos no desenvolvimento das complicações e comorbidades do DM2. Além disso, nenhum estudo molecular ainda foi realizado na população brasileira buscando investigar a possível

associação entre um grande número de polimorfismos de citocinas e as complicações microvasculares crônicas do DM2.

Desta forma, o presente trabalho objetiva avaliar a associação de um amplo painel de polimorfismos em genes de citocinas e as complicações microvasculares do DM2, bem como comorbidades comumente encontradas nestes pacientes, como a hipertensão arterial, a dislipidemia e a obesidade. Acredita-se que, no futuro, exames moleculares poderão ser aplicados na clínica médica para discriminar pacientes com risco aumentado de desenvolver estas complicações e também como estratégia complementar no acompanhamento dos pacientes com DM2, o que justificam a importância deste trabalho.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Diabetes mellitus

O DM é um grupo heterogêneo de doenças que têm em comum a hiperglicemia crônica (SAAD *et al.*, 2007). Sua incidência e prevalência estão alcançando proporções epidêmicas, principalmente devido ao aumento da prevalência da obesidade e do sedentarismo, do envelhecimento populacional e do aumento da expectativa de vida dos pacientes. O DM está associado ao aumento do risco de danos microvasculares (retinopatia, nefropatia e neuropatia) e macrovasculares (doenças isquêmicas do coração, acidente vascular cerebral e doença vascular periférica), além de menor qualidade de vida (SBD, 2009).

A manutenção da concentração de glicose no sangue, em um estreito intervalo, independente dos períodos de alimentação e jejum, é regulada pelo balanço entre a absorção de glicose a partir do intestino, a produção desta pelo fígado e a absorção e metabolismo nos tecidos periféricos. A insulina, hormônio polipeptídico anabólico produzido pelas células beta do pâncreas, atua como o principal regulador da concentração de glicose no sangue por estimular a sua captação pelo fígado e pelos tecidos adiposo e muscular esquelético, promover a conversão de glicose em glicogênio, promover a lipogênese e a síntese proteica e inibir a produção de glicose pelo fígado e a degradação de proteínas. A hiperglicemia característica do DM pode ocorrer devido à produção deficiente de insulina pelo pâncreas ou devido a uma ação ineficiente do hormônio nos tecidos periféricos, caracterizando um quadro de resistência à insulina. Esta resistência pode apresentar-se em decorrência de uma menor atividade dos receptores de insulina, por uma diminuição no número destes, por alterações estruturais que levam a uma deficiência da ligação insulina-receptor, ou ainda por uma diminuição da proteína transportadora GLUT 4 (*glucose transporter*), responsável pelo transporte de glicose para o interior das células (SALTIEL & KAHN, 2001; BURTIS *et al.*, 2008; KHARDORI, 2013).

Os principais sintomas clínicos associados à hiperglicemia são polifagia, poliúria, polidipsia, perda de peso e cansaço. Fatores genéticos e ambientais têm sido descritos como tendo grande importância para o desenvolvimento do DM (ALBERTI *et al.*, 2007). Segundo a Sociedade Brasileira de Diabetes

(SBD), os principais fatores ambientais associados são obesidade, adiposidade abdominal, grande ingestão calórica, sedentarismo, tabagismo e idade (SBD, 2009).

2.2 Epidemiologia do diabetes mellitus

O número de indivíduos diabéticos vem aumentando em todos os países. De acordo com o *IDF Diabetes Atlas* (IDF, 2012) estima-se que há 371 milhões de diabéticos em todo o mundo; portanto, a prevalência da doença é avaliada em 8,3%. Entretanto, cerca de 50% destes indivíduos não são diagnosticados.

No ranking dos países com maior número de diabéticos entre 20-79 anos, o Brasil ocupa a quarta posição com 13,4 milhões de indivíduos portadores da doença, ficando atrás somente da China (92,3 milhões), Índia (63 milhões) e Estados Unidos (24,1 milhões). Estimativas apontam que em 2030 o número de diabéticos no mundo será de aproximadamente 551,9 milhões, com 19,6 milhões no Brasil (IDF, 2012).

Segundo o IDF, em 2012 cerca de 4,8 milhões de pessoas morreram por consequência de altos níveis glicêmicos sendo que, 80% das mortes se concentraram em países de baixa e média renda e 50% das vítimas tinham menos de 60 anos de idade. A Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que o DM será a sétima principal causa de morte em 2030 (WHO, 2013).

Considerando a epidemia global de diabetes e seu impacto econômico e social sobre as políticas públicas de saúde, pode-se verificar que os gastos relacionados ao DM são substanciais e estão em franco crescimento. Estima-se que em 2012 foram gastos 471 bilhões de dólares no mundo em cuidados de saúde com o DM, o que inclui gastos diretos com internações hospitalares, exames e medicamentos, bem como gastos indiretos, relacionados principalmente à perda de produtividade dos indivíduos e sua morte precoce (IDF, 2012).

2.3 Classificação e diagnóstico do diabetes mellitus

De acordo com a *American Diabetes Association* (ADA) o DM pode ser classificado em: diabetes mellitus tipo 1, diabetes mellitus tipo 2, diabetes gestacional e outros tipos específicos de diabetes (ADA, 2012).

O diabetes mellitus tipo 1 (DM1), anteriormente denominado de diabetes insulino-dependente ou diabetes juvenil, é causado pela destruição auto-imune das células beta do pâncreas com a consequente perda da capacidade secretora de insulina e deficiência absoluta do hormônio. Corresponde a cerca de 5-10% dos casos de DM. Já o DM2, anteriormente denominado de diabetes insulino-independente ou diabetes do adulto, é causado por uma combinação de resistência à ação da insulina e resposta compensatória inadequada da secreção desta e corresponde a cerca de 90-95% dos casos de DM. O diabetes gestacional é um quadro de resistência e deficiência relativa à insulina, diagnosticado durante a gravidez. Implica em riscos de complicações no parto, mortalidade perinatal e de desenvolvimento de DM2 após a gestação e ocorre em aproximadamente 3-5% das gestações. Por fim, os outros tipos específicos de diabetes são aqueles de etiologias diversas como defeitos genéticos na função das células beta ou na ação da insulina, doenças do pâncreas exócrino, endocrinopatias, induzido por medicamentos, agentes químicos ou infecções (SAAD *et al.*, 2007; ADA, 2012).

Atualmente, os critérios de diagnóstico do DM preconizados pela ADA são: valor de hemoglobina glicada (HbA1c) igual ou superior a 6,5% (teste realizado em laboratório que utiliza método certificado pelo *National Glycohemoglobin Standardization Program* e padronizado com teste do *Diabetes Control and Complication Trial*), dois valores de glicemia plasmática após oito horas de jejum igual ou superior a 126mg/dL, valor de glicemia plasmática após duas horas da ingestão de 75g de glicose anidra dissolvida em água (Teste Oral de Tolerância a Glicose - TOTG) igual ou superior a 200mg/dL, ou em pacientes com sintomas clássicos ou crise hiperglicêmica um valor de glicemia aleatória igual ou superior a 200mg/dL (ADA, 2012).

2.4 Complicações microvasculares do diabetes mellitus

A hiperglicemia crônica e o desenvolvimento de complicações microvasculares específicas na retina, no glomérulo renal e nos nervos periféricos são características de todas as formas de DM, o que o torna a principal causa de cegueira, doença renal crônica e neuropatias debilitantes (SAAD *et al.*, 2007; SBD, 2011).

O desenvolvimento e a progressão das complicações microvasculares correlacionam-se com a duração do DM e o controle glicêmico. Embora todas as células de um paciente diabético estejam expostas a níveis elevados de glicose, o dano hiperglicêmico é limitado a alguns tipos celulares, como cristalino, retina, glomérulos e nervos, cujo transporte de glicose não é mediado pela insulina e assim apresentam hiperglicemia intracelular (SAAD *et al.*, 2007).

A patogênese da retinopatia (RD), nefropatia (ND) e neuropatia (NR) ainda não estão completamente elucidadas. Alguns trabalhos demonstram que distúrbios metabólicos e hemodinâmicos, a ativação de vias inflamatórias intracelulares em tecidos específicos, o estresse oxidativo e a produção de citocinas pró-inflamatórias podem estar associados ao desenvolvimento destas complicações (PICKUP *et al.*, 2004; SHOELSON *et al.*, 2006; KING, 2008).

Desta forma, os principais mecanismos descritos que fazem a conexão entre a hiperglicemia e a patogênese das complicações são: 1) fluxo contínuo de glicose pela via da aldose redutase, com consequente acúmulo de sorbitol dentro das células e lesão vascular por efeito osmótico, além do aumento do estresse oxidativo; 2) glicação não-enzimática de proteínas intra e extracelulares levando a formação de produtos finais de glicação avançados (AGEs) que modificam proteínas e componentes da matriz extracelular. Esta glicação induz a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e ativam o fator de transcrição nuclear kapa B (NF-κB), aumentando a expressão de citocinas e fatores de crescimento; 3) ativação de isoformas da proteína quinase C (PKC) que culmina em aumento da expressão, principalmente, da enzima óxido nítrico sintase endotelial (eNOS), endotelina-1, fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF), fator de crescimento transformante β1 (TGF-β1), ativação do NF-κB, com consequente aumento da permeabilidade vascular, angiogênese e aumento da expressão de genes de

citocinas pró-inflamatórias. Todos esses eventos fisiopatológicos induzem edema, isquemia e neovascularização na retina; proteinúria, por expansão da matriz mesangial e glomeruloesclerose no rim; e degeneração axonal nos nervos periféricos (SAAD *et al.*, 2007; KING, 2008) (Figura 1).

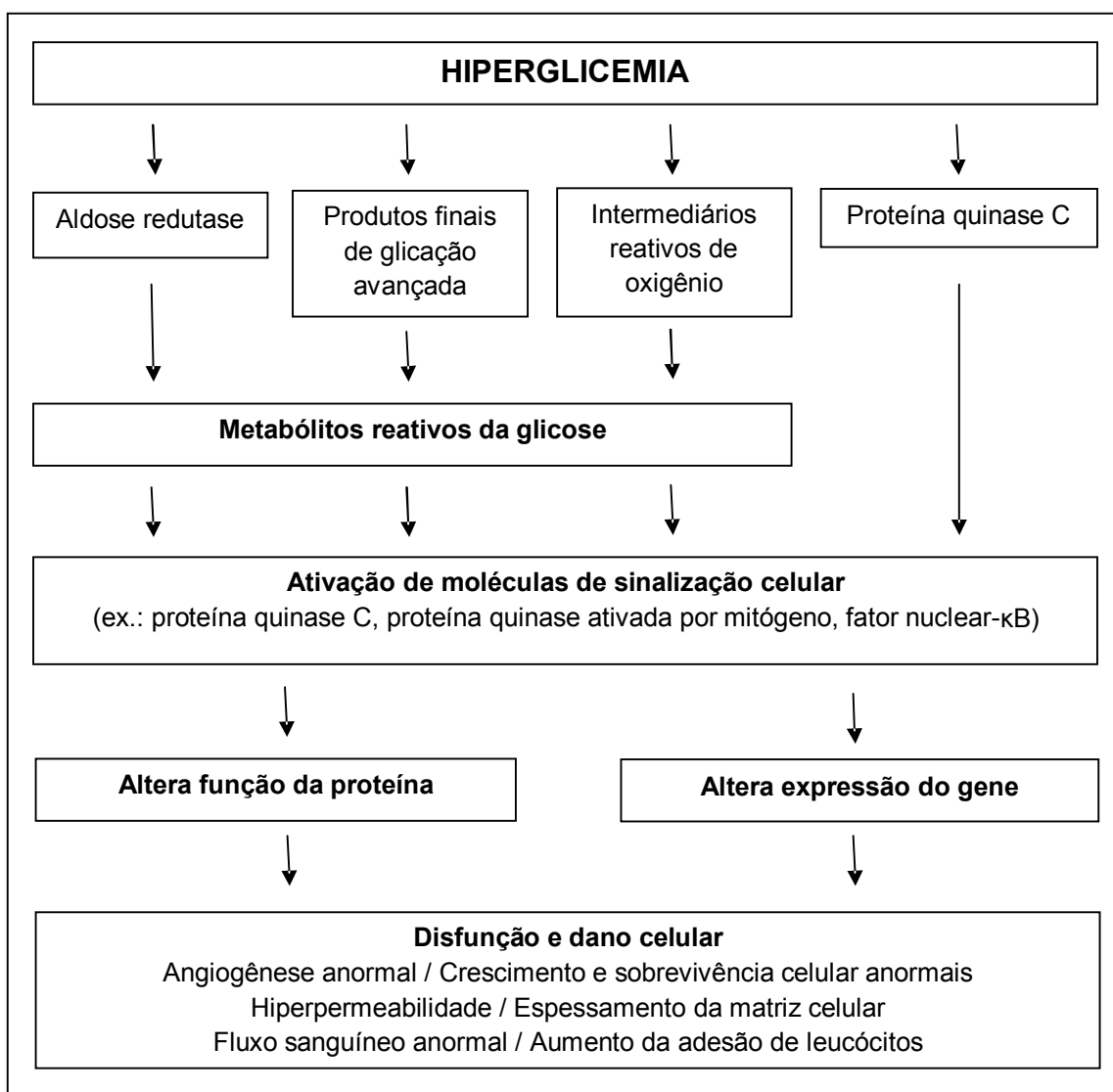


Figura 1: Principais mecanismos pelos quais a hiperglicemia contribui para as complicações do diabetes mellitus (Adaptado de: KING, 2008).

A RD é a principal causa de cegueira em pessoas em idade produtiva em diversos países (ABU EL-ASAR *et al.*, 2009). Essa complicação tardia afeta cerca de 60% dos indivíduos com DM2 com mais de 20 anos de duração da doença. Os principais fatores de risco associados ao desenvolvimento e

progressão da RD são: controle glicêmico, hipertensão, dislipidemia e nefropatia. A classificação da RD é feita com base na observação direta da retina, agrupando as características das alterações e relacionando-as com a chance de evolução para a cegueira (Quadro 1). As anormalidades retinianas têm como ponto de partida a toxicidade que a hiperglicemia exerce sobre as células endoteliais interferindo na integridade da barreira hemato-retiniana, o que provoca o acúmulo de células inflamatórias e o aumento da expressão de fatores de crescimento e citocinas pró-inflamatórias. A leucoestase acarreta aumento da adesividade do endotélio, gerando áreas de oclusão capilar e isquemia da retina. Esses são estímulos para que as fases não-proliferativas da RD, caracterizadas pela presença de microaneurismas, evoluam para a fase proliferativa com neovascularização da retina e do disco óptico (SBD, 2009; AGROIYA *et al.*, 2013).

Quadro 1: Classificação da retinopatia diabética (RD) e significado clínico.

Classificação	Significado clínico
Sem RD	Não apresenta lesões e deve realizar acompanhamento anual com oftalmologista.
RD não-proliferativa leve	Apresenta lesões com chance de evolução para cegueira baixa. Deve realizar acompanhamento anual com oftalmologista.
RD não-proliferativa moderada	Apresenta lesões mais graves, sendo necessário acompanhamento oftalmológico com intervalo menor que um ano.
RD não-proliferativa severa	Alta chance de evolução para cegueira, devendo-se considerar tratamento com fotocoagulação.
RD proliferativa	Alta chance de evolução para cegueira, devendo o paciente submeter-se à fotocoagulação. Por maior possibilidade de baixa de visão, o estadiamento da região de mácula independe do grau de retinopatia e obrigatoriamente consta na classificação.
Sem maculopatia	Não apresenta lesões próximas à mácula. Não altera a frequência do acompanhamento adicional.
Maculopatia aparentemente	Existem alterações próximas à mácula, mas

presente	que não aumentam a chance de perda visual. O acompanhamento deve ocorrer com prazo inferior a seis meses.
Maculopatia presente	As alterações estão na parte central da mácula, induzindo a perda visual, independentemente do estágio da retinopatia. Indica-se tratamento.

Adaptado de: SBD, 2009.

A ND é a principal causa de insuficiência renal crônica em pacientes que ingressam em programas de diálise e é responsável pelo aumento da mortalidade em vários países (MARKS & RASKIN, 1998; SBD, 2009). A ND é caracterizada por lesões glomerulares, tubulares, intersticiais e vasculares (PRASAD *et al.*, 2007). Os principais fatores de risco associados ao desenvolvimento e progressão da ND são: controle glicêmico, hipertensão, dislipidemia, retinopatia e dieta (quantidade e fonte de proteínas, assim como o tipo de gordura ingerida) (SAAD *et al.*, 2007). Há várias formas de se classificar a nefropatia, baseando-se, por exemplo, no ritmo de filtração glomerular, levando-se em consideração os níveis de creatinina plasmática. No entanto, para a ND, utiliza-se comumente a classificação com base nos valores de excreção urinária de albumina, sendo que a presença de pequenas quantidades deste marcador na urina representa o estágio inicial da ND, também chamado de microalbuminúria ou nefropatia incipiente; já o estágio mais avançado da ND denomina-se macroalbuminúria, proteinúria ou nefropatia instalada (Quadro 2) (SBD, 2009).

A NR está entre as complicações crônicas mais comuns do DM e afeta cerca de 50% dos pacientes (SBD, 2011). É responsável pela piora significativa da qualidade de vida dos indivíduos por incapacitação e diminuição da sobrevida. As alterações neuropáticas afetam o sistema nervoso somático e autônomo, sendo que suas principais formas são representadas pela polineuropatia sensório-motora simétrica e neuropatia autonômica. O comprometimento somático normalmente se caracteriza por dormência ou queimação dos membros inferiores, formigamentos, pontadas, choque, agulhadas em pernas e pés, desconforto ou dor ao toque, diminuição ou perda da sensibilidade tátil, térmica ou dolorosa. Sabe-se que indivíduos com DM têm

risco 15 a 40% maior de amputação de membros inferiores principalmente por polineuropatia. O comprometimento autonômico se caracteriza principalmente por alterações cardiovasculares (taquicardia de repouso, intolerância ao exercício, hipotensão ortostática, arritmias cardíacas), gastrintestinais (pirose, disfagia, odinofagia, náusea, vômito, diarreia, constipação) e genitourinárias (incontinência urinária, disfunção erétil, infecções urinárias de repetição). Assim como na RD e ND, a NR também tem sua patogênese ligada a causas metabólicas e vasculares que resultam em vasoconstrição, isquemia e hipóxia com conseqüente perda de fibras mielinizadas e diminuição da velocidade de condução nervosa (SAAD *et al.*, 2007; SBD, 2013).

Quadro 2: Estágios da nefropatia diabética (ND): valores de albuminúria utilizados para o diagnóstico de acordo com o tipo de amostra de urina.

Estágio	Tipos de amostras de urina			
	Urina com tempo marcado (µg/min.)	Urina de 24 horas (mg/24h)	Amostra isolada (índice alb/cr)	
			mg/L	mg/g
Normoalbuminúria	< 20	< 30	< 17	< 30
Microalbuminúria	20 - 199	30 - 299	17 - 173	30 - 299
Macroalbuminúria	≥ 200	≥ 300*	≥ 174*	≥ 300

*Valor de proteína total correspondente nesse estágio: ≥ 500mg/24h ou ≥ 430mg/L em amostra de urina. Adaptado de: SBD, 2009.

Considerando que muitas vezes o DM2 só é diagnosticado após anos de evolução das alterações glicêmicas, é comum que logo na ocasião do diagnóstico o paciente já apresente algum comprometimento visual, renal e/ou nervoso. Assim, a melhor forma de prevenir as complicações microvasculares e suas progressões é prevenir a obesidade, estabelecer o diagnóstico precoce do DM2 e reconhecer precocemente as lesões através do acompanhamento bem orientado na anamnese, nos exames físicos, de imagem e laboratoriais.

2.5 Inflamação, obesidade e resistência à insulina

A inflamação é uma resposta adaptativa desencadeada por estímulos nocivos, tais como infecções e dano tecidual (MEDZHITOV, 2008). O conceito de que o DM2 é uma condição inflamatória e, portanto, associada a um estado inflamatório crônico de baixo grau (CROOK *et al.*, 1993; PICKUP *et al.*, 1997), é uma abordagem que tenta compreender os mecanismos que estão envolvidos na patogênese da doença e suas complicações.

Estados inflamatórios crônicos como o DM2 e a obesidade não parecem ser desencadeados pelos eventos clássicos que deflagram a inflamação nos casos de infecções e lesões. Ao contrário, esses estados inflamatórios crônicos parecem estar associados ao mau funcionamento tecidual, em que há um desequilíbrio homeostático em um ou em vários sistemas fisiológicos que não estão diretamente e funcionalmente relacionados à defesa do hospedeiro ou ao reparo tecidual (MEDZHITOV, 2008; HEREDIA *et al.*, 2012).

Os mecanismos de controle da homeostase tecidual trabalham para assegurar que parâmetros metabólicos (concentração de glicose, por exemplo) sejam mantidos dentro de uma faixa aceitável. O desvio de alguns parâmetros para além da normalidade homeostática resulta em uma resposta aguda que permite uma adaptação transitória às novas condições ou uma mudança adaptativa que envolve pontos de ajuste mais relevantes (MEDZHITOV, 2008).

Em condições basais, os tecidos são mantidos em homeostase principalmente com a ajuda de macrófagos residentes. Sob condições nocivas, os tecidos são submetidos ao estresse e ao mau funcionamento. Dependendo da extensão das modificações, o tecido recrutará macrófagos e também receberá um aporte de outros leucócitos e proteínas plasmáticas, configurando uma resposta adaptativa com características intermediárias ao estado basal e ao estado inflamatório propriamente dito, conhecido como para-inflamação. A resposta para-inflamatória busca restaurar a funcionalidade e a homeostase tecidual. Entretanto, se o mau funcionamento do tecido persiste por um período prolongado, esta para-inflamação pode se tornar crônica contribuindo para a patogênese de doenças como o DM2. Assim, a inflamação crônica de baixo grau ou para-inflamação contribui para a progressão de doenças devido às mudanças nos ajustes homeostáticos (MEDZHITOV, 2008).

O conceito de inflamação relacionada às condições metabólicas, como a obesidade e resistência à insulina, remonta a 1993 quando HOTAMISLIGIL *et al.* (1993) demonstraram que adipócitos expressam constitutivamente citocinas pró-inflamatórias como o fator de necrose tumoral α (TNF- α), que a expressão de TNF- α é mais elevada em animais obesos e por fim, que a neutralização de TNF- α levava à diminuição da resistência insulínica nesses animais. Também na década de 90, CROOK *et al.* (1993) e PICKUP *et al.* (1997) mostraram que o DM2 é uma condição inflamatória caracterizada por elevadas concentrações de marcadores de fase aguda como ácido siálico e interleucina (IL) 6.

A resistência à insulina pode ser resultado da inibição da via de sinalização deste hormônio, levando à hiperinsulinemia devido ao aumento da sua produção pelas células beta numa tentativa de controlar os níveis glicêmicos (YE, 2013). No caso do DM2, esse quadro se inicia muitos anos antes do diagnóstico da doença (KING, 2008). Estudos demonstraram aumento da concentração de marcadores inflamatórios em indivíduos aparentemente saudáveis que mais tarde desenvolveram o DM2 (PRADHAN *et al.*, 2001; THORAND *et al.*, 2003; VOZAROVA *et al.*, 2002), sugerindo que a inflamação ocorre durante um período de diminuição da tolerância à glicose, prévio ao diagnóstico de DM. Muitos fatores estão relacionados ao desenvolvimento da resistência à insulina, incluindo fatores genéticos e ambientais, dos quais se pode destacar a obesidade.

A obesidade, principalmente devido ao aumento do tecido adiposo intra-abdominal ou visceral, é um fator de risco para o desenvolvimento não só de resistência à insulina, DM2, mas também de hipertensão arterial e dislipidemia (KOPELMAN, 2000). A obesidade caracteriza-se por um estado inflamatório crônico de baixo grau como demonstrado em estudos que observaram maior concentração plasmática de proteína C reativa (PCR), TNF- α , IL-6, inibidor do ativador do plasminogênio 1 (PAI-1) e outros mediadores inflamatórios em animais e pacientes obesos (SHIMOMURA *et al.*, 1996; FRIED *et al.*, 1998; KERSHAW & FLIER, 2004; HALBERG *et al.*, 2008). Além disso, atualmente já é sabido que o tecido adiposo é um sítio de produção de citocinas e outros produtos bioativos como leptina, resistina e proteína quimiotática de monócitos 1 (MCP-1) (STEPPAN *et al.*, 2001; FUKUHARA *et al.*, 2005).

Vários mecanismos têm sido propostos para explicar como a obesidade é capaz de ativar vias inflamatórias e como esses processos contribuem para o desenvolvimento da resistência à insulina. Muitos trabalhos discutem que o aumento da adiposidade ativa as quinases inflamatórias c-Jun N-terminal (JNK) e I κ B beta (IKK β) que fosforilam resíduos de serina do substrato do receptor de insulina 1 (IRS-1) (Ser307, Ser302), inibindo a via de sinalização da insulina (AGUIRRE *et al.*, 2000; YUAN *et al.*, 2001; GAO *et al.*, 2002; HIROSUMI *et al.*, 2002; LEE *et al.*, 2003b; CAI *et al.*, 2005).

Adicionalmente, IKK β catalisa a fosforilação de I κ B α levando à degradação do complexo proteico citoplasmático e a liberação do NF- κ B, que se transloca do citoplasma para o núcleo onde ativa a transcrição de vários genes relacionados à inflamação, como as citocinas pró-inflamatórias (SHOELSON *et al.*, 2006). Muitos estímulos podem ativar as vias JNK-AP1 e IKK β /NF- κ B (Figura 2), como as citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IL-1 β , que podem ativar essas vias através de mecanismos mediados pela interação com seus receptores clássicos e retroalimentam a produção de novos marcadores inflamatórios.

Receptores de reconhecimento padrão como o receptor tipo Toll (TLR) e o receptor para produtos finais de glicação avançados (RAGE) também podem ativar as vias JNK-AP1 e IKK β /NF- κ B. Na obesidade, há aumento dos níveis de ácidos graxos livres (AGLs) e estudos apontam que esses ácidos graxos podem se ligar a ativar o TLR4 (LEE *et al.*, 2001; LEE *et al.*, 2003a; GAO *et al.*, 2004). Além disso, a hiperglicemia favorece a formação dos AGEs que são reconhecidos pelos RAGEs. O aumento dos níveis de AGLs também contribui para o estresse do retículo endoplasmático e o estresse oxidativo, este último sendo responsável pelo aumento da produção de ROS principalmente por ativar a NADPH oxidase nos adipócitos (FURUKAWA *et al.*, 2004; OZCAN *et al.*, 2004). As ceramidas são compostos formados sob condições de estresse celular e pelo acúmulo de gorduras saturadas, e elas também contribuem para a ativação das vias de JNK e IKK β (SUMMERS, 2006). Às altas concentrações de AGLs na obesidade está associado um excesso de diacilglicerol (DAG), que é um ativador endógeno de PKC, que por sua vez também ativa JNK e IKK β . Dessa forma, a ativação de JNK e IKK β , por uma série de estímulos deflagrados diante do aumento da adiposidade, induz resistência à insulina.

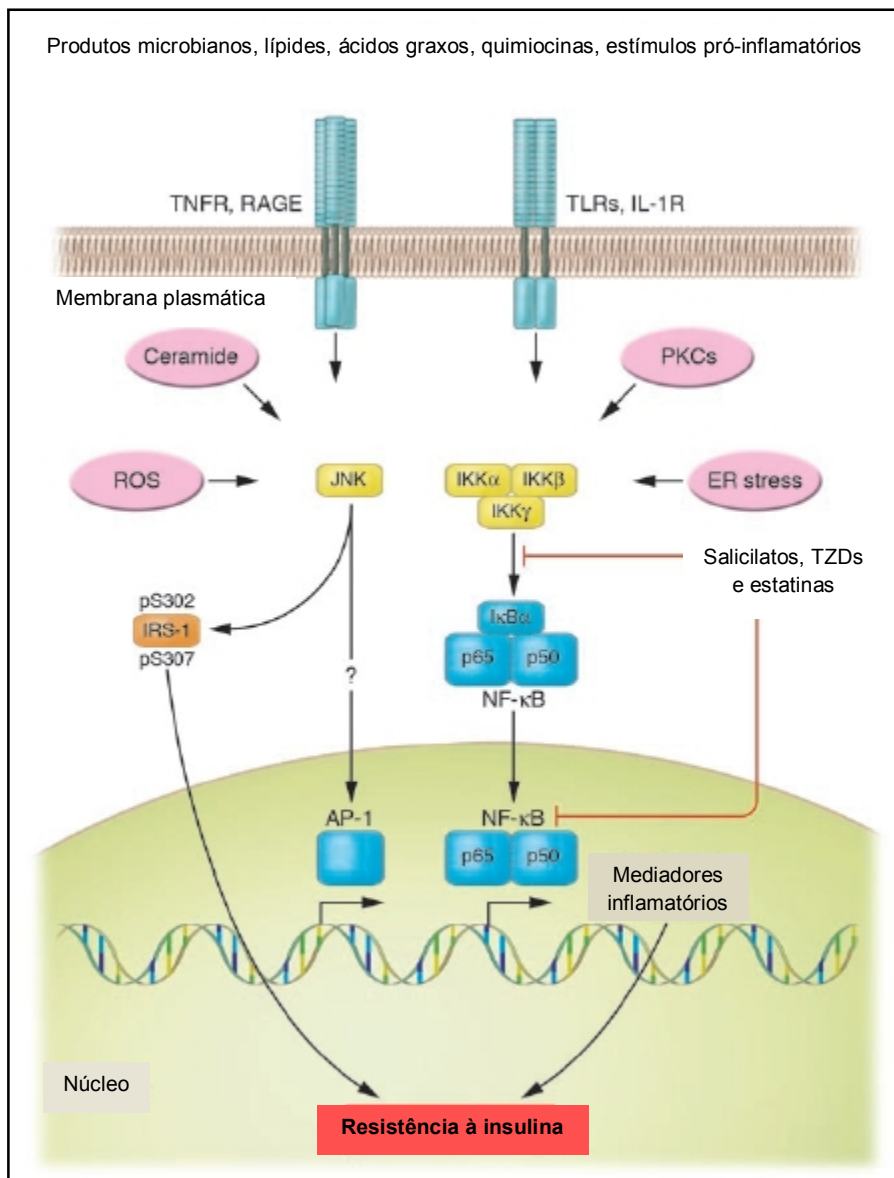


Figura 2: Potenciais mecanismos envolvidos na ativação de vias de sinalização inflamatórias na obesidade. A obesidade e o aumento da ingestão de gordura ativam as vias IKK β /NF- κ B e JNK em adipócitos, hepatócitos e macrófagos associados. Os estímulos que ativam essas vias incluem os ligantes para os receptores TNFR, IL-1R, TLR ou RAGE, estresse intracelular (ROS e estresse do retículo endoplasmático), ceramidas e várias isoformas de PKC. A ativação de IKK β induzida pela obesidade leva à translocação de NF- κ B para o núcleo e o aumento da expressão de mediadores inflamatórios que podem causar resistência à insulina. A ativação de JNK promove a fosforilação de resíduos de serina do IRS-1 regulando negativamente a sinalização da insulina. Há a hipótese de que a obesidade tenha influência sobre o fator de transcrição AP-1 (proteína ativadora 1) para a expressão de genes pró-inflamatórios. IKK- β /NF- κ B são inibidas por salicilatos, TZDs (tiazolidinedionas) e estatinas (Adaptado de: SHOELSON *et al.*, 2006).

Os adipócitos e as células do sistema imune participam do processo inflamatório na obesidade. O aumento do número de células pró-inflamatórias e a diminuição do número de células anti-inflamatórias é característica da hipertrofia do tecido adiposo (Figura 3). No tecido adiposo do magro, os principais tipos celulares identificados são: macrófagos do tipo M2, eosinófilos, células T regulatórias, células iNKT (*invariant natural killer T cells*) e MDSC (*myeloid-derived suppressor cells*). Esses tipos celulares estão relacionados principalmente a expressão de citocinas anti-inflamatórias como IL-4, IL-10 e IL-13, ativação alternativa de macrófagos, supressão da resposta imune e citotoxicidade das células NK (*natural killer*) (OUCHI *et al.*, 2011; XU, 2013). Ao contrário, no tecido adiposo do obeso, os principais tipos celulares encontrados (macrófagos do tipo M1 e neutrófilos) estão relacionados a um perfil pró-inflamatório. Além disso, acredita-se que o aumento dos níveis de MCP-1 devido ao aumento da adiposidade seja um importante fator para o recrutamento de células imunes (SARTIPY & LOSKUTOFF, 2003; WEISBERG *et al.*, 2003).

O tecido adiposo é altamente vascularizado, com muitos capilares em contato com os adipócitos. Além disso, o tecido adiposo rapidamente se prolifera e se expande com o aumento do estoque de nutrientes, possivelmente usando processos semelhantes àqueles associados à angiogênese tumoral. Além de ser importante para a expansão da gordura, a microcirculação desempenha um papel importante na inflamação do tecido adiposo. Isto porque os leucócitos desta microcirculação interagem com moléculas de adesão celular que o endotélio passa a expressar, como a molécula de adesão intercelular 1 (ICAM-1), molécula de adesão vascular 1 (VCAM-1), E-selectina ou P-selectina, que favorecem a transmigração destes leucócitos para os tecidos (HEREDIA *et al.*, 2012).

Portanto, está cada vez mais evidente que a ativação do sistema imune inato tem um papel muito importante na patogênese do DM2 e de suas principais complicações, o qual deve explicar algumas das principais características da doença e abrir caminho para novas pesquisas e abordagens terapêuticas do DM2.

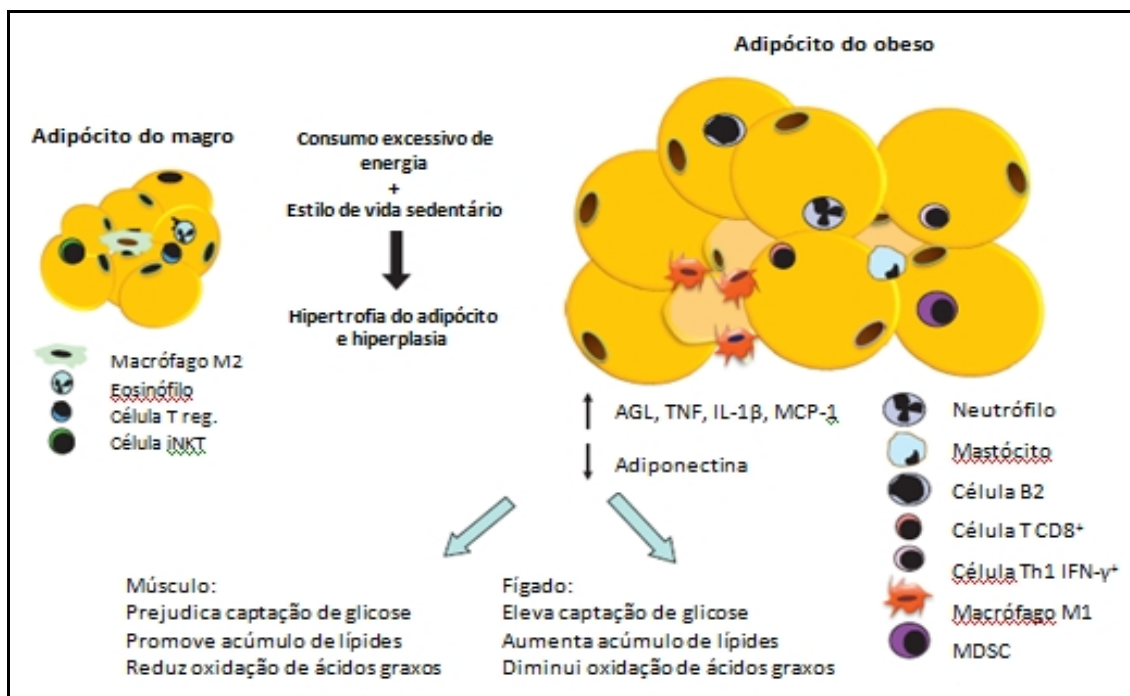


Figura 3: O aumento da adiposidade está associado com mudanças nas populações celulares do tecido adiposo. O tecido adiposo do obeso caracteriza-se pela presença de células com perfil pró-inflamatório. Como consequência, tem-se o aumento da produção de mediadores pró-inflamatórios, fatores quimiotáticos, e redução da produção de adiponectina; resultando num quadro de resistência sistêmica à insulina. (Adaptado de: XU, 2013)

2.6 Polimorfismos em genes de citocinas e complicações microvasculares do diabetes mellitus tipo 2

As citocinas são proteínas solúveis, peptídeos ou glicoproteínas, secretadas por diversos tipos celulares que participam da imunidade inata e adquirida e medeiam diversas respostas envolvidas na imunidade e inflamação (ABBAS *et al.*, 2012). Atualmente, estudos indicam que a ativação do sistema imune inato e o desenvolvimento de uma inflamação sistêmica crônica de baixo grau estão intimamente envolvidos não só na patogênese do DM2, conforme discutido anteriormente, mas também de suas principais complicações, como RD, ND e NR (DANDONA *et al.*, 2004; SHOELSON *et al.*, 2006; KING, 2008). Segundo PICKUP & CROOK (1998), o sistema imune inato está associado a vários fatores como controle genético, etnia, programação fetal, nutrição e idade. Diante disto, muitos estudos têm sido conduzidos em diferentes populações buscando identificar polimorfismos em genes de citocinas que

tenham uma associação com o desenvolvimento das complicações microvasculares do DM2, de modo a contribuir para o melhor entendimento sobre a patogênese e progressão destas complicações e busca por novos alvos terapêuticos.

2.6.1 Fator de necrose tumoral alfa

O TNF- α é uma citocina pró-inflamatória produzida, principalmente, por macrófagos ativados e adipócitos (WANG *et al.*, 2005). O gene do TNF- α humano está localizado no cromossomo 6 (6p21.3) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>). Tem sido demonstrada a relação entre os níveis de expressão de TNF- α , obesidade e resistência à insulina (HOTAMISLIGIL *et al.*, 1995; QI & PEKALA, 2000). De acordo com WANG *et al.* (2005), o TNF- α pode causar resistência à insulina por estimular a lipólise e inibir a fosforilação da tirosina no IRS-1, reduzindo a captação de glicose nos tecidos periféricos. O polimorfismo -308G/A (rs1800629) localizado na região promotora do gene está relacionado à variação nos níveis de expressão desta citocina; o alelo -308A relaciona-se à maior expressão de TNF- α enquanto o alelo -308G à menor expressão (KROEGER *et al.*, 1997).

KOLLA *et al.* (2009), em um estudo com uma população indiana com DM2, não encontraram associação entre o polimorfismo -308G/A e a NR quando comparado a um grupo de indivíduos hígidos. Entretanto, já foi descrito que TNF- α pode induzir dano neuronal (SELMAJ *et al.*, 1988).

Os estudos de YOSHIOKA *et al.* (2006) e PAINE *et al.* (2012a) também não encontraram associação entre o referido polimorfismo de TNF- α e a RD. YOSHIOKA *et al.* (2006) compararam um grupo de japoneses com DM2 e sem evidência de RD, com um grupo de indivíduos com DM2 e RD não-proliferativa e outro grupo com DM2 e RD proliferativa; não obtendo associações significativas em nenhuma das análises. Já PAINE *et al.* (2012a) compararam um grupo de indianos com DM2 sem RD com um grupo de indivíduos com DM2 e RD proliferativa. Embora esses estudos não tenham conseguido associar o polimorfismo a RD, já foi descrito que pacientes com RD proliferativa apresentam elevados níveis de TNF- α no soro e no vítreo (BALASUBRAMANYAM *et al.*, 2005). Além disso, sabe-se que juntamente com

o VEGF, o TNF- α tem papel importante na angiogênese e formação de novos vasos na retina de pacientes diabéticos (SULOCHANA *et al.*, 2001).

LEE *et al.* (2005), em um estudo com coreanos, encontraram uma menor frequência do alelo -308A no grupo de indivíduos com DM2 e falência renal progressiva quando comparada a um grupo de diabéticos sem evidência de ND. Entretanto, estudos semelhantes conduzidos com alemães (BABEL *et al.*, 2006) e indianos (PRASAD *et al.*, 2007) não conseguiram encontrar nenhuma associação significativa entre o polimorfismo -308G/A e a ND. LEE *et al.* (2005) sugerem que, devido à hiperglicemia, a inflamação sistêmica e/ou intrarenal seria importante para o desenvolvimento e progressão da ND. Dados de outros trabalhos corroboram com essa discussão, pois níveis séricos e urinários de TNF- α e IL-6 mostraram-se mais elevados em pacientes com DM2 e microalbuminúria ou proteinúria evidente, do que em pacientes diabéticos normoalbuminúricos (SHIKANO *et al.*, 2000; NAVARRO *et al.*, 2003).

LINDHOLM *et al.* (2008), em um estudo com escandinavos, também não encontraram associação significativa entre o polimorfismo -308G/A e a RD e ND. Entretanto, os autores relatam uma associação entre o alelo -308A com complicações macrovasculares do DM2. Neste estudo foram consideradas complicações macrovasculares qualquer uma das seguintes condições: infarto agudo do miocárdio, angina *pectoris*, ataque isquêmico transitório, acidente vascular cerebral e doença vascular periférica. Anteriormente, VENDRELL *et al.* (2003) consideraram a presença do mesmo alelo como fator de risco para o desenvolvimento da doença arterial coronariana, principalmente em mulheres com DM2.

2.6.2 Fator de crescimento transformante beta 1

O TGF- β 1 é um mediador anti-inflamatório do sistema imune, produzido pelas células T e caracterizado principalmente por seus efeitos imunossupressores (LI *et al.*, 2006). Além disso, o TGF- β 1 pode inibir a ativação de macrófagos e controlar negativamente mecanismos efetores da imunidade inata como a produção de citocinas pró-inflamatórias e espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (NAIKI *et al.*, 2005). O gene do TGF- β 1 humano está localizado no cromossomo 19 (19q13.1-13.3)

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>) e possui 7 éxons e 6 íntrons (FUJII *et al.*, 1986). Muitos loci polimórficos são conhecidos para o gene do TGF- β 1, sendo os principais polimorfismos representados por TGF- β 1 codon 10 T/C e codon 25 C/G.

O polimorfismo TGF- β 1 codon 10 T/C (rs1800470, T869C, Leu10Pro) consiste de uma transição de uma timina (T) para uma citosina (C) no éxon 1, posição +869 do gene, resultando na substituição de uma Leucina (Leu) por uma Prolina (Pro) na sequência do peptídeo sinal. O polimorfismo TGF- β 1 codon 25 C/G (rs1800471, G915C, Arg25Pro) consiste de uma transição de uma guanina (G) para uma citosina (C) no éxon 1, posição +915 do gene, resultando na substituição de uma Arginina (Arg) por uma Prolina (Pro) também na sequência do peptídeo sinal. Essas substituições de aminoácidos acarretam uma disfunção no trânsito intracelular e na eficiência de exportação da pré-proteína que dará origem ao TGF- β 1 (JIA *et al.*, 2011). Assim, os polimorfismos de TGF- β 1 citados estão relacionados a uma variação nos níveis de produção desta citocina (AWAD *et al.*, 1998; BLOBE *et al.*, 2000; DUNNING *et al.*, 2003).

Alguns estudos já avaliaram a possível associação entre os polimorfismos do TGF- β 1 e a ND em indivíduos com DM2. EL-SHERBINI *et al.* (2013) em um estudo do tipo caso-controle com uma população do Egito, encontraram uma associação entre o genótipo TC do polimorfismo codon 10 T/C e a ND; entretanto nenhuma associação pode ser observada para o polimorfismo de TGF- β 1 codon 25 C/G no grupo estudado. VALLADARES-SALGADO *et al.* (2010) em um estudo caso-controle com uma população do México, encontrou associações significativas para ambos os polimorfismos e a ND, sendo os genótipos CC+TC (codon 10 T/C) e CC+GC (codon 25 C/G) os mais frequentes entre os indivíduos com ND quando comparados aos diabéticos sem a complicação. Este estudo também revelou uma associação entre os níveis séricos de colesterol total e triglicérides com os genótipos CC e TC do polimorfismo codon 10 T/C. Os autores do trabalho discutem que a hipercolesterolemia e a hipertrigliceridemia podem causar lesão renal pelo dano provocado aos podócitos, ativação da atividade fibrinogênica e inflamação. Além disso, a LDL oxidada (LDL-ox) pode estimular os receptores de TGF- β 1 causando lesão glomerular por induzir a formação de células

espumosas, que estão associadas à glomeruloesclerose tardia e lesão intersticial (MINAMI *et al.*, 2000; NAKHJAVANI *et al.*, 2010).

Resultados semelhantes foram encontrados por WONG *et al.* (2003) em um estudo do tipo caso-controle em chineses. Neste trabalho, além da maior frequência de genótipos CC e TC (TGF- β 1 codon 10 T/C) entre os pacientes com ND, maiores medianas de creatinina sérica também foram associadas aos respectivos genótipos, indicando uma associação do polimorfismo com a ND e sua severidade. BURACZYNSKA *et al.* (2007) encontraram uma associação entre o genótipo CC do polimorfismo codon 10 T/C e a ND em poloneses. Já em um estudo realizado com uma população da Alemanha, BABEL *et al.* (2006) encontraram uma associação entre o genótipo TT do polimorfismo codon 10 T/C e a ND, porém nenhuma associação pode ser evidenciada para o polimorfismo codon 25 C/G neste grupo.

Uma revisão sistemática foi conduzida por JIA *et al.* (2011) incluindo 6 estudos do tipo caso-controle (1 com a população caucasiana, 1 com uma população mista e 4 com a população asiática – 3 chineses e 1 indiano) que também avaliou a associação do polimorfismo TGF- β 1 codon 10 T/C e a ND. Os resultados mostraram que o alelo C representa aumento significativo do risco para o desenvolvimento da ND segundo os modelos genéticos alélico, aditivo e dominante. Entretanto, contrariando os estudos anteriormente citados, nenhuma associação entre o polimorfismo TGF- β 1 codon 10 T/C e a ND foi encontrada em estudos conduzidos com indianos (AHLUWALIA *et al.*, 2009) e com japoneses (AKAI *et al.*, 2001).

A associação entre o desenvolvimento da ND e a variação nos níveis de produção de TGF- β 1 tem sido proposta. Um dos principais achados histológicos da nefropatia é a expansão da matriz extracelular nas áreas mesangiais dos glomérulos (MAUER *et al.*, 1984). O TGF- β 1 é um dos principais fatores de crescimento que estimula a síntese de componentes da matriz extracelular como fibronectina, colágeno e proteoglicanos, além de impedir a degradação da matriz por diminuir a síntese de proteases e aumentar os níveis dos inibidores de proteases (IGNOTZ & MASSAGÉ, 1986; EDWARDS *et al.*, 1987; LAIHO *et al.*, 1987; BASSOLS & MASSAGÉ, 1988). Dessa forma, o aumento dos níveis de expressão de TGF- β 1 nas células renais poderia favorecer a hipertrofia renal e o acúmulo de matriz extracelular (TEN

DIJKE & HILL, 2004). Além disso, a produção de TGF- β 1 nos rins ou em culturas de células mesangiais e tubulares pode ser induzida por fatores que se relacionam ao desenvolvimento da ND, como hiperglicemia (SHARMA & ZIYADEH, 1994; HOFFMAN *et al.*, 1998), aumento da pressão intraglomerular, ativação do sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA) e hipertensão (SHARMA & ZIYADEH, 1995). Estudos já revelaram maior expressão da proteína TGF- β 1 e de seu mRNA em tecidos renais de pacientes com ND (YAMAMOTO *et al.*, 1993; SHARMA *et al.*, 1997).

Outra complicação do DM2 que foi associada aos polimorfismos TGF- β 1 codon 10 T/C e codon 25 C/G é a RD. BERÁNEK *et al.* (2002), em um estudo do tipo caso-controle com caucasianos, encontraram uma associação entre a RD proliferativa e os alelos T e G, respectivamente, dos polimorfismos codon 10 T/C e codon 25 C/G do TGF- β 1. A patogênese da RD proliferativa é caracterizada pelo aumento da vasopermeabilidade, proliferação de células endoteliais e angiogênese. A expressão de TGF- β 1 em tecidos oculares sob condições de hiperglicemia pode estimular a produção local de fatores angiogênicos como o VEGF e o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), atuar nos processos de migração e proliferação celular, além de estimular a produção de matriz extracelular (BERÁNEK *et al.*, 2002; PAINE *et al.*, 2012b).

2.6.3 Interleucina 10

A IL-10 é uma citocina com efeitos predominantemente anti-inflamatórios e imunossupressores, produzida principalmente por células T e B, monócitos e macrófagos (MTIRAOUÏ *et al.*, 2009). Suas ações sobre a modulação da resposta imune e inflamatória vêm da capacidade de IL-10 inibir a produção de citocinas pró-inflamatórias, bloquear a expressão do complexo maior de histocompatibilidade classe II (MHC II) e promover o desenvolvimento de células T regulatórias e a proliferação de células B (MOORE *et al.*, 2001). O gene da IL-10 humana está localizado no cromossomo 1 (1q31-1q32) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>). Seus níveis de expressão estão sob um íntimo controle genético, em virtude principalmente da presença de polimorfismos localizados na região promotora do seu gene. Entre esses

polimorfismos destacam-se o -1082G/A (rs1800896), -819T/C (rs1800871) e o -592C/A (rs1800872) (MTIRAOUI *et al.*, 2009).

Um estudo conduzido por VAN EXEL *et al.* (2002) demonstrou que a baixa capacidade de produção de IL-10 associa-se com altos níveis de glicemia, HbA1c, dislipidemia e DM2. À menor capacidade de produção de IL-10 estaria relacionada uma resposta pró-inflamatória exacerbada, com aumento da produção de TNF- α e IL-6, citocinas já associadas ao desenvolvimento de resistência à insulina (HOTAMISLIGIL *et al.*, 1994; HOTAMISLIGIL *et al.*, 1996) e dislipidemia (FEINGOLD & GRUNFELD, 1992; HOPKINS *et al.*, 1996). Diante disso, alguns estudos têm sido conduzidos buscando associar os polimorfismos de IL-10 com as complicações do DM2.

MTIRAOUI *et al.* (2009) avaliaram a possível associação entre os polimorfismos -1082G/A, -819T/C e -592C/A da IL-10 e a ND em um estudo caso-controle com uma população da Tunísia. Apenas para o polimorfismo -819T/C foi encontrada diferença significativa quando se comparou os indivíduos com ND e um grupo de pacientes com DM2 sem evidência desta complicação. No grupo com ND foi verificada menor frequência do genótipo -819TC e do alelo -819T. A análise de haplótipo revelou menor frequência dos haplótipos GTA e GTC no grupo com ND e uma análise de regressão multivariada demonstrou que GTA é um haplótipo de IL-10 que assume um caráter “néfro-protetor”. Estudo semelhante foi conduzido por KUNG *et al.* (2010) em uma população de taiwaneses. Entretanto, neste estudo, a ND foi associada apenas aos genótipos CC e AA do polimorfismo -592C/A.

KUNG *et al.* (2010) também avaliaram os níveis plasmáticos de IL-10 e os resultados demonstram que maiores níveis são encontrados entre os indivíduos com DM2 quando comparados a um grupo controle saudável, porém não houve diferença entre os níveis de IL-10 quando se comparou os grupos com ND e DM2 *versus* o grupo apenas com DM2. Além disso, conforme os achados de SCARPELLI *et al.* (2006), os indivíduos carreadores do genótipo AA do polimorfismo -592C/A apresentaram menor média de IL-10 plasmático quando comparados aos de genótipo CC e CA.

ARABABADI *et al.* (2012) não encontraram associação do polimorfismo -592C/A e a ND em um estudo com iranianos. Este trabalho demonstrou que o genótipo -592CC e o alelo -592C têm frequências mais altas no grupo de

pacientes apenas com DM2 e no grupo de pacientes com DM2 e ND quando comparados a um grupo controle hígido. Porém, essa diferença não se mantém quando os grupos de pacientes são comparados entre si. LEE *et al.* (2005) também não observaram associação entre o polimorfismo -592C/A e a ND. Já os estudos caso-controle de BABEL *et al.* (2006) e ERDOGAN *et al.* (2012) avaliaram a associação do polimorfismo -1082G/A com a ND, em alemães e turcos respectivamente. O primeiro encontrou associação do genótipo GG e a complicação, porém o segundo não conseguiu associar o polimorfismo à ND.

A patogênese da ND poderia se relacionar com a variação na capacidade de produção de IL-10, devido à influência que esta exerce sobre a resposta imune-inflamatória e na produção de citocinas pró-inflamatórias. Entretanto, ZAMAUSKAITE *et al.* (1999) demonstraram uma correlação positiva entre os níveis de IL-10 e a albuminúria entre pacientes com ND. Portanto, até o presente momento os achados permanecem conflitantes e inconclusivos.

O polimorfismo -1082G/A foi associado à NR e a RD proliferativa em estudos do tipo caso-controle conduzidos por KOLLA *et al.* (2009) e PAINE *et al.* (2012a), respectivamente, em indivíduos indianos. Em ambos os estudos o genótipo -1082GG e o alelo -1082G mostraram maior frequência entre os indivíduos diabéticos que apresentavam complicações da doença quando comparados aos indivíduos sem a complicação. É importante salientar que no estudo de KOLLA *et al.* (2009), o grupo controle era formado por indivíduos saudáveis e não por indivíduos com DM2 sem evidência de NR. Sabe-se que o alelo -1082G está associado a maiores níveis de expressão de IL-10 enquanto o alelo -1082A é associado com menor produção desta citocina (TURNER *et al.*, 1997). KOLLA *et al.* (2009) discutem que a associação do genótipo que confere maior nível de expressão da citocina à NR seria uma resposta natural do organismo na tentativa de regular a resposta imune-inflamatória, diminuindo, portanto, a produção de mediadores pró-inflamatórios.

Por outro lado, PAINE *et al.* (2012a) discutem a associação do genótipo -1082GG com a RD proliferativa ressaltando que o aumento da expressão de IL-10 induzida pela hiperglicemia, hipóxia e predisposição genética são parte dos fatores que estimulam a ativação alternativa de macrófagos, diferenciando-os em macrófagos M2. Macrófagos M2 possuem um caráter pró-angiogênico por induzirem a produção de VEGF e PDGF (MANTOVANI *et al.*, 2002;

MANTOVANI *et al.*, 2004; MANTOVANI *et al.*, 2005). Além disso, tem sido demonstrado que a IL-10 ativa a produção de óxido nítrico (NO) na retina e que a angiogênese induzida por VEGF é NO-dependente (FISCHER *et al.*, 1999; SENNLAUB *et al.*, 2001). Portanto, o aumento da expressão de IL-10 pode promover a angiogênese na RD proliferativa por impedir a infiltração de macrófagos anti-angiogênicos dentro da coróide e por estimular a polarização alternativa de macrófagos (MANTOVANI *et al.*, 2004).

2.6.4 Interleucina 6

A IL-6 é uma citocina multifuncional produzida principalmente por células T, macrófagos, células endoteliais, células musculares lisas, adipócitos, hepatócitos, e mais um número considerável de tipos celulares (KAMIMURA *et al.*, 2003). Dentre as várias ações desempenhadas pela IL-6, pode-se citar a regulação da produção de moléculas de adesão celular e mediadores quimiotáticos, estimulação da síntese de proteínas de fase aguda no fígado e mediação na liberação de outras citocinas que amplificam a resposta inflamatória (BARTON, 1996). O gene da IL-6 em humanos está localizado no cromossomo 7 (7p21) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>). O polimorfismo -174G/C (rs1800795), localizado na região promotora do gene, afeta sua expressão, onde o alelo G mostra maiores níveis de expressão de IL-6 (FISHMAN *et al.*, 1998). Sua influência sobre a patogênese das complicações microvasculares do DM2 tem sido discutida, visto que a hiperglicemia parece aumentar a expressão de IL-6 (BAMFORTH *et al.*, 1996).

A IL-6 é considerada um indutor da permeabilidade vascular (FUNATSU *et al.*, 2001) e indutor indireto da angiogênese por estimular a produção de VEGF (SULOCHANA *et al.*, 2001). O aumento da concentração de IL-6 no vítreo parece acelerar o processo de quebra da barreira hemato-retiniana (ROWLEY & VAN NESS, 2002) e da disfunção endotelial nos casos de RD (SULOCHANA *et al.*, 2001). Pacientes com DM2 e ND mostraram ter maiores níveis plasmáticos de IL-6 em comparação a pacientes sem ND (SEKIZUKA *et al.*, 1994). Além disso, DALLA VESTRA *et al.* (2005) demonstraram que os

níveis de IL-6 estão associados com o grau de proteinúria e o espessamento da membrana basal dos glomérulos.

RUDOFISKY *et al.* (2009), em um estudo caso-controle com um grupo de alemães, não encontraram associação do polimorfismo -174G/C com a RD, ND e NR quando se compararam grupos de pacientes com DM2 e portadores destas complicações com um grupo de pacientes apenas com DM2. Do mesmo modo, PAINE *et al.* (2012a) não observaram associação significativa entre esse polimorfismo de IL-6 e a RD proliferativa, em um estudo caso-controle com indianos. ABRAHAMIAN *et al.* (2007) e PAPAIOKONOMOU *et al.* (2013) também não encontraram diferença significativa entre as frequências genóticas e alélicas do polimorfismo -174G/C quando comparados os grupos caucasianos de DM2 com e sem ND. Entretanto, uma análise de regressão logística univariada no trabalho de PAPAIOKONOMOU *et al.* (2013) mostrou que homozigotos -174CC tiveram menor chance de ter ND do que heterozigotos -174GC.

Contrariando os estudos que não associaram o polimorfismo de IL-6 -174G/C à ND, NG *et al.* (2008) em um estudo caso-controle com caucasianos, relataram uma maior e significativa frequência do genótipo GG em um grupo de diabéticos com ND (presença de falência renal crônica e/ou doença renal em estágio final) quando comparado a um grupo de pacientes com DM2 sem ND. Entretanto, a distribuição de frequência dos genótipos do polimorfismo -174G/C no grupo com ND não estava em Equilíbrio de Hardy-Weinberg. Diante dos dados que demonstram que a frequência do alelo -174G é preponderante em várias populações [afro-americanos (96-100%), chineses (100%), japoneses (100%), hispânicos (80%)] (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/index.html>), estes autores discutem que a associação entre o alelo -174G e o risco de desenvolvimento da ND em pacientes com DM2 deve ser analisado sobre o ponto de vista da presença de um haplótipo de IL-6 no qual o alelo G esteja presente, e não analisado o polimorfismo de forma isolada.

2.6.5 Interferon gama

O IFN- γ é uma citocina pró-inflamatória que tem papel na defesa contra infecções virais e outros patógenos intracelulares, além de induzir resposta

imune mediada por mecanismos inflamatórios (BILLIAU *et al.*, 1998). O gene do IFN- γ humano está localizado no cromossomo 12 (12q14) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>).

Alguns estudos sugerem que o INF- γ participa da patogênese do DM por estimular a expressão de MHC classe I e II e moléculas de adesão de vários tipos celulares, incluindo as células beta pancreáticas (CAMPBELL *et al.*, 1985; SARVETNICK *et al.*, 1988). O polimorfismo +874T/A (rs2430561) localizado no primeiro íntron do gene do IFN- γ está relacionado a uma variação nos níveis de expressão desta citocina. O alelo +874T correlaciona-se à maior expressão de IFN- γ devido à presença de um sítio de ligação para o NF- κ B que exerce um importante papel na regulação da atividade transcricional do gene (PRAVICA *et al.*, 2000). Até o momento, apenas dois estudos buscaram avaliar a possível associação entre o polimorfismo INF- γ +874T/A e as complicações do DM2. PAINE *et al.* (2012b) em um estudo caso-controle com uma população da Índia encontraram uma associação entre a RD proliferativa e o genótipo TT e o alelo T do polimorfismo +874T/A quando comparado a um grupo de pacientes com DM2 e sem RD. Os autores discutem que o aumento nos níveis de IFN- γ nos tecidos oculares pode induzir de maneira indireta a angiogênese devido à ativação da expressão do VEGF (NAGINENI *et al.*, 2003). Além disso, KOLLA *et al.* (2009) encontraram uma associação entre o genótipo +874AA e a NR periférica quando comparado a um grupo de indivíduos hígidos numa população indiana.

Os trabalhos apresentados nesta revisão mostram a necessidade de se ampliar o estudo sobre os polimorfismos de citocinas e o desenvolvimento de complicações microvasculares do DM2. Além disso, cumpre ressaltar que não há dados sobre a população brasileira, que apresenta características genéticas próprias, para a qual não é possível extrapolar dados de frequência alélica de outras populações com diferentes *backgrounds* genéticos.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a associação de polimorfismos nos genes das citocinas TNF- α , TGF- β 1, IL-10, IL-6 e IFN- γ com a retinopatia, nefropatia e neuropatia, bem como com a hipertensão arterial, dislipidemia e obesidade em pacientes com diabetes mellitus tipo 2.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Selecionar pacientes com diabetes mellitus tipo 2 e classificá-los segundo a presença de retinopatia, nefropatia e neuropatia diabéticas.
- Avaliar, segundo dados clínicos e laboratoriais, a presença de hipertensão arterial, dislipidemia e obesidade.
- Padronizar pela técnica de reação em cadeia da polimerase alelo específica a genotipagem dos seguintes polimorfismos: TNF- α -308G/A, IL-10 -1082G/A, IL-10 -819T/C, IL-10 -592C/A, TGF- β 1 codon 10 T/C, TGF- β 1 codon 25 C/G, IL-6 -174G/C e IFN- γ +874T/A.
- Determinar a frequência alélica e genotípica destes polimorfismos em cada grupo.
- Avaliar a associação destes polimorfismos com as complicações microvasculares e comorbidades nos pacientes com diabetes mellitus tipo 2.

CAPÍTULO 1

Artigo original intitulado: Association of a large panel of cytokine gene polymorphisms with complications and comorbidities in type 2 diabetes patients

Association of a large panel of cytokine gene polymorphisms with complications and comorbidities in type 2 diabetes patients

Rodrigues, K. F.¹; Pietrani, N. T.¹; Sandrim, V. C.²; Vieira, C. M. A. F.³; Bosco, A. A.³; Gomes, K. B.^{1,4}

1 – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

2 – Instituto de Ensino e Pesquisa, Santa Casa de Belo Horizonte, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

3 – Santa Casa de Belo Horizonte, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

4 – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

Corresponding author:

Karina Braga Gomes

Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais

Av. Antônio Carlos, 6627, Pampulha, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

Zip code: 31270-901

Tel/fax: +55 (31) 3409-6895/ +55 (31) 3409-6885

E-mail: karinabgb@gmail.com

ABSTRACT

Type 2 diabetes (T2D) is associated with a state of chronic low-grade inflammation and the synthesis and release of pro- and anti-inflammatory cytokines and their polymorphisms may be involved in T2D pathogenesis and its complications. We investigated the association of the cytokine polymorphisms (TNF- α -308G/A, IL-10 -1082G/A, IL-10 -819 T/C, IL-10 -592 C/A, TGF- β 1 codon 10 T/C, TGF- β 1 codon 25 C/G, IL-6 -174G/C, and IFN- γ +874T/A) with the T2D microvascular complications (retinopathy, nephropathy, and neuropathy) and comorbidities (hypertension, dyslipidemia, and obesity) in T2D patients. This case-control study included 102 T2D patients. Cytokine genotypes were determined by PCR-SSP using Cytokine Genotyping Tray (One Lambda[®]). Diabetic retinopathy was associated with GG genotype and G allele in TGF- β 1 codon 25 C/G polymorphism ($p=0.004$ and $p=0.018$) and the nephropathy was associated the lower frequency of GG genotype in IL-10 -1082G/A polymorphism ($p=0.049$). Hypertension was associated with the CC genotype and C allele for IL-10 -592C/A polymorphism ($p=0.013$ and $p=0.009$), and higher frequencies of T ($p=0.047$) and C ($p=0.033$) alleles of the TGF- β 1 codon 10 T/C and IL-10 -819T/C polymorphisms, respectively. The TGF- β 1 codon 10 T/C polymorphism was associated with the BMI groups ($p=0.026$): the CC genotype was more frequent in the group with BMI < 25 Kg/m², while the TC genotype was more frequent in the group with BMI \geq 30 Kg/m². Our findings suggest that TGF- β 1 and IL-10 polymorphisms are involved in complications and comorbidities in T2D patients. Our results may be relevant for future studies aiming to predict T2D complications.

Keywords: type 2 diabetes, cytokine, inflammation, polymorphisms, complications.

1. INTRODUCTION

Type 2 diabetes (T2D) is the most common form of diabetes and an increasingly prevalent metabolic disease. It is associated with microvascular and macrovascular complications and is considered one of the major causes of morbidity and mortality [1]. According to the International Diabetes Federation (IDF) [2] there were approximately 370 million people worldwide with diabetes in 2012, and this number is expected to reach more than 550 million by 2030.

In recent decades several studies have shown the role of chronic low-grade inflammation and activation of the immune system in the pathogenesis of T2D and its complications [3-5]. However, the mechanisms by which chronic inflammation is involved in T2D are not completely clear. It has been reported that synthesis and release of pro- and anti-inflammatory cytokines such as Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α), Interleukin (IL)-10, and IL-6 [6, 7, 8], and growth factors such as Transforming Growth Factor- β 1 (TGF- β 1) [9] may be involved in pathogenesis of T2D and its complications. Single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the cytokine genes are usually located in their regulatory regions and affect the levels of their expression [10, 11]. Various studies have associated cytokine gene expression alterations with obesity, changes in insulin sensitivity, and risk of T2D [3-5, 12].

Some works have investigated the association between the TNF- α -308 G/A polymorphism (rs1800629) and diabetic retinopathy (DRP), nephropathy (DNP), and neuropathy (DNR) in different populations, but no significant results were found [13-18]. DNP was associated with the polymorphisms IL-10 -592C/A (rs1800872) [19] and IL-10 -819T/C (rs1800871) [1]. In addition, Paine *et al.* [14] associated the polymorphism -1082G/A (rs1800896) with DRP and Kolla *et al.* [18] observed an association with DNR. The human TGF- β 1 gene presents two hotspot focuses: codon 10 T/C (rs1800470) and codon 25 C/G (rs1800471). Both polymorphisms were associated with DRP by Beránek *et al.* [20], and El-Sherbini *et al.* [21] found an association between DNP and the codon 10 T/C polymorphism. However, IL-6 gene polymorphism -174G/C (rs1800795) was not associated with either DRP, DNP, or DNR in studies conducted by Rudofsky *et al.* [22], Abrahamian *et al.* [23], and Paine *et al.* [14]. The few studies that evaluated the association of the polymorphism IFN- γ

+874T/A (rs2430561) with diabetes complications, found association between this polymorphism and DRP [24], and with DNR [18].

In spite of the existence of several reports examining the association of polymorphisms in various cytokine genes, much controversy remains about their role in diabetes complications. No studies to date have examined in a single population a large number of polymorphisms (TNF- α -308G/A, IL-10 -1082G/A, IL-10 -819T/C, IL-10 -592C/A, TGF- β 1 codon 10 T/C, TGF- β 1 codon 25 C/G, IL-6 -174G/C, and IFN- γ +874T/A) and their association with the T2D complications and comorbidities.

In this study we investigated if these polymorphisms are associated with the T2D microvascular complications (DRP, DNP, and DNR) and with comorbidities (hypertension, dyslipidemia, and obesity) in a group of Brazilian T2D patients.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1. Subjects

This study was conducted with 102 Brazilian individuals, including 19 men and 83 women with clinical and laboratory diagnosis of T2D, aged from 32 to 70 years (54.99 ± 8.97 years), recruited from the Clinic of Endocrinology, Santa Casa Hospital (Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil) in the period of June 2012 to September 2013. T2D diagnosis was based on the American Diabetes Association (ADA) [25]. DRP was diagnosed by ophthalmoscopic examination through fundoscopic examination and slitlamp microscopic examination with present lens. DNP was defined as albumin excretion rate (AER) > 30mg/24h and without coexisting renal diseases from causes other than diabetes; and no DNP was defined at an AER < 30mg/24h, at least 2 out of 3 urine collections over a 3 month period. DNR was defined according to Diabetes Control and Complication Trial (DCCT) [26] criteria. The physical examination by neurologist and the presence of signs, symptoms (dysesthesias, paresthesias, hypersensitivity to touch or burning pain) or absent deep tendon reflexes configured DNR presence. Two patients could not be classified according to the presence or absence of DNP due to lack of laboratory data. The determination of hypertension (systolic blood pressure ≥ 140 mmHg or

diastolic blood pressure ≥ 80 mmHg or use of antihypertensive drugs) and dyslipidemia (LDL-cholesterol ≥ 100 mg/dL, HDL-cholesterol ≤ 50 mg/dL and triglycerides ≥ 150 mg/dL or treatment of hyperlipidemia) is also in accordance with the criteria adopted by ADA [25]. Clinical data (body mass index – BMI, T2D onset) and laboratory data (fasting and postprandial glucose, HbA1c) were obtained from medical records.

Patients with over 70 years of age, pregnant women, clinical conditions as cancer, autoimmune disease, recent history of heart attack, stroke or thrombosis and acute inflammatory/infectious diseases were excluded from this study.

The project was approved by the Ethics Committee of the Federal University of Minas Gerais and Santa Casa Hospital. Informed consent was obtained from all the patients.

2.2. Genomic DNA isolation and genotyping

Genomic DNA was obtained from a sample of peripheral blood collected in EDTA. The Biopur Mini Spin kit (Biometrix[®]) was used for the DNA extraction. The polymorphisms were determined using the Cytokine Genotyping Tray kit (One Lambda[®]) which employs Polymerase Chain Reaction - Sequence Specific Primers (PCR-SSP), followed by electrophoresis in 2.5% agarose gel stained with GelGreen Stain (Biotium[®]).

For association analyses of polymorphisms, patients were divided into groups according to the complication (DRP, DNP, DNR) and comorbidity presented (hypertension, dyslipidemia, BMI – categorized into BMI < 25 Kg/m², BMI 25-30 Kg/m², and BMI ≥ 30 Kg/m²).

2.3. Statistical analysis

Deviations from Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) were tested using an exact test (available at: http://genepop.curtin.edu.au/genepop_op1.html). All of the statistical analyses were performed with Statistical Package of the Social Sciences (SPSS) version 13.0. The analysis of normality was performed by Shapiro-Wilk test. Data are presented as mean \pm standard deviation (normal variables), median (interquartile range - IQR) (no normal variables), or percentage of total (categorical variables).

Differences in the allele and genotype frequencies between the groups (DRP, DNP, DNR, hypertension, dyslipidemia, and BMI) were tested by Pearson's χ^2 -test or Fisher's exact test with residuals test for three groups. For normal variables, Student's *t*-test was used to determine differences in means; for no normal variables, Kruskal-Wallis and Mann-Whitney tests were used to determine differences in medians.

IL-10 haplotype estimation was done by software Phase 2.1. We excluded haplotypes whose frequency was less than 5%. The differences in the haplotype frequencies between the groups (DRP, DNP, DNR, hypertension, dyslipidemia, and BMI) were tested by χ^2 -test. P value <0.05 was considered statistically significant.

3. RESULTS

The T2D patients were classified according to the complications listed above. As expected, individuals with DRP were older than those without this complication ($p=0.013$). A slight tendency toward higher fasting glucose was observed in patients with DRP ($p=0.074$), however postprandial glucose level was significantly increased in this group ($p=0.013$) when compared to individuals without DRP. This complication was significantly more frequent in patients with more than 10 years since T2D diagnosis when compared to patients diagnosed less than 5 or between 5 and 10 years earlier ($p<0.0001$). Moreover, BMI was decreased in DRP patients ($p<0.0001$). No significant difference was observed between the groups regarding gender, HbA1c, and the frequency of hypertension and dyslipidemia ($p>0.05$) (Table 1).

T2D patients with DNP presented significantly increased fasting and postprandial glucose levels, and HbA1c%. As seen in the DRP group, patients with nephropathy were older and the BMI was lower than the group without this complication ($p<0.0001$ for both). Patients with T2D onset >10 years were the most frequent group presenting DNP ($p=0.001$). No significant differences were observed for gender, hypertension, and dyslipidemia frequencies between DNP positive and negative patients, similarly to the results for the DRP group reported above (Table 2).

Regarding DNR, we observed a significant difference concerning age and gender between the groups presenting this complication or not ($p=0.012$ and $p=0.003$, respectively). DNR occurred more frequently in older and in female patients. The other variables were not significantly different between DNR positive and negative patients ($p>0.05$), although a trend toward more dyslipidemic individuals was observed in the DNR group ($p=0.079$) (Table 3).

Next, we performed an analysis of genotype and allele frequencies involving a large number of polymorphisms for cytokine genes including TNF- α , IL-10, TGF- β 1, IL-6, and INF- γ for all complication groups. We found that all polymorphisms were under Hardy-Weinberg equilibrium ($p>0.05$ for all).

We observed that DRP is associated with the GG genotype and G allele in TGF- β 1 codon 25 C/G polymorphism ($p=0.004$ and $p=0.018$). The DRP patients presented the following genotype and allele frequencies: GG 92.42%, GC 6.06%, CC 1.52%, G 95.45%, and C 4.55%; whereas patients without DRP showed the frequencies: GG 72.22%, GC 27.78%, CC 0%, G 86.11%, and C 13.89%. In addition, DNP is associated with lower frequency of GG genotype in IL-10 -1082G/A polymorphism ($p=0.049$). The frequencies observed were: patients with DNP – GG 8.75%, GA 50.00%, AA 41.25%, and patients without DNP – GG 25.00%, GA 25.00%, AA 50.00%. No other polymorphism was associated with DRP, DNP, or DNR (Supplementary material – Table 1).

Since IL-10 -1082G/A polymorphism showed association with DNP, an analysis of haplotype frequencies of IL-10 polymorphisms (-1082G/A, -819T/C, and -512C/A) was performed in the patients grouped according to their T2D complications. However, no haplotype was associated with DRP, DNP, or DNR (Table 4).

Interestingly, individuals who presented the AA genotype in IFN- γ +874T/A polymorphism presented lower fasting glucose levels when compared to the other genotypes: TT [median (IQR) = 146.0 (106.0) mg/dL], TA [134.0 (65.0) mg/dL] and AA [114.0 (53.5) mg/dL]; [TT x TA ($p=0.783$); TT x AA ($p=0.045$); TA x AA ($p=0.015$)].

The patients also were evaluated according to the presence of comorbidities such as hypertension, dyslipidemia, and BMI categories concerning the presence of the same polymorphisms. The analysis of the genotype frequencies revealed the association of hypertension with the CC

genotype and C allele for IL-10 -592C/A polymorphism ($p=0.013$ and $p=0.009$, respectively). The frequencies observed were: patients with hypertension (CC 50.00%, CA 39.36%, AA 10.54%, C 69.68%, and A 30.32%) and patients without hypertension (CC 25.00%, CA 25.00%, AA 50.00%, C 37.50%, and A 62.50%). A higher frequency of T allele for the TGF- β 1 codon 10 T/C ($p=0.047$) and C allele for the IL-10 -819 T/C ($p=0.033$) were also observed in patients with hypertension.

Moreover, a significant association was found between the polymorphism TGF- β 1 codon 10 T/C and BMI groups ($p=0.026$). The CC genotype was more frequent in the group with BMI < 25 Kg/m², while the TC genotype was more frequent in the group with BMI ≥ 30 Kg/m². No difference was found in the group with BMI 25-30 Kg/m². The frequencies observed were: BMI < 25 Kg/m² (TT 26.32%, TC 42.10%, and CC 31.58%); BMI 25-30 Kg/m² (TT 48.00%, TC 40.00%, and CC 12.00%), and BMI ≥ 30 Kg/m² (TT 31.04%, TC 62.07%, and CC 6.89%). We also found a trend for association of the polymorphism IL-10 -592C/A and the BMI groups ($p=0.058$). In this case, the AA genotype was less frequent in the BMI ≥ 30 Kg/m² group. No other polymorphism was associated with hypertension, dyslipidemia, or BMI categories (Supplementary material – Table 2).

Since IL-10 -592C/A polymorphism showed an association and a tendency for association with hypertension and BMI groups, respectively, an analysis of haplotype frequencies for IL-10 polymorphisms (-1082G/A, -819T/C, and -512C/A) was performed in the patients grouped according to T2D comorbidities. For this analysis, BMI was categorized into two groups: BMI < 30 Kg/m² and BMI ≥ 30 Kg/m². However, no haplotype was associated with hypertension, dyslipidemia, and BMI categories (Table 4).

4. DISCUSSION

This study investigated the association of cytokine gene polymorphisms in T2D patients including T2D complications: DRP, DNP, and DNR; as well as comorbidities commonly observed in these patients: hypertension, dyslipidemia, and obesity.

When the patients were grouped according to T2D complications, the clinical and laboratory characteristics revealed, as expected, that DRP, DNP, and DNR are more common in older individuals with longer diagnostic T2D, because of their association with disease progression. Significant difference in the levels of postprandial glucose was observed in the DRP and DNP cases when compared to the T2D group without complications. Higher levels of fasting glucose and HbA1c were found significant in the DNP group. These results suggest a relationship between the hyperglycemic status and the development of microvascular complications of T2D. Although higher levels of fasting glucose, postprandial glucose, and HbA1c were observed in patients with DNR, these levels were not significantly different from those found in T2D individuals without this complication. The small sample of individuals presenting DNR may explain the lack of significance concerning these variables in this group.

Patients with DRP and DNP showed lower BMI when compared to individuals without these complications. These findings seem contradictory, because obesity is considered a main risk factor for T2D and its complications [27]. This inconsistency may be explained by the fact that individuals with higher BMI were also those with shorter T2D onset and therefore presented fewer complications (data not shown). Curiously, a higher frequency of women was observed in the DNR group, although the reason underlying this observation is not clear. Studies involving a much larger sample may be necessary to confirm this finding and explore the possible causes for this observation.

DRP is the most frequent cause of newly detected cases of blindness in adults [25]. In the present study, DRP was associated with the GG genotype and G allele of TGF- β 1 codon 25 C/G polymorphism. This polymorphism is located in the region of the gene encoding the signal peptide and causes a change in the amino acid sequence (G/Arg \rightarrow C/Pro) [28]. The G (Arg) allele has been associated with increased TGF- β 1 production [29]. TGF- β 1 modulates ocular cell migration and proliferation by inducing fibroblast growth factor-like and platelet-derived growth factor, which accelerate the process of retinal neovascularization [30]. TGF- β 1 is also involved in extracellular matrix deposition (an essential step in new vessel formation) and stimulates angiogenesis in patients with ischemia and proliferative DRP [31]. Another case-control study with T2D patients with diabetic proliferative retinopathy found

an association of the polymorphisms TGF- β 1 codon 25 C/G (G allele) and TGF- β 1 codon 10 T/C (T allele) with proliferative diabetic retinopathy [20]. Although the present study did not find significant association with other polymorphisms, the studies published by Paine *et al.* [14, 24] showed the association of the polymorphisms IL-10 -1082G/A and IFN- γ +874T/A with proliferative diabetic retinopathy. This discrepancy may be due to the genetic background of the populations studied since Paine *et al.* [14, 24] evaluated Indian ethnic groups.

DNP is a common cause of end-stage renal disease and the major cause of morbidity and premature mortality in patients with T2D [25]. Structurally, DNP is characterized by renal hypertrophy, mesangial matrix expansion, glomerulosclerosis, and tubulointerstitial fibrosis [32]. Recently, it has become evident that chronic inflammatory mechanisms contribute to the development and progression of DNP, such as infiltration of renal compartments by lymphocytes and monocytes (or macrophages) as well as local production of cytokines and chemokines in the kidney [33, 34]. Studies have observed that acute phase markers of inflammation (C reactive protein, fibrinogen, and IL-6) were correlated to proteinuria in T2D patients [35, 36] and showed that increased TNF- α levels were linked with DNP progression [37]. In our study, DNP was associated with lower frequency of GG genotype polymorphism IL-10 -1082G/A, which is related with higher expression of this cytokine. In fact, IL-10 is an anti-inflammatory cytokine and down-regulates pro-inflammatory production of TNF- α , IL-6, and MCP-1 [38]. Thereby, lower production of IL-10 may be associated with a high production of pro-inflammatory cytokines and an exacerbated inflammatory response with subsequent renal injury in T2D patients. Previous studies revealed the association of other polymorphisms of IL-10 with DNP. Ezzidi *et al.* [1], in a case-control study with T2D patients from Tunisia, found a higher frequency of T allele (IL-10 -819T/C) in the group with DNP. Kung *et al.* [19] found higher frequency of the genotypes AA and CC for the IL-10 -592C/A polymorphism in individuals with the DNP in a Taiwanese population. In contrast to the current results, no association was found between the IL-10 -1082G/A polymorphism and DNP in patients from Turkey [39]. Thus, it is possible that the different polymorphisms may reflect the genetic background of the population studied.

IFN- γ is a pivotal pro-inflammatory cytokine implicated in the induction of immune mediated inflammatory response [40]. Studies suggest that IFN- γ participates in the pathogenesis of diabetes mellitus by up-regulating the expression of MHC I / MHC II antigens and adhesion molecules on pancreatic β cells [41, 42]. Herein we report an association between the AA genotype polymorphism IFN- γ +874T/A with lower glucose levels than those presented by patients carrying other genotypes. It is known that the allele +874T is associated to high IFN- γ levels, whereas the allele +874A is associated to low production of this cytokine [18]. Thus, decreased expression of IFN- γ may contribute to the down-regulation inflammatory response in T2D patients and consequently to allowing better glycemic control.

It is known that obesity and visceral fat contribute to the development of hypertension, insulin resistance, and diabetes mellitus [27]. Typically hypertension is a clinical condition commonly present in the patient at diagnosis of T2D, and the elevation of blood pressure often occurs before the onset of microalbuminuria [43]. In our study we found an association between the CC genotype and C allele for IL-10 -592C/A polymorphism and hypertension; furthermore we found a trend for association of the same polymorphism and BMI groups, since the -592AA genotype was less frequent in the obese T2D patients. In addition, we observed an association between the C allele for the IL-10 -819 T/C polymorphism and patients with hypertension. For both IL-10 polymorphisms the C allele is related with higher expression levels of this cytokine. Fichtlscherer *et al.* [44] reported that increased IL-10 levels were associated with improved systemic endothelial vasoreactivity in patients with elevated serum CRP levels, a condition commonly observed in T2D patients. Furthermore, Zeyda *et al.* [45] demonstrated that human adipose tissue macrophages (ATMs) produce high levels of IL-10. Consequently, increased levels of IL-10 could be associated with an exacerbated inflammatory profile in which the balance between pro- and anti-inflammatory cytokines contributes to chronic low-grade inflammation observed in obesity and T2D, as well as being involved in increased blood pressure.

Obesity also showed a relation to TGF- β 1 codon 10 T/C polymorphism. The CC genotype was more frequent in the group with BMI < 25 Kg/m², while the TC genotype was more frequent in the group with BMI \geq 30 Kg/m². This

polymorphism consists of a T→C transition at nucleotide 29 in the region encoding the signal peptide sequence, which results in a Leu→Pro substitution at amino acid 10. Studies have shown that the C allele increases the production of the TGF-β1 protein [46, 47]. The TGF-β1 is a multifunctional cytokine and shows anti-inflammatory action such as suppressing generation of free radicals, as well as vasculoprotective properties [48]. TGF-β1 can inhibit the adhesion and transmigration of neutrophils and T cells to the endothelium, inhibit production of adhesion molecules by the endothelial cells, and inhibit macrophage foam cell formation [49-52]. The higher frequency of the CC genotype found in patients with a BMI < 25 Kg/m² suggests that the increased expression of TGF-β1 and its potential anti-inflammatory effect can facilitate the control of adiposity, since obese individuals have higher frequency TC genotype.

A higher frequency of T allele for the TGF-β1 codon 10 T/C was observed in T2D patients with hypertension. Although some studies have demonstrated that TGF-β1 is associated to increased risk of essential hypertension through the stimulation of endothelin-1 expression in the vascular endothelium, release of renin from the juxtaglomerular cells in the kidney, and regulation of angiotensin II expression [53-55], no study has evaluated the impact of this polymorphism on hypertension in diabetic patients. Thus, our results suggest that lower expression of TGF-β1 could predispose to diabetic hypertension due to lack of anti-inflammatory and protective TGF-β1 effects in vascular endothelium.

5. CONCLUSION

In conclusion, this is the first study to evaluate the association of a large panel of polymorphisms of cytokine genes with complications and comorbidities in T2D patients. However, the small sample of this study is considered a limitation and further studies including clinical classifications concerning nonproliferative/proliferative DRP and autonomic/chronic sensorimotor DNR may improve our current understanding about the link between the cytokine polymorphisms, their expression levels, and the development or progression of

these complications. Taken together, our results may be relevant for future molecular studies aiming to predict possible T2D complications.

Conflict of interest

All authors declare no conflicts of interest.

Acknowledgments

The authors thank FAPEMIG, CAPES, CNPq/Brazil, and PRPq/UFMG for financial support.

This manuscript was reviewed by a professional science editor and by a native English-speaking copy editor to improve readability.

6. REFERENCES

[1] Ezzidi I, Mtiraoui N, Kacem M, Mallat SG, Mohamed MBH, Chaieb M et al. Interleukin-10 -592C/A, -819C/T and -1082A/G promoter variants affect the susceptibility to nephropathy in Tunisian type 2 diabetes (T2DM) patients. *Clin Endocrinol (Oxf)* (2009) 70:401-7.

[2] International Diabetes Federation, *IDF Diabetes Atlas*. 5th edition (2012) <www.idf.org/diabetesatlas> [accessed Aug 15, 2013].

[3] Dandona P, Aljada A, Bandyopadhyay A. Inflammation: the link between insulin resistance, obesity and diabetes. *Trends Immunol.* (2004) 25:4-7.

[4] Shoelson SE, Lee J, Goldfine AB. Inflammation and insulin resistance. *J Clin Invest.* (2006) 116:1793-801.

[5] King GL. The role of inflammatory cytokines in diabetes and its complications. *J Periodontol.* (2008) 79:1527-34.

- [6] Moller DE. Potencial role of TNF- α in the pathogenesis of insulin resistance and type 2 diabetes. *Trends Endocrinol Metab.* (2000) 11:212-7.
- [7] Moore KW, de Waal-Malefyt R, Coffman RL, O'Garra A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol.* (2001) 19:683-765.
- [8] Pickup JC, Mattock MB, Chusney GD, Burt D. NIDDM as a disease of the innate immune system: association of acute-phase reactants and interleukin-6 with metabolic syndrome-X. *Diabetologia* (1997) 40:1286-92.
- [9] Li MO, Wan YY, Sanjabi S, Robertson AKL, Flavell RA. Transforming growth factor-B regulation of immune responses. *Ann Rev Immunol.* (2006) 24: 99-146.
- [10] Hutchinson IV, Turner DM, Sankaran D, Awad MR, Sinnott PJ. Influence of cytokine genotypes on allograft rejection, *Transplant Proc.* (1998) 30:862-3.
- [11] Sankaran D, Asderakis A, Ashraf S, Roberts IS, Dyer PA et al. Cytokine gene polymorphisms predict acute graft rejection following renal transplantation. *Kidney Int.* (1999) 56:281-8.
- [12] Xu H. Obesity and metabolic inflammation. *Drug Discov Today Dis Mech.* (2013) 10:21-25.
- [13] Yoshioka K, Yoshida T, Takakura Y, Umekawa T, Kogure A. et al. Relationship between polymorphisms 804C/A and 252A/G of lymphotoxin- α gene and -308G/A of tumor necrosis factor α gene and diabetic retinopathy in Japanese patients with type 2 diabetes mellitus. *Metabolism.* (2006) 55:1406-10.
- [14] Paine SK, Sen A, Choudhuri S, Mondal IK, Chowdhury IH, Basu A. et al., Association of tumor necrosis factor α , interleukin 6, and interleukin 10 promoter polymorphism with proliferative diabetic retinopathy in type 2 diabetic subjects. *Retina.* (2012) 32:1197-203.

- [15] Lindholm E, Bakhtadze E, Cilio C, Agardh E, Groop L, Agardh CD. Association between LTA, TNF and AGER polymorphisms and late diabetic complications. *PLoS One* (2008) 3:e2546.
- [16] Babel N, Gabdrakhmanova L, Hammer MH, Schoenemann C, Skrypnikov V, Poliak N et al. Predictive value of cytokine gene polymorphisms for the development of end-stage renal disease. *J Nephrol.* (2006) 19:802-7.
- [17] Prasad P, Tiwari AK, Kumar KMP, Ammini AC, Gupta A et al. Association of TGF β 1, TNF α , CCR2 and CCR5 gene polymorphisms in type-2 diabetes and renal insufficiency among Asian Indians. *BMC Med Genet.* (2007) 8:20.
- [18] Kolla VK, Madhavi G, Reddy BP, Pulla B, Babu BMVS, Yashovanthi J et al. Association of tumor necrosis factor alpha, interferon gamma and interleukin 10 gene polymorphisms with peripheral neuropathy in South Indian patients with type 2 diabetes. *Cytokine* (2009) 47:173–7.
- [19] Kung WJ, Lin CC, Liu SH, Chaung HC. Association of interleukin-10 polymorphisms with cytokines in type 2 diabetic nephropathy. *Diabetes Technol Ther.* (2010) 12:809-13.
- [20] Beránek M, Kanková K, Benes P, Izakovicová-Hollá L, Znojil V, Hájek D et al. Polymorphism R25P in the gene encoding Transforming Growth Factor-Beta (TGF- β 1) is a newly identified risk factor for proliferative diabetic retinopathy. *Am J Med Genet.* (2002) 109:278-83.
- [21] El-Sherbini SM, Shahen SM, Mosaad YM, Abdelgawad MS, Talaat RM. Gene polymorphism of transforming growth factor- β 1 in Egyptian patients with type 2 diabetes and diabetic nephropathy. *Acta Biochim Biophys Sin.* (2013) 45:330-8.
- [22] Rudofsky Jr G, Schlotterer A, Reismann P, Engel J, Grafe IA, Tafel J et al. The -174G>C IL-6 gene promoter polymorphism and diabetic microvascular complications. *Horm Metab Res.* (2009) 41:308-13.

[23] Abrahamian H, Endler G, Exner M, Mauler H, Raith M, Endler L et al. Association of low-grade inflammation with nephropathy in type 2 diabetic patients: role of elevated CRP-levels and 2 different gene-polymorphisms of proinflammatory cytokines. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. (2007) 115:38-41.

[24] Paine SK, Basu A, Mondal LK, Sen A, Choudhuri S, Chowdhury IH et al. Association of vascular endothelial growth factor, transforming growth factor beta, and interferon gamma gene polymorphisms with proliferative diabetic retinopathy in patients with type 2 diabetes. *Molecular Vision* (2012) 18:2749-57.

[25] American Diabetes Association. Standards of medical care in diabetes – 2012. *Diabetes Care* (2012) 35:S11-63.

[26] The DCCT Research Group. Factors in development of diabetic neuropathy. Baseline analysis of neuropathy in feasibility phase of Diabetes Control and Complications Trial (DCCT). *Diabetes* (1988) 37:476-81.

[27] Kopelman PG. Obesity as a medical problem. *Nature* (2000) 404:635-43.

[28] Cambien F, Ricard S, Troesch A, Mallet C, Générénaz L, Evans A et al. Polymorphisms of the transforming growth factor-beta 1 gene in relation to myocardial infarction and blood pressure. The Etude Cas-Témoin de l'Infarctus du Myocarde (ECTIM) Study. *Hypertension* (1996) 28:881-7.

[29] Awad MR, El-Gamel A, Hasleton P, Turner DM, Sinnott PJ, Hutchinson IV. Genotypic variation in the transforming growth factor-beta1 gene: association with transforming growth factor-beta1 production, fibrotic lung disease, and graft fibrosis after lung transplantation. *Transplantation* (1998) 66:1014-20.

[30] Nagineni CN, Cherukuri KS, Kutty V, Detrick B, Hooks JJ. Interferon-gamma differentially regulates TGF-beta1 and TGF-beta2 expression in human retinal pigment epithelial cells through JAK-STAT pathway. *J Cell Physiol*. (2007) 210:192-200.

- [31] Praidou A, Androudi S, Brazitikos P, Karakiulakis G, Papakonstantinou E, Dimitrakos S. Angiogenic growth factors and their inhibitors in diabetic retinopathy *Curr Diabetes Rev.* (2010) 6:304-12.
- [32] Yamagishi S, Fukami K, Ueda S, Okuda S. Molecular mechanisms of diabetic nephropathy and its therapeutic intervention. *Curr. Drug Targets.* (2007) 8:952–9
- [33] Ruster C, Wolf G. The role of chemokines and chemokine receptors in diabetic nephropathy. *Front Biosci.* (2008) 13:944–55.
- [34] Navarro-Gonzalez JF, Mora-Fernandez C. The role of inflammatory cytokines in diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol.* (2008) 19:433–42.
- [35] Pradhan AD, Manson JE, Rifai N, Buring JE, Ridker PM. C-reactive protein, interleukin 6, and risk of developing type 2 diabetes mellitus. *JAMA.* (2001) 286: 327–34.
- [36] Dalla Vestra M, Mussap M, Gallina P, Bruseghin M, Cernigoi AM, Saller A. et al. Acute-phase markers of inflammation and glomerular structure in patients with type 2 diabetes. *J Am Soc Nephrol.* (2005) 16:S78-82.
- [37] Navarro JF, Mora C, Maca M, Garca J. Inflammatory parameters are independently associated with urinary albumin in type 2 diabetes mellitus. *Am J Kidney Dis.* (2003) 42:53-61.
- [38] Kucharzik T, Lügering N, Pauels HG, Domschke W, Stoll R. IL-4, IL-10 and IL-13 down-regulate monocyte-chemoattracting protein-1 (MCP-1) production in activated intestinal epithelial cells. *Clin Exp Immunol.* (1998) 111:152-7.
- [39] Erdogan M, Cetinkalp S, Ozgen AG, Saygili F, Berdeli A, Yilmaz C. Interleukin-10 (-1082G/A) gene polymorphism in patients with type 2 diabetes with and without nephropathy. *Genet Test Mol Biomarkers.* (2012) 16:91-4.

[40] Billiau A, Heremans H, Vermeire K, Matthys P. Immunomodulatory properties of interferon-gamma. *Ann NY Acad Sci.* (1998) 856:22-32.

[41] Campbell IL, Wong GH, Schrader JW, Harrison LC. Interferon-gamma enhances the expression of the major histocompatibility class I antigens on mouse pancreatic beta cells. *Diabetes* (1985) 34:1205-10.

[42] Sarvetnick N, Liggitt D, Pitts SL, Hansen SE, Steward TE. Insulin-dependent diabetes mellitus induced in transgenic mice by ectopic expression of class II MHC and interferon-gamma. *Cell* (1988) 52:773-7.

[43] Saad MJA, Maciel RMB, Mendonça BB. *Endocrinologia.* Atheneu, São Paulo, 2007.

[44] Fichtlscherer S, Breuer S, Heeschen C, Dimmeler S, Zeiher AM. Interleukin-10 serum levels and systemic endothelial vasoreactivity in patients with coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol.* (2004) 44:44-9.

[45] Zeyda M, Farmer D, Todoric J, Aszmann O, Speiser M, Györi G et al. Human adipose tissue macrophages are of an anti-inflammatory phenotype but capable of excessive pro-inflammatory mediator production. *Int J Obes (Lond).* (2007) 31:1420-8.

[46] Li B, Khanna A, Sharma V, Singh T, Suthanthiran M, August P. TGF-beta 1 DNA polymorphisms, protein levels and blood pressure. *Hypertension* (1999) 33:271-5.

[47] Celedón JC, Lange C, Raby BA, Litonjua AA, Palmer LJ, DeMeo DL et al. The transforming growth factor-beta 1 (TGFB1) gene is associated with chronic obstructive pulmonary disease (COPD). *Hum Mol Genet.* (2004) 13:1649-56.

[48] Fragoso JM, Martínez-Ríos MA, Alvarez-León E, Vallejo M, Peña-Duque MA, Posadas-Sánchez R et al. The T29C polymorphism of the transforming

growth factor-b1 (TGF-b1) gene is associated with genetic susceptibility to acute coronary syndrome in Mexican patients. *Cytokine* (2012) 58:380-3.

[49] Gamble JR, Vadas MA. Endothelial adhesiveness for blood neutrophils is inhibited by transforming growth factor- β 1. *Science* (1988) 99:242-97.

[50] Gamble JR, Vadas MA. Endothelial cell adhesiveness for human T lymphocytes is inhibited by transforming growth factor- β 1. *J Immunol.* (1991) 146:1149-54.

[51] Smith WB, Noack L, Khew-Goodall Y, Isenmann S, Vadas MA, Gamble JR. Transforming growth factor- β 1 inhibits the production of IL-8 and the transmigration of neutrophils through activated endothelium. *J Immunol.* (1996) 157:360-8.

[52] DiChiara MR, Kiely JM, Gimbrone Jr MA, Lee ME, Perrella MA, Topper JN. Inhibition of E-selectin gene expression by transforming growth factor- β in endothelial cells involves coactivator integration of Smad and nuclear factor κ B-mediated signals. *J Exp Med.* (2000) 192:695-704.

[53] Lijnen PJ, Petrov VV, Fagard RH. Association between transforming growth factor- β and hypertension. *Am J Hypertens.* (2003) 16:604-11.

[54] Yan-yan L. Transforming Growth Factor β 1 +869T/C gene polymorphism and essential hypertension: a meta-analysis involving 2708 participants in the chinese population. *Intern Med.* (2011) 50:1089-92.

[55] Xi B, Wang Q, Pan H. Transforming growth factor-b1 gene +869T/C, but not +915G/C polymorphism is associated with essential hypertension in a Chinese patient cohort. *Mol Biol Rep.* (2012) 39: 6107–12.

Table 1: Clinical and laboratorial characteristics in T2D patients considering retinopathy (DRP).

Variables	Diabetic retinopathy		
	Yes (n =66)	No (n =36)	p
Age (years)	57.00 (12.00)	52.50 (15.00)	0.013*
Gender (male/female) %	22.73 / 77.27	11.11 / 88.89	0.150
BMI (Kg/m ²)	29.95 ± 5.90	37.17 ± 6.95	<0.0001*
Hypertension (Yes/-No) %	89.39 / 10.61	97.22 / 2.78	0.254
Dyslipidemia (Yes/No) %	95.45 / 4.55	91.67 / 8.33	0.663
Fasting glucose (mg/dL)	143.00 (97.00)	118.00 (62.75)	0.074
Postprandial glucose (mg/dL)	225.00 (96.50)	144.50 (130.00)	0.013*
HbA1c (%)	9.28 ± 1.62	8.31 ± 2.35	0.104
T2D onset (years) %			
≤ 5	7.58 ^b	45.46	
5 - 10	12.12	18.18	<0.0001*
≥ 10	80.30 ^a	36.36	

BMI (Body Mass Index), HbA1c (Glycated Hemoglobin)

Normal variables (BMI and HbA1c): the data are shown as mean ± standard deviation

No normal variables (age, fasting glucose, and postprandial glucose): the data are shown as median (interquartile range)

Categorical variables (gender, hypertension, dyslipidemia, and T2D onset): the data are shown as "percentage of total"

*p<0.05 was considered statistically significant

^a(more frequent); ^b(less frequent) – residual analysis

Table 2: Clinical and laboratorial characteristics in T2D patients considering nephropathy (DNP).

Variables	Diabetic nephropathy		
	Yes (n =80)	No (n =20)	p
Age (years)	58.00 (13.00)	50.50 (9.00)	<0.0001*
Gender (male/female) %	21.25 / 78.75	10.00 / 90.00	0.348
BMI (Kg/m ²)	30.48 ± 6.06	40.55 ± 5.23	<0.0001*
Hypertension (Yes/ No) %	90.00 / 10.00	100.00 / 0	0.204
Dyslipidemia (Yes/No) %	96.25 / 3.75	85.00 / 15.00	0.092
Fasting glucose (mg/dL)	143.00 (97.50)	117.00 (55.50)	0.027*
Postprandial glucose (mg/dL)	214.00 (107.50)	144.50 (122.25)	0.045*
HbA1c (%)	9.24 ±1.88	7.73 ± 1.84	0.006*
T2D onset (years) %			
≤ 5	11.54 ^b	47.37	
5 - 10	14.10	15.79	0.001*
≥ 10	74.36 ^a	36.84	

BMI (Body Mass Index), HbA1c (Glycated Hemoglobin)

Normal variables (BMI and HbA1c): the data are shown as mean ± standard deviation

No normal variables (age, fasting glucose, and postprandial glucose): the data are shown as median (interquartile range)

Categorical variables (gender, hypertension, dyslipidemia, and T2D onset): the data are shown as "percentage of total"

*p<0.05 was considered statistically significant

^a(more frequent); ^b(less frequent) – residual analysis

Table 3: Clinical and laboratorial characteristics in T2D patients considering neuropathy (DNR).

Variables	Diabetic neuropathy		
	Yes (n =42)	No (n =60)	p
Age (years)	58.00 (12.00)	53.50 (15.00)	0.012*
Gender (male/female) %	4.76 / 95.24	28.33 / 71.67	0.003*
BMI (Kg/m ²)	30.89 ± 5.79	33.84 ± 7.87	0.356
Hypertension (Yes/-No) %	90.48 / 9.52	93.33 / 6.67	0.714
Dyslipidemia (Yes/No) %	100.00 / 0	90.00 / 10.00	0.079
Fasting glucose (mg/dL)	145.00 (95.00)	125.50 (68.00)	0.711
Postprandial glucose (mg/dL)	226.00 (100.00)	185.00 (107.25)	0.195
HbA1c (%)	9.22 ± 2.04	8.71 ± 1.90	0.969
T2D onset (years) %			
≤ 5	15.00	23.73	
5 - 10	12.50	15.25	0.471
≥ 10	72.50	61.02	

BMI (Body Mass Index), HbA1c (Glycated Hemoglobin)

Normal variables (BMI and HbA1c): the data are shown as mean ± standard deviation

No normal variables (age, fasting glucose, and postprandial glucose): the data are shown as median (interquartile range)

Categorical variables (gender, hypertension, dyslipidemia, and T2D onset): the data are shown as "percentage of total"

*p<0.05 was considered statistically significant

Table 4: Haplotype distribution of IL-10 promoter gene (-1082G/A, -819T/C, and -592C/A) in T2D patients considering complications and comorbidities.

T2D complications / comorbidities		Haplotypes			p ^a	p ^b	p ^c
		ACC%	ATA%	GCC%			
Retinopathy	Yes (n=66)	31.07	34.08	34.08	0.778	0.563	0.778
	No (n=36)	34.86	29.03	35.98			
Nephropathy	Yes (n=80)	32.52	33.11	33.73	0.832	0.750	0.916
	No (n=20)	32.58	29.92	37.42			
Neuropathy	Yes (n=42)	29.77	38.08	30.94	0.670	0.300	0.550
	No (n=60)	34.22	28.28	37.44			
Hypertension	Yes (n=94)	34.06	30.30	35.62	0.418	0.204	0.418
	No (n=8)	12.71	55.79	24.54			
Dyslipidemia	Yes (n=96)	32.36	32.22	34.82	1.000	1.000	1.000
	No (n=6)	34.02	32.46	32.54			
BMI	< 30 (n=44)	28.54	37.36	32.82	0.480	0.344	0.825
	≥ 30 (n=58)	35.36	28.43	36.19			

BMI (Body Mass Index): Kg/m²

p<0.05 was considered statistically significant

p^a: ACC *versus* (ATA + GCC)

p^b: ATA *versus* (ACC + GCC)

p^c: GCC *versus* (ACC + ATA)

SUPPLEMENTARY MATERIAL

Table SM1: Distributions of genotypes and alleles frequencies in T2D patients considering complications.

Polymorphisms		Retinopathy			Nephropathy			Neuropathy		
		Yes (n=66) (%)	No (n=36) (%)	p	Yes (n=80) (%)	No (n=20) (%)	p	Yes (n=42) (%)	No (n=60) (%)	p
TNF-α -308G/A (rs1800629)	Genotypes									
	GG	49 (74.24)	29 (80.56)	0.252	61 (76.25)	16 (80.00)	0.164	36 (85.71)	42 (70.00)	0.118
	GA	17 (25.76)	6 (16.67)		19 (23.75)	3 (15.00)		6 (14.29)	17 (28.33)	
	AA	0	1 (2.77)		0	1 (5.00)		0	1 (1.67)	
	Alleles			0.713			1.000			0.062
G	115 (87.12)	64 (88.89)	141 (88.13)		35 (87.50)	78 (92.86)		101 (84.17)		
A	17 (12.88)	8 (11.11)	19 (11.87)	5 (12.50)	6 (7.14)	19 (15.83)				
TGF-β1 codon 10 T/C (rs1800470)	Genotypes									
	TT	25 (37.88)	10 (27.78)	0.246	28 (35.00)	6 (30.00)	0.363	13 (30.95)	22 (36.67)	0.814
	TC	31 (46.97)	23 (63.89)		40 (50.00)	13 (65.00)		23 (54.76)	31 (51.67)	
	CC	10 (15.15)	3 (8.33)		12 (15.00)	1 (5.00)		6 (14.29)	7 (11.66)	
	Alleles			0.819			0.772			0.549
T	81 (61.36)	43 (59.72)	96 (60.00)		25 (62.50)	49 (58.33)		75 (62.50)		
C	51 (38.64)	29 (40.28)	64 (40.00)	15 (37.50)	35 (41.67)	45 (37.50)				
TGF-β1 codon 25 C/G (rs1800471)	Genotypes									
	GG	61 (92.42)	26 (72.22)	0.004*	69 (86.25)	16 (80.00)	0.578	34 (81.00)	53 (88.33)	0.307
	GC	4 (6.06)	10 (27.78)		10 (12.50)	4 (20.00)		8 (19.00)	6 (10.00)	
	CC	1 (1.52)	0,0		1 (1.25)	0		0	1 (1.67)	

	Alleles									
	G	126 (95.45)	62 (86.11)	0.018*	148 (92.50)	36 (90.00)	0.532	76 (90.48)	112 (93.33)	0.455
	C	6 (4.55)	10 (13.89)		12 (7.50)	4 (10.00)		8 (9.52)	8 (6.67)	
IL-10 -1082G/A (rs1800896)	Genotypes									
	GG	8 (12.12)	4 (11.11)	0.841	7 (8.75)	5 (25.00)	0.049*	3 (7.14)	9 (15.00)	0.474
	GA	29 (43.94)	18 (50.00)		40 (50.00)	5 (25.00)		20 (47.62)	27 (45.00)	
	AA	29 (43.94)	14 (38.89)		33 (41.25)	10 (50.00)		19 (45.24)	24 (40.00)	
	Alleles									
G	45 (34.09)	26 (36.11)	0.772	54 (33.75)	15 (37.50)	0.655	26 (30.95)	45 (37.50)	0.334	
A	87 (65.91)	46 (63.89)		106 (66.25)	25 (62.50)		58 (69.05)	75 (62.50)		
IL-10 -819T/C (rs1800871)	Genotypes									
	TT	10 (15.15)	3 (8.33)	0.613	11 (13.75)	2 (10.00)	0.905	8 (19.05)	5 (8.33)	0.266
	TC	25 (37.88)	15 (41.67)		31 (38.75)	8 (40.00)		16 (38.10)	24 (40.00)	
	CC	31 (46.97)	18 (50.00)		38 (47.50)	10 (50.00)		18 (42.85)	31 (51.67)	
	Alleles									
T	45 (34.09)	21 (29.17)	0.472	53 (33.13)	12 (30.00)	0.706	32 (38.10)	34 (28.33)	0.142	
C	87 (65.91)	51 (70.83)		107 (66.87)	28 (70.00)		52 (61.90)	86 (71.67)		
IL-10 -592C/A (rs1800872)	Genotypes									
	CC	31 (46.97)	18 (50.00)	0.498	38 (47.50)	10 (50.00)	0.847	18 (42.86)	31 (51.67)	0.165
	CA	24 (36.36)	15 (41.67)		30 (37.50)	8 (40.00)		15 (35.71)	24 (40.00)	
	AA	11 (16.67)	3 (8.33)		12 (15.00)	2 (10.00)		9 (21.43)	5 (8.33)	
Alleles										
	C	86 (65.15)	51 (70.83)	0.409	106 (66.25)	28 (70.00)	0.652	51 (60.71)	86 (71.67)	0.101

	A	46 (34.85)	21 (29.17)		54 (33.75)	12 (30.00)		33 (39.29)	34 (28.33)	
IL-6 -174G/C (rs1800795)	Genotypes									
	GG	46 (69.69)	23 (63.89)	0.692	55 (68.75)	13 (65.00)	0.808	27 (64.29)	42 (70.00)	0.891
	GC	15 (22.73)	11 (30.56)		19 (23.75)	6 (30.00)		12 (28.57)	14 (23.33)	
	CC	5 (7.58)	2 (5.55)		6 (7.50)	1 (5.00)		3 (7.14)	4 (6.67)	
	Alleles									
G	107 (81.06)	57 (79.17)	0.745	129 (80.63)	32 (80.00)	0.929	66 (78.57)	98 (81.67)	0.584	
C	25 (18.94)	15 (20.83)		31 (19.37)	8 (20.00)		18 (21.43)	22 (18.33)		
INF-γ +874T/A (rs2430561)	Genotypes									
	TT	10 (15.15)	3 (8.33)	0.465	10 (12.50)	3 (15.00)	0.363	4 (9.52)	9 (15.00)	0.455
	TA	30 (45.45)	15 (41.67)		38 (47.50)	6 (30.00)		17 (40.48)	28 (46.67)	
	AA	26 (39.39)	18 (50.00)		32 (40.00)	11 (55.00)		21 (50.00)	23 (38.33)	
	Alleles									
T	50 (37.88)	21 (29.17)	0.212	58 (36.25)	12 (30.00)	0.459	25 (29.76)	46 (38.33)	0.206	
A	82 (62.12)	51 (70.83)		102 (63.75)	28 (70.00)		59 (70.24)	74 (61.67)		

*p<0.05 was considered statistically significant

Table SM2: Distributions of genotypes and alleles frequencies in T2D patients considering comorbidities.

Polymorphisms		Hypertension			Dyslipidemia			BMI			
		Yes (n=94) (%)	No (n=8) (%)	p	Yes (n=96) (%)	No (n=6) (%)	p	< 25 Kg/m ² (n=19) (%)	25 - 30 Kg/m ² (n=25) (%)	≥ 30 Kg/m ² (n=58) (%)	p
TNF-α -308G/A (rs1800629)	Genotypes										
	GG	71 (75.53)	7 (87.50)		73 (76.04)	5 (83.33)		14 (73.68)	22 (88.00)	42 (72.41)	
	GA	22 (23.40)	1 (12.50)	0.704	22 (22.92)	1 (16.67)	1.000	5 (26.32)	3 (12.00)	15 (25.86)	0.625
	AA	1 (1.07)	0		1 (1.04)	0		0	0	1 (1.73)	
	Alleles										
	G	164 (87.23)	15 (93.75)	0.699	168 (87.50)	11 (91.67)	1.000	33 (86.84)	47 (94.00)	99 (85.34)	p ^a ,p ^b ,p ^c >0.05
	A	24 (12.77)	1 (6.25)		24 (12.50)	1 (8.33)		5 (13.16)	3 (6.00)	17 (14.66)	
TGF-β1 codon 10 T/C (rs1800470)	Genotypes										
	TT	34 (36.17)	1 (12.50)		34 (35.42)	1 (16.67)		5 (26.32)	12 (48.00)	18 (31.04)	
	TC	50 (53.19)	4 (50.00)	0.073	50 (52.08)	4 (66.66)	0.858	8 (42.10)	10 (40.00)	36 (62.07) ^a	0.026*
	CC	10 (10.64)	3 (37.50)		12 (12.50)	1 (16.67)		6 (31.58) ^a	3 (12.00)	4 (6.89) ^b	
	Alleles										
	T	118 (62.77)	6 (37.50)	0.047*	118 (61.46)	6 (50.00)	0.430	18 (47.37)	34 (68.00)	72 (62.07)	p ^a ,p ^b ,p ^c >0.05
	C	70 (37.23)	10 (62.50)		74 (38.54)	6 (50.00)		20 (52.63)	16 (32.00)	44 (37.93)	
TGF-β1 codon 25 C/G (rs1800471)	Genotypes										
	GG	80 (85.11)	7 (87.50)		82 (85.42)	5 (83.33)		16 (84.21)	21 (84.00)	50 (86.21)	
	GC	13 (13.83)	1 (12.50)	1.000	13 (13.54)	1 (16.67)	1.000	3 (15.79)	3 (12.00)	8 (13.79)	0.613
	CC	1 (1.06)	0		1 (1.04)	0		0	1 (4.00)	0	
	Alleles										

	G	173 (92.02)	15 (93.75)	1.000	177 (92.19)	11 (91.67)	1.000	35 (92.11)	45 (90.00)	108 (93.10)	p ^a ,p ^b ,p ^c >0.05
	C	15 (7.98)	1 (6.25)		15 (7.81)	1 (8.33)		3 (7.89)	5 (10.00)	8 (6.90)	
IL-10 -1082G/A (rs1800896)	Genotypes										
	GG	12 (12.77)	0		11 (11.46)	1 (16.67)		2 (10.53)	2 (8.00)	8 (13.79)	
	GA	43 (45.74)	4 (50.00)	0.694	45 (46.88)	2 (33.33)	0.870	11 (57.89)	10 (40.00)	26 (44.83)	0.677
	AA	39 (41.49)	4 (50.00)		40 (41.66)	3 (50.00)		6 (31.58)	13 (52.00)	24 (41.38)	
	Alleles										
	G	67 (35.64)	4 (25.00)	0.586	67 (34.90)	4 (33.33)	1.000	15 (39.47)	14 (28.00)	42 (36.21)	p ^a ,p ^b ,p ^c >0.05
	A	121 (64.36)	12 (75.00)		125 (65.10)	8 (66.67)		23 (60.53)	36 (72.00)	74 (63.79)	
IL-10 -819T/C (rs1800871)	Genotypes										
	TT	10 (10.64)	3 (37.50)		12 (12.50)	1 (16.67)		4 (21.05)	5 (20.00)	4 (6.90)	
	TC	37 (39.36)	3 (37.50)	0.079	38 (39.58)	2 (33.33)	1.000	9 (47.37)	6 (24.00)	25 (43.10)	0.133
	CC	47 (50.00)	2 (25.00)		46 (47.92)	3 (50.00)		6 (31.58)	14 (56.00)	29 (50.00)	
	Alleles										
	T	57 (30.32)	9 (56.25)	0.033*	62 (32.29)	4 (33.33)	1.000	17 (44.74)	16 (32.00)	33 (28.45)	p ^a ,p ^b ,p ^c >0.05
	C	131 (69.68)	7 (43.75)		130 (67.71)	8 (66.67)		21 (55.26)	34 (68.00)	83 (71.55)	
IL-10 -592C/A (rs1800872)	Genotypes										
	CC	47 (50.00)	2 (25.00)		46 (47.92)	3 (50.00)		6 (31.58)	14 (56.00)	29 (50.00)	
	CA	37 (39.36)	2 (25.00)	0.013*	37 (38.54)	2 (33.33)	1.000	9 (47.37)	5 (20.00) ^b	25 (43.10)	0.058
	AA	10 (10.64)	4 (50.00)		13 (13.54)	1 (16.67)		4 (21.05)	6 (24.00)	4 (6.90) ^b	
	Alleles										
	C	131 (69.68)	6 (37.50)	0.009*	129 (67.19)	8 (66.67)	1.000	21 (55.26)	33 (66.00)	83 (71.55)	p ^a ,p ^b ,p ^c >0.05
	A	57 (30.32)	10 (62.50)		63 (32.81)	4 (33.33)		17 (44.74)	17 (34.00)	33 (28.45)	

IL-6 -174G/C (rs1800795)	Genotypes										
	GG	65 (69.15)	4 (50.00)		66 (68.75)	3 (50.00)		13 (68.42)	15 (60.00)	41 (70.69)	
	GC	24 (25.53)	2 (25.00)	0.117	24 (25.00)	2 (33.33)	0.457	5 (26.32)	7 (28.00)	14 (24.14)	0.806
	CC	5 (5.32)	2 (25.00)		6 (6.25)	1 (16.67)		1 (5.26)	3 (12.00)	3 (5.17)	
	Alleles										
G	154 (81.91)	10 (62.50)	0.060	156 (81.25)	8 (66.67)	0.257	31 (81.58)	37 (74.00)	96 (82.76)	p ^a , p ^b , p ^c > 0.05	
C	34 (18.09)	6 (37.50)		36 (18.75)	4 (33.33)		7 (18.42)	13 (26.00)	20 (17.24)		
INF-γ +874T/A (rs2430561)	Genotypes										
	TT	11 (11.70)	2 (25.00)		12 (12.50)	1 (16.67)		3 (15.78)	4 (16.00)	6 (10.34)	
	TA	40 (42.55)	5 (62.50)	0.236	44 (45.83)	1 (16.67)	0.336	8 (42.11)	15 (60.00)	22 (37.93)	0.228
	AA	43 (45.74)	1 (12.50)		40 (41.67)	4 (66.66)		8 (42.11)	6 (24.00)	30 (51.73)	
	Alleles										
T	62 (32.98)	9 (56.25)	0.061	68 (35.42)	3 (25.00)	0.548	14 (36.84)	23 (46.00)	34 (29.31)	p ^c = 0.038*	
A	126 (67.02)	7 (43.75)		124 (64.58)	9 (75.00)		24 (63.16)	27 (54.00)	82 (70.69)	p ^a , p ^b > 0.05	

BMI - Body Mass Index

*p < 0.05 was considered statistically significant

p^a: group (BMI ≤ 25 Kg/m²) versus group (BMI 25 - 30 Kg/m²)

p^b: group (BMI ≤ 25 Kg/m²) versus group (BMI ≥ 30 Kg/m²)

p^c: group (BMI 25 - 30 Kg/m²) versus group (BMI ≥ 30 Kg/m²)

a (more frequent); b (less frequent) – residual analysis

4. DISCUSSÃO

O presente estudo investigou, em pacientes com DM2, a associação de polimorfismos em genes de citocinas com as principais complicações microvasculares da doença (RD, ND e NR), bem como com comorbidades comumente observadas nesses pacientes (hipertensão arterial, dislipidemia e obesidade).

A análise das características clínicas e laboratoriais dos pacientes, quando agrupados de acordo com a complicação do DM2, revelou que a RD, ND e NR são mais comuns em indivíduos mais velhos e com maior tempo de diagnóstico da doença. Indivíduos com RD e ND apresentaram níveis mais elevados de glicemia pós-prandial quando comparados aqueles sem as complicações. Também foi observado maiores níveis de glicemia de jejum e HbA1c no grupo com ND. Esses achados reforçam a associação entre o descontrole glicêmico, o maior tempo de exposição à hiperglicemia, a progressão da doença e o desenvolvimento de complicações microvasculares.

Embora tenham sido encontrados níveis mais elevados de glicemia de jejum, glicemia pós-prandial e HbA1c no grupo com NR quando comparado aos indivíduos sem NR, esses dados não mostraram significância estatística, provavelmente em função do pequeno número de indivíduos que apresentam NR.

Pacientes com RD e ND mostraram ter IMC médio inferior aos indivíduos sem as complicações. Esse achado parece contraditório, uma vez que a obesidade é considerada um fator de risco para o desenvolvimento do DM2 e suas complicações. Entretanto, observamos que os pacientes do estudo com maiores valores de IMC foram aqueles com menor tempo de diagnóstico da doença e, portanto, apresentavam menos complicações. Curiosamente, uma maior frequência de mulheres foi observada no grupo com NR, embora não estejam claras as razões que justifiquem esse achado. Estudos com maior grupo amostral são necessários para confirmar esse resultado e explorar as possíveis causas dessa observação.

A RD é a principal causa de cegueira em adultos e afeta cerca de 60% dos indivíduos com DM2 com mais de 20 anos de duração da doença. Neste estudo, foi encontrada uma associação entre o genótipo GG e o alelo G do polimorfismo TGF- β 1 codon 25 C/G com a RD. Esse polimorfismo localizado no éxon 1 do gene do TGF- β 1 humano resulta na substituição de uma Arginina

(alelo G) por uma Prolina (alelo C) na sequência do peptídeo sinal; e tem influência sobre os níveis de expressão da citocina (BERÁNEK *et al.*, 2002).

Um estudo *in vitro* com células mononucleares periféricas humanas demonstrou que, após estímulo, indivíduos com genótipo homozigoto Arg/Arg (GG) apresentaram maior produção de TGF- β 1 do que indivíduos heterozigotos Arg/Pro (GC) (AWAD *et al.*, 1998). Sob condições de hiperglicemia, a expressão de TGF- β 1 em tecidos oculares pode estimular a produção local de fatores angiogênicos como VEGF e PDGF, atuar nos processos de migração e proliferação celular, além de estimular a produção de matriz extracelular (BERÁNEK *et al.*, 2002; PAINE *et al.*, 2012b), contribuindo portanto, para a patogênese da RD e corroborando com os achados deste estudo.

BERÁNEK *et al.* (2002) conduziram um estudo semelhante com caucasianos e também encontraram associação entre o alelo G do polimorfismo TGF- β 1 codon 25 C/G e pacientes com RD proliferativa quando comparados a pacientes com DM2 sem essa complicação. As frequências alélicas encontradas no presente estudo [pacientes com RD (G 95,45% e C 4,55%) e pacientes sem RD (G 86,11% e C 13,89%)] quando comparadas ao estudo de BERÁNEK *et al.* (2002) [pacientes com RD proliferativa (G 99,3% e C 0,7%) e pacientes sem RD proliferativa (G 88,7% e C 11,3%)], mostraram-se semelhantes.

Embora no presente estudo nenhuma outra associação significativa entre a RD e os demais polimorfismos estudados tenha sido encontrada, outros trabalhos descreveram algumas associações: BERÁNEK *et al.* (2002) encontraram uma associação entre o alelo T do polimorfismo TGF- β 1 codon 10 T/C e a RD proliferativa em caucasianos; PAINE *et al.* (2012a, 2012b) observaram uma associação entre o genótipo GG e o alelo G do polimorfismo IL-10 -1082G/A, do genótipo TT e o alelo T do polimorfismo IFN- γ +874T/A, e a RD proliferativa em indianos.

Diante destes resultados, pode-se concluir que a associação do genótipo GG (TGF- β 1 codon 25 C/G), que está relacionado a maior expressão de TGF- β 1, com a RD pode estar associada com o efeito angiogênico do TGF- β 1, e que os diferentes *backgrounds* genéticos das populações nas quais estudos de associação semelhantes a este foram conduzidos, devem em parte justificar as diferenças de resultados entre eles.

A ND é uma das mais importantes complicações microvasculares do DM e a causa mais comum de doença renal crônica, contribuindo assim para o aumento da mortalidade em decorrência do diabetes. A ND é caracterizada por alterações em todos os compartimentos renais, levando à expansão da matriz extracelular dos glomérulos, hipertrofia glomerular e tubular, expansão mesangial, glomeruloesclerose e fibrose tubulointersticial. O aumento da pressão arterial, declínio da função renal, uremia e insuficiência renal terminal, são os desfechos mais comuns da doença (RAPTIS & VIBERTI, 2001; VALLADARES-SALGADO *et al.*, 2010). No presente estudo foi encontrada uma baixa frequência do genótipo GG do polimorfismo IL-10 -1082G/A nos pacientes com ND, genótipo este associado à maior produção de IL-10 (TURNER *et al.*, 1997). A IL-10 é uma citocina anti-inflamatória que modula a resposta imune principalmente por inibir a produção de citocinas pró-inflamatórias e citocinas Th1, bloquear a expressão de MHC classe II e moléculas co-estimuladoras na superfície das células apresentadoras de antígenos, e promover o desenvolvimento de células T reguladoras (MOORE *et al.*, 2001). LEE *et al.* (2005) sugerem que devido à hiperglicemia, o desenvolvimento de uma inflamação sistêmica e/ou intrarenal seria importante para o desenvolvimento e progressão da ND.

Trabalhos apontam que pacientes com DM2 e microalbuminúria ou proteinúria evidente têm níveis séricos e urinários de TNF- α e IL-6 mais elevados do que pacientes diabéticos normoalbuminúricos (SHIKANO *et al.*, 2000; NAVARRO *et al.*, 2003). Dessa forma, a baixa frequência do genótipo GG no grupo com ND, correspondendo, portanto, a menor capacidade de produção de IL-10, poderia favorecer uma resposta inflamatória exacerbada nos rins com aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α e IL-6, contribuindo para o desenvolvimento e progressão da nefropatia.

Contrariamente, ERDOGAN *et al.* (2012), em um estudo caso-controle com pacientes diabéticos da Turquia, não conseguiram encontrar nenhuma diferença significativa para as frequências genotípicas e alélicas do polimorfismo IL-10 -1082G/A entre os grupos com e sem a ND. Embora os demais polimorfismos estudados no presente trabalho não tenham sido associados a esta complicação, outros estudos conduzidos de modo semelhante conseguiram encontrar associação entre alguns polimorfismos de

citocinas e a ND (Quadro 3). As diferenças populacionais nas quais os estudos de associação são conduzidos, o tamanho amostral limitado e a seleção de pacientes com pouco tempo de diagnóstico do DM2, às vezes não suficiente para que as complicações da doença se desenvolvam, são fatores que podem contribuir para as diferenças encontradas entre os estudos.

O IFN- γ é uma citocina pró-inflamatória que tem um importante papel na indução da resposta imune mediada por mecanismos inflamatórios (BILLIAU *et al.*, 1998). Alguns estudos sugerem que o IFN- γ pode participar da patogênese do DM2, principalmente por estimular a expressão de antígenos MHC classe I e II e moléculas de adesão em vários tipos celulares, incluindo as células beta pancreáticas (CAMPBELL *et al.*, 1985; SARVETNICK *et al.*, 1988). Além disso, existem evidências de que juntamente com o TNF- α , o IFN- γ induz a expressão de VEGF. Assim, IFN- γ exibe um perfil angiogênico, fibrogênico e vasculoreativo (NAGINENI *et al.*, 2003). Neste trabalho, foi observada uma associação entre o genótipo AA do polimorfismo +874T/A do gene do IFN- γ com menores níveis de glicemia de jejum quando comparadas às medianas dos demais genótipos. O alelo +874T está relacionado a maior expressão de IFN- γ , enquanto que o alelo +874A a menor expressão da citocina. Isso se deve ao fato de que o alelo T possui um sítio de ligação para o fator de transcrição NF- κ B, proteína que tem importante papel na indução transcricional do gene do IFN- γ (PRAVICA *et al.*, 2000). Dessa maneira, pode-se inferir que a menor expressão de INF- γ , conferida pela presença do genótipo AA, está associada a um melhor controle dos níveis glicêmicos. Portanto, quanto maior o estado pró-inflamatório, menor a capacidade de resposta à ação da insulina, o que corrobora com dados já relatados em outros trabalhos (DANDONA *et al.*, 2004; PICKUP, 2004; YE, 2013)

Quadro 3: Estudos que associam polimorfismos de citocinas à nefropatia diabética (ND).

Estudo / Polimorfismo	Delineamento	Principais resultados	Origem da população
Lee et al., 2005 TNF- α -308G/A	Grupo caso: pacientes com DM2 (>20 anos de diagnóstico) com falência renal progressiva (n=124) Grupo controle: pacientes com DM2 (>10 anos de diagnóstico) sem evidência de nefropatia (n=126)	Menor frequência do alelo -308A no grupo com nefropatia (p<0,05)	Coréia do Sul
El-Sherbini et al., 2013 TGF- β 1 codon 10 T/C	Grupo caso: pacientes com DM2 e nefropatia (n=49) Grupo controle: pacientes com DM2 sem nefropatia (n=50)	Maior frequência do genótipo TC no grupo com nefropatia (p<0,05)	Egito
Buraczynska et al., 2007 TGF- β 1 codon 10 T/C	Grupo caso: pacientes com DM2 e nefropatia (n=245) Grupo controle: pacientes com DM2 sem nefropatia (n=168)	Maior frequência do genótipo CC no grupo com nefropatia (p<0,05)	Polônia
Babel et al., 2006 TGF- β 1 codon 10 T/C IL-10 -1082G/A	Grupo caso: pacientes com DM2 e nefropatia (n=44) Grupo controle: indivíduos hígidos (n=118)	Maior frequência dos genótipos TT (codon 10 T/C) e GG (-1082G/A) no grupo com nefropatia (p<0,001 e p<0,01, respectivamente)	Alemanha
Wong et al., 2003 TGF- β 1 codon 10 T/C	Grupo caso: pacientes com DM2 (>10 anos de diagnóstico) e nefropatia (n=58) Grupo controle: pacientes com DM2 (>10 anos de diagnóstico) sem nefropatia (n=65)	Maior frequência dos genótipos TC e CC no grupo com nefropatia (p<0,05)	China
Valladares-Salgado et al., 2010 TGF- β 1 codon 10 T/C TGF- β 1 codon 25 C/G	Grupo caso: pacientes com DM2 (>15 anos de diagnóstico) e nefropatia (n=228) Grupo controle: pacientes com	Maior frequência dos genótipos TC e CC (TGF- β 1 codon 10 T/C) (p=0,016); GC e CC (TGF- β 1 codon 25 C/G) (p=0,008) no grupo com	México

	DM2 (>15 anos de diagnóstico) sem nefropatia (n=192)	nefropatia	
Kung et al., 2010 IL-10 -512C/A	Grupo caso: pacientes com DM2 e nefropatia diagnosticada há pelo menos 2 anos (n=24) Grupo controle: pacientes com DM2 com função renal normal há pelo menos 5 anos (n=23)	Maior frequência dos genótipos CC e AA no grupo com nefropatia (p<0,05)	Taiwan
Mtiraoui et al., 2009 IL-10 -819T/C	Grupo caso: pacientes com DM2 e nefropatia (n=515) Grupo controle: pacientes com DM2 (n=402)	Menor frequência do genótipo TC (p=0,036) e do alelo T (p=0,021) no grupo com nefropatia	Tunísia

A obesidade é definida como o índice de massa corporal (IMC) igual ou superior a 30 Kg/m² e sabe-se que o acúmulo central ou visceral de gordura contribui para o desenvolvimento de resistência à insulina, DM e hipertensão (KOPELMAN, 2000). O aumento da adiposidade está relacionado às alterações funcionais do tecido adiposo, para o qual se observa: 1) aumento da produção de moléculas bioativas, como leptina, resistina, angiotensina e citocinas pró-inflamatórias; 2) acúmulo de gordura ectópica em tecidos, tais como músculo esquelético e fígado, o que, por sua vez, contribui para a resistência à insulina e hiperinsulinemia; 3) aumento do estresse oxidativo e da produção de ROS; 4) injúria renal; 5) aumento da resistência vascular periférica (KURUKULASURIYA *et al.*, 2011). A hipertensão, por sua vez, é uma condição clínica normalmente presente no paciente no momento do diagnóstico do DM2, ou seja, a elevação da pressão arterial em muitos casos ocorre antes do aparecimento de microalbuminúria (SAAD *et al.*, 2007).

No presente estudo, o polimorfismo IL-10 -592C/A revelou uma associação significativa da presença do genótipo CC e do alelo C com a hipertensão arterial; esse mesmo polimorfismo também mostrou uma tendência de associação com indivíduos obesos, onde o genótipo AA foi o menos frequente entre eles. Além disso, uma associação do alelo C do polimorfismo

IL-10 -819T/C, entre os hipertensos, também foi observada. Para ambos, os polimorfismos de IL-10 (-592C/A e -819T/C), o genótipo CC está relacionado ao aumento da expressão desta citocina.

A IL-10 é uma citocina anti-inflamatória predominantemente produzida por monócitos, macrófagos e linfócitos T e B. Suas propriedades anti-inflamatórias incluem a inibição do fator de transcrição NF- κ B, reduzindo a expressão de citocinas pró-inflamatórias, a inibição das metaloproteinases que degradam a matriz, redução da expressão do fator tecidual, inibição da apoptose de macrófagos e monócitos após infecção e promoção da diferenciação fenotípica de linfócitos para um perfil Th2 (ARAI *et al.*, 1995; LACRAZ *et al.*, 1995; WANG *et al.*, 1995; LINDMARK *et al.*, 1998; GUNNETT *et al.*, 2002).

Experimentalmente, a IL-10 demonstrou proteger a função endotelial após um estímulo inflamatório agudo ao limitar a geração de superóxido dentro da parede vascular. Também já se demonstrou que a IL-10 controla a disfunção endotelial durante o desenvolvimento do DM por reduzir a produção de ânions superóxido (MALLAT *et al.*, 1999; GUNNETT *et al.*, 2000). FICHTLSCHERER *et al.* (2004) em um estudo com pacientes com doença arterial coronariana, encontraram altos níveis séricos de IL-10 associados ao aumento da vasoreatividade endotelial em indivíduos com altos níveis séricos de PCR. A vasoreatividade endotelial, com maior produção de IL-10, seria uma hipótese para explicar o fato de que no presente estudo, polimorfismos associados com mais alta expressão de IL-10 tenham sido associados à hipertensão arterial.

O genótipo associado à menor expressão de IL-10 foi menos frequente nos pacientes obesos, o que infere ser a obesidade associada aos mais altos níveis desta citocina. Embora este resultado contrarie o esperado, um estudo conduzido por ZEYDA *et al.* (2009) demonstrou que macrófagos do tecido adiposo humano também produzem altos níveis de IL-10. Assim, o aumento dos níveis de IL-10 deve estar associado a um perfil inflamatório exacerbado, no qual o balanço da produção de citocinas pró e anti-inflamatórias contribuem para a inflamação crônica de baixo grau observada no DM2 e na obesidade, o que explicaria os resultados encontrados.

Além destes achados, outras associações foram observadas. O polimorfismo TGF- β 1 codon 10 T/C mostrou estar significativamente associado ao IMC: o genótipo CC foi o mais frequente entre os indivíduos com IMC < 25 Kg/m², enquanto que entre os obesos (IMC \geq 30 Kg/m²), o genótipo TC foi o mais frequente. Uma associação entre o alelo T desse mesmo polimorfismo e a hipertensão também foi observada.

O TGF- β 1 é uma citocina multifuncional que regula o crescimento, a diferenciação e a produção de matriz celular. Esse fator de crescimento é secretado por vários tipos celulares, incluindo monócitos, macrófagos, células endoteliais, células do músculo liso vascular e células precursoras de adipócitos (BORDER & NOBLE, 1994; LI *et al.*, 1999). Sua propriedade anti-inflamatória pode ser demonstrada pela capacidade desta citocina em atuar como um fator de necrose anti-tumoral, suprimindo a geração de radicais livres (GOURDY *et al.*, 2007). A ação do TGF- β 1 sobre o endotélio vascular evidencia suas características “vasculoprotetoras”, como por exemplo: inibe a adesão de neutrófilos e células T ao endotélio, inibe a transmigração de neutrófilos e inibe a produção de moléculas de adesão pelas células endoteliais (GAMBLE & VADAS, 1988; GAMBLE & VADAS, 1991; SMITH *et al.*, 1996; DICHARA *et al.*, 2000). O TGF- β 1 favorece a desativação de macrófagos, interfere na produção de citocinas pró-inflamatórias e inibe a formação de “células espumosas” (*macrophage foam cells*) na placa aterosclerótica (VODOVOTZ *et al.*, 1993; LETTERIO & ROBERTS, 1998; ARGMANN *et al.*, 2001; MALLAT & TEDGUI, 2002). O polimorfismo no gene do TGF- β 1 que exhibe uma transição T \rightarrow C no nucleotídeo 29 na região que codifica a sequência do peptídeo sinal, está associado à variação nos níveis de expressão dessa citocina; onde o alelo C relaciona-se a maior produção de TGF- β 1 (CELEDÓN *et al.*, 2004).

A maior frequência do genótipo CC no grupo de pacientes com IMC < 25 Kg/m² sugere que o aumento da expressão de TGF- β 1 e seu potencial efeito anti-inflamatório, podem favorecer o controle da adiposidade, além do fato de que indivíduos obesos têm maior frequência do genótipo TC. Contrariamente, ROSMOND *et al.* (2003) em seu estudo com indivíduos não diabéticos, encontrou uma associação entre o alelo C e maiores valores de IMC; e ALESSI *et al.* (2000) relata que o aumento da expressão de TGF- β 1 está associado ao

aumento do IMC e da adiposidade abdominal na obesidade mórbida. No entanto, estes trabalhos não podem ser comparados aos nossos resultados, uma vez que no primeiro não foi avaliado um grupo diabético, e o DM2 é uma condição clínica independentemente associada à inflamação; enquanto no segundo trabalho foram avaliados pacientes com obesidade grau 3 que apresentam alterações metabólicas mais complexas, como aumento de componentes pró-resolutivos (HENEGAR *et al.*, 2008), e poucos pacientes nestas condições foram incluídos em nosso trabalho.

Sugere-se ainda que o TGF- β 1 participe da regulação da pressão sanguínea e do desenvolvimento da hipertensão, pois além de ter efeito sobre a síntese e degradação de matriz extracelular, esse fator de crescimento estimula a expressão de endotelina-1 no endotélio vascular, a liberação de renina a partir das células justaglomerulares do rim e regula a expressão de angiotensina II (CAMBIEN *et al.*, 1996). LI *et al.* (1999) encontraram uma correlação positiva entre os níveis circulantes de TGF- β 1 em humanos e a pressão sanguínea. Duas revisões sistemáticas (YAN-YAN, 2011; XI *et al.*, 2012) avaliaram estudos do tipo caso-controle na população chinesa e encontraram que o genótipo CC e o alelo C do polimorfismo TGF- β 1 codon 10 T/C estão relacionados ao aumento do risco de hipertensão essencial. Embora não se tenha estudos que avaliem a possível associação deste polimorfismo e a hipertensão arterial em um grupo de pacientes com DM2, os resultados encontrados sugerem que a menor expressão de TGF- β 1 e seu efeito vasculoprotetor suplanta sua ação vasoconstritora em pacientes com DM2.

Por fim, os dados aqui apresentados corroboraram com a hipótese inicial de que as complicações microvasculares e comorbidades do DM2 poderiam ser reguladas geneticamente, que a inflamação estaria envolvida na patogênese destas alterações, e apontam para a necessidade de se investigar os polimorfismos aqui apresentados a fim de que se possa adotar medidas preventivas para melhorar a qualidade de vida dos pacientes com DM2.

5. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente trabalho sugerem que polimorfismos em genes de citocinas estão relacionados às complicações microvasculares e comorbidades no diabetes mellitus tipo 2, na medida em que foram evidenciadas as seguintes associações:

- O polimorfismo codon 10 T/C no gene do TGF- β 1 com obesidade e hipertensão arterial.
- O polimorfismo codon 25 C/G no gene do TGF- β 1 com a retinopatia diabética
- Os polimorfismos -592C/A e -819T/C no gene da IL-10 com a hipertensão arterial.
- O polimorfismo -1082G/A no gene da IL-10 com a nefropatia diabética.

Estes dados indicam que a inflamação contribui na patogênese destas alterações clínicas e que estes polimorfismos devem ser investigados nos pacientes com diabetes mellitus tipo 2.

6. PERSPECTIVAS DO TRABALHO

- Selecionar um grupo controle composto de indivíduos hígidos a fim de avaliar a associação entre os polimorfismos estudados e o desenvolvimento do diabetes mellitus tipo 2.
- Avaliar a expressão gênica das citocinas e correlacioná-la à presença dos polimorfismos.
- Correlacionar o nível de expressão gênica e o nível sérico das citocinas com as complicações microvasculares e comorbidades do diabetes mellitus tipo 2.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Imunologia celular e molecular**. 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, c2012, 545 p.

ABRAHAMIAN, H.; ENDLER, G.; EXNER, M. *et al.* Association of low-grade inflammation with nephropathy in type 2 diabetic patients: role of elevated CRP-levels and 2 different gene-polymorphisms of proinflammatory cytokines. **Exp Clin Endocrinol Diabetes**. v. 115, n. 1, p. 38-41, Jan. 2007.

ABU EL-ASAR, A. M.; AL-MEZAINE, H. S.; OLA, M. S. Pathophysiology and management of diabetic retinopathy. **Exp Rev Ophthalmol**. v. 4, p. 627-647, 2009.

AGROIYA, P.; PHILIP, R.; SARAN, S *et al.* Association of serum lipids with diabetic retinopathy in type 2 diabetes. **Indian J Endocrinol Metab**. v. 17, p. S335-S337, 2013.

AGUIRRE, V.; UCHIDA, T.; YENUSH, L. *et al.* The c-Jun NH(2)-terminal kinase promotes insulin resistance during association with insulin receptor substrate-1 and phosphorylation of Ser(307). **J Biol Chem**. v. 275, n. 12, p. 9047-9054, Mar. 2000.

AHLUWALIA, T. S.; KHULLAR, M.; AHUJA, M. *et al.* Common variants of inflammatory cytokine genes are associated with risk of nephropathy in type 2 diabetes among Asian Indians. **PLoS One**, v. 4, n. 4, p. e5168, Apr. 2009.

AKAI, Y.; SATO, H.; OZAKI, H. *et al.* Association of transforming growth factor- β 1 T29C polymorphism with the progression of diabetic nephropathy. **Am J Kidney Dis**. v. 38, n. 4 [Suppl 1], p. S182-S185, Oct. 2001.

ALBERTI, K. G.; ZIMMET, P.; SHAW, J. International Diabetes Federation: a consensus on type 2 diabetes prevention. **Diabet Med**. v. 24, n. 5, p. 451-463, 2007.

ALESSI, M. C.; BASTELICA, D.; MORANGE, P. *et al.* Plasminogen activator inhibitor 1, transforming growth factor-beta1, and BMI are closely associated in human adipose tissue during morbid obesity. **Diabetes**, v. 49, n. 8, p. 1374-1380, Aug. 2000.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Standards of medical care in diabetes. **Diabetes Care**, v. 35 [Suppl 1], p. S11-S63, Jan. 2012.

ARABABADI, M. K.; REZA, M. M.; ALI, S. M. *et al.* Interleukin (IL)-10 gene polymorphisms are associated with type 2 diabetes and without nephropathy: a study of patients from the southeast region of Iran. **Inflammation**, v. 35, n. 3, p. 797-802, Jun. 2012.

ARAI, T.; HIROMATSU, K.; NISHIMURA, H. *et al.* Endogenous interleukin 10 prevents apoptosis in macrophages during Salmonella infection. **Biochem Biophys Res Commun**. v. 213, n. 2, p. 600-607, 1995.

ARGMANN, C. A.; VAN DEN DIEPSTRATEN, C. H.; SAWYEZ, C. G. *et al.* Transforming growth factor-beta1 inhibits macrophage cholesteryl ester accumulation induced by native and oxidized VLDL remnants. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**. v. 21, n. 12, p. 2011-2018, Dec. 2001.

AWAD, M. R.; EL-GAMEL, A.; HASLETON, P. *et al.* Genotypic variation in the transforming growth factor-beta1 gene: association with transforming growth factor-beta1 production, fibrotic lung disease, and graft fibrosis after lung transplantation. **Transplantation**. v. 66, n. 8, p. 1014-1020, Oct. 1998.

BABEL, N.; GABDRAKHMANOVA, L.; HAMMER, M. H. *et al.* Predictive value of cytokine gene polymorphisms for the development of end-stage renal disease. **J Nephrol**. v. 19, n. 6, p. 802-807 Nov./Dec. 2006.

BALASUBRAMANYAM, M.; REMA, M.; PREMANAND, C. Biochemical and molecular mechanisms of diabetic retinopathy. **Curr Diabetes Rev**. v. 83, p. 73-81, 2005.

BAMFORTH, S. D.; LIGHTMAN, S.; GREENWOOD, J. The effect of TNF-alpha and IL-6 on the permeability of the rat blood-retinal barrier in vivo. **Acta Neuropathol.** v. 91, n. 6, p. 624-632, 1996.

BARTON, B. E. The biological effects of interleukin 6. **Med Res Rev.** v. 16, n. 1, p. 87-109, Jan. 1996.

BASSOLS, A.; MASSAGUÉ, J. Transforming growth factor beta regulates the expression and structure of extracellular matrix chondroitin/dermatan sulfate proteoglycans. **J Biol Chem.** v. 263, n. 6, p. 3039-3045, Feb. 1988.

BERÁNEK, M.; KANKOVÁ, K.; BENES, P. *et al.* Polymorphism R25P in the gene encoding transforming growth factor-beta (TGF-beta1) is a newly identified risk factor for proliferative diabetic retinopathy. **Am J Med Genet.** v. 109, n. 4, p. 278-283, May 2002.

BILLIAU, A.; HEREMANS, H.; VERMEIRE, K.; MATTHYS, P. Immunomodulatory properties of interferon-gamma. An update. **Ann N Y Acad Sci.** v. 856, p. 22-32, Sep. 1998.

BLOBE, G. C.; SCHIEMANN, W. P.; LODISH, H. F. Role of transforming growth factor beta in human disease. **N Engl J Med.** v. 342, n. 18, p. 1350-1358, May 2000.

BORDER, W. A.; NOBLE, N. A. Transforming growth factor beta in tissue fibrosis. **N Engl J Med.** v. 331, n. 19, p. 1286-1292, Nov. 1994.

BURACZYNSKA, M.; BARANOWICZ-GASZCZYK, I.; BOROWICZ, E.; KSIAZEK, A. TGF-beta 1 and TSC 22 gene polymorphism and susceptibility to microvascular complications in type 2 diabetes. **Nephron Physiol.** v. 106, n. 4, p. 69-75, Jul. 2007.

BURTIS, C. A.; ASHWOOD, E. R.; BRUNS, D. E. **Tietz fundamentos de química clínica.** 6. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008. 959 p.

CAI, D.; YUAN, M.; FRANTZ, D. F. *et al.* Local and systemic insulin resistance resulting from hepatic activation of IKK-beta and NF-kappaB. **Nat Med.** v. 11, n. 2, p. 183-190, Feb. 2005.

CAMBIEN, F.; RICARD, S.; TROESCH, A. *et al.* Polymorphisms of the transforming growth factor-beta 1 gene in relation to myocardial infarction and blood pressure. The Etude Cas-Témoin de l'Infarctus du Myocarde (ECTIM) Study. **Hypertension**, v. 28, n. 5, p. 881-887, Nov. 1996.

CAMPBELL, I. L.; WONG, G. H.; SCHRADER, J. W.; HARRISON, L. C. Interferon-gamma enhances the expression of the major histocompatibility class I antigens on mouse pancreatic beta cells. **Diabetes**, v. 34, n. 11, p. 1205-1209, Nov. 1985.

CELEDÓN, J. C.; LANGE, C.; RABY, B. A. *et al.* The transforming growth factor-beta1 (TGFB1) gene is associated with chronic obstructive pulmonary disease (COPD). **Hum Mol Genet.** v. 13, n. 15, p. 1649-1656, Aug. 2004.

CROOK, M. A.; TUTT, P.; PICKUP, J. C. Elevated serum sialic acid concentration in NIDDM and its relationship to blood pressure and retinopathy. **Diabetes Care**, v. 16, n. 1, p. 57-60, Jan. 1993.

DALLA VESTRA, M.; MUSSAP, M.; GALLINA, P. *et al.* Acute-phase markers of inflammation and glomerular structure in patients with type 2 diabetes. **J Am Soc Nephrol.** v. 16 [Suppl 1], p. S78-S82, Mar. 2005.

DANDONA, P.; ALJADA, A.; BANDYOPADHYAY, A. Inflammation: the link between insulin resistance, obesity and diabetes. **Trends Immunol.** v. 25, n. 1, p. 4-7, Jan. 2004.

DICHIARA, M. R.; KIELY, J. M.; GIMBRONE, M. A. Jr. *et al.* Inhibition of E-selectin gene expression by transforming growth factor beta in endothelial cells involves coactivator integration of Smad and nuclear factor kappaB-mediated signals. **J Exp Med.** v. 192, n. 5, p. 695-704, Sep. 2000.

DUNNING, A. M.; ELLIS, P. D.; MCBRIDE, S. *et al.* A transforming growth factor beta 1 signal peptide variant increases secretion in vitro and is associated with increased incidence of invasive breast cancer. **Cancer Res.** v. 63, n. 10, p. 2610-2615, May 2003.

EDWARDS, D. R.; MURPHY, G.; REYNOLDS, J. J. *et al.* Transforming growth factor beta modulates the expression of collagenase and metalloproteinase inhibitor. **EMBO J.** v. 6, n. 7, p. 1899-1904, Jul. 1987.

EL-SHERBINI, S. M.; SHAHEN, S. M.; MOSAAD, Y. M. *et al.* Gene polymorphism of transforming growth factor- β 1 in Egyptian patients with type 2 diabetes and diabetic nephropathy. **Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai).** v. 45, n. 4, p. 330-338, Apr. 2013.

ERDOGAN, M.; CETINKALP, S.; OZGEN, A. G. *et al.* Interleukin-10 (-1082G/A) gene polymorphism in patients with type 2 diabetes with and without nephropathy. **Genet Test Mol Biomarkers.** v. 16, n. 2, p. 91-94, Feb. 2012.

FEINGOLD, K. R.; GRUNFELD, C. Role of cytokines in inducing hyperlipidemia. **Diabetes,** v. 41 [Suppl 2], p. 97-101, Oct. 1992.

FICHTLSCHERER, S.; BREUER, S.; HEESCHEN, C. *et al.* Interleukin-10 serum levels and systemic endothelial vasoreactivity in patients with coronary artery disease. **J Am Coll Cardiol.** v. 44, n. 1, p. 44-49, Jul. 2004.

FISCHER, S.; CLAUSS, M.; WIESNET, M. *et al.* Hypoxia induces permeability in brain microvessel endothelial cells via VEGF and NO. **Am J Physiol.** v. 276, n. 4 Pt 1, p. C812-C820, Apr. 1999.

FISHMAN, D.; FAULDS, G.; JEFFERY, R. *et al.* The effect of novel polymorphisms in the interleukin-6 (IL-6) gene on IL-6 transcription and plasma IL-6 levels, and an association with systemic-onset juvenile chronic arthritis. **J Clin Invest.** v. 102, n. 7, p. 1369-1376, Oct. 1998.

FRIED, S. K.; BUNKIN, D. A.; GREENBERG, A. S. Omental and subcutaneous adipose tissues of obese subjects release interleukin-6: depot difference and regulation by glucocorticoid. **J Clin Endocrinol Metab.** v. 83, n. 3, p. 847-850, Mar. 1998.

FUJII, D.; BRISSENDEN, J. E.; DERYNCK, R.; FRANCKE, U. Transforming growth factor beta gene maps to human chromosome 19 long arm and to mouse chromosome 7. **Somat Cell Mol Genet.** v. 12, n. 3, p. 281-288, May 1986.

FUKUHARA, A.; MATSUDA, M.; NISHIZAWA, M. *et al.* Visfatin: a protein secreted by visceral fat that mimics the effects of insulin. **Science**, v. 307, n. 5708, p. 426-430, Jan. 2005.

FUNATSU, H.; YAMASHITA, H.; SHIMIZU, E. *et al.* Relationship between vascular endothelial growth factor and interleukin-6 in diabetic retinopathy. **Retina**, v. 21, n. 5, p. 469-477, 2001.

FURUKAWA, S.; FUJITA, T.; SHIMABUKURO, M. *et al.* Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. **J Clin Invest.** v. 114, n. 12, p. 1752-1761, Dec. 2004.

GAMBLE, J. R.; VADAS, M. A. Endothelial adhesiveness for blood neutrophils is inhibited by transforming growth factor-beta. **Science**, v. 242, n. 4875, p. 97-99, Oct. 1988.

GAMBLE, J. R.; VADAS, M. A. Endothelial cell adhesiveness for human T lymphocytes is inhibited by transforming growth factor-beta 1. **J Immunol.** v. 146, n. 4, p. 1149-1154, Feb. 1991.

GAO, Z.; HWANG, D.; BATAILLE, F. *et al.* Serine phosphorylation of insulin receptor substrate 1 by inhibitor kappa B kinase complex. **J Biol Chem.** v. 277, n. 50, p. 48115-4812, Dec. 2002.

GAO, Z.; ZHANG, X.; ZUBERI, A. *et al.* Inhibition of insulin sensitivity by free fatty acids requires activation of multiple serine kinases in 3T3-L1 adipocytes. **Mol Endocrinol.** v. 18, n. 8, p. 2024-2034, Aug. 2004.

GOURDY, P.; SCHAMBOURG, A.; FILIPE, C. *et al.* Transforming growth factor activity is a key determinant for the effect of estradiol on fatty streak deposit in hypercholesterolemic mice. **Arterioscler Thromb Vasc Biol.** v. 27, n. 10, p. 2214-2221, Oct. 2007.

GOVAN, V. A.; CARRARA, H. R.; SACHS, J. A. *et al.* Ethnic differences in allelic distribution of IFN- γ in South African women but no link with cervical cancer. **J Carcinog.** v. 2, n. 1, May 2003.

GUNNETT, C. A.; HEISTAD, D. D.; BERG, D. J.; FARACI, F. M. IL-10 deficiency increases superoxide and endothelial dysfunction during inflammation. **Am J Physiol Heart Circ Physiol.** v. 279, n. 4, p. H1555-H1562, 2000.

GUNNETT, C. A.; HEISTAD, D. D.; FARACI, F. M. Interleukin-10 protects nitric oxide-dependent relaxation during diabetes: role of superoxide. **Diabetes,** v. 51, n. 6, p. 1931-1937, 2002.

HALBERG, N.; WERNSTEDT-ASTERHOLM, I.; SCHERER, P. E. The adipocyte as an endocrine cell. **Endocrinol Metab Clin North Am.** v. 37, n. 3, p. 753-768, Sep. 2008.

HENEGAR, C.; TORDJMAN, J. ACHARD, V. *et al.* Adipose tissue transcriptomic signature highlights the pathological relevance of extracellular matrix in human obesity. **Genome Biol.** v. 9, n. 1, p. R14, Jan. 2008.

HEREDIA, F. P.; GÓMEZ-MARTINEZ, S.; MARCOS, A. Obesity, inflammation and the immune system. **Proc Nutr Soc.** v. 71, n. 2, p.332-338, 2012.

HIROSUMI, J.; TUNCMAN, G.; CHANG, L. *et al.* A central role for JNK in obesity and insulin resistance. **Nature**, v. 420, n. 6913, p. 333-336, Nov. 2002.

HOFFMAN, B. B.; SHARMA, K.; ZHU, Y.; ZIYADEH, F. N. Transcriptional activation of transforming growth factor-beta 1 in mesangial cell culture by high glucose concentration. **Kidney Int.** v. 54, n. 4, p. 1107-1116, Oct. 1998.

HOPKINS, P. N.; HUNT, S. C.; WU, L. L. *et al.* Hypertension, dyslipidemia, and insulin resistance: links in a chain ou spokes on a wheel? **Curr Opin Lipidol.** v. 7, n. 4, p. 241-253, Aug. 1996.

HOTAMISLIGIL, G. S.; ARNER, P.; CARO, J. F. *et al.* Increased adipose tissue expression of tumor necrosis factor-alpha in human obesity and insulin resistance. **J Clin Invest.** v. 95, n. 5, p. 2409-2415, May 1995.

HOTAMISLIGIL, G. S.; BUDAVARI, A.; MURRAY, D.; SPIEGELMAN, B. M. Reduced tyrosine kinase activity the insulin receptor in obesity diabetes. Central role of tumor necrosis factor-alpha. **J Clin Invest.** v. 94, n. 4,p. 1543-1549, Oct. 1994.

HOTAMISLIGIL, G. S.; PERALDI, P.; BUDAVARI, A. IRS-1-mediated inhibition of insulin receptor tyrosine kinase activity in TNF-alpha and obesity-induced insulin resistance. **Science**, v. 271, n. 5249, p. 665-668, Feb. 1996.

HOTAMISLIGIL, G. S.; SHARGILL, N. S.; SPIEGELMAN, B. M. Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance. **Science**, v. 259, n. 5091, p. 87-91, Jan. 1993.

IGNOTZ, R. A.; MASSAGUÉ, J. Transforming growth factor-beta stimulates the expression of fibronectin and collagen and their incorporation into the extracellular matrix. **J Biol Chem.** v. 261, n. 9, p. 4337-4345, Mar. 1986.

INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION. IDF Diabetes Atlas. 5. ed. 2012. Disponível em: <http://www.idf.org/diabetesatlas>. Acesso em 12 de outubro de 2013.

JIA, H.; YU, L.; GAO, B.; JI, Q. Association between the T869C polymorphism of transforming growth factor beta 1 and diabetic nephropathy: a meta-analysis. **Endocrine**. v. 40, n. 3, p. 372-378, Dec. 2011.

KAMIMURA, D.; ISHIHARA, K.; HIRANO, T. IL-6 signal transduction and its physiological roles: the signal orchestration model. *Rev Physiol Biochem Pharmacol*. v. 149, p. 1-38, 2003.

KERSHAW, E. E.; FLIER, J. S. Adipose tissue as an endocrine organ. **J Clin Endocrinol Metab**. v. 89, n. 6, p. 2548-56, Jun. 2004.

KHARDORI, R. Changing paradigms in type 2 diabetes mellitus. **Indian J Endocrinol Metab**. v. 17, p. S68-S71, 2013.

KING, G. L. The role of inflammatory cytokines in diabetes and its complications. **J Periodontol**. v. 79 [Suppl 8], p. 1527-1534, Aug. 2008.

KOLLA, V. K.; MADHAVI, G.; PULLA REDDY, B. *et al.* Association of tumor necrosis factor alpha, interferon gamma and interleukin 10 gene polymorphisms with peripheral neuropathy in South Indian patients with type 2 diabetes. **Cytokine**, v. 47, n. 3, p. 173-177, Sep. 2009.

KOPELMAN, P. G. Obesity as a medical problem. **Nature**, v. 404, p. 635-643, Apr. 2000.

KROEGER, K. M.; CARVILLE, K. S.; ABRAHAM, L. J. The -308 tumor necrosis factor-alpha promoter polymorphism effects transcription. **Mol Immunol**. v. 34, n. 5, p. 391-399, Apr. 1997.

KUNG, W. J.; LIN, C. C.; LIU, S. H.; CHAUNG, H. C. Association of interleukin-10 polymorphisms with cytokines in type 2 diabetic nephropathy. **Diabetes Technol Ther.** v. 12, n. 10, p. 809-813, Oct. 2010.

KURUKULASURIYA, L. R.; STAS, S.; LASTRA, G. *et al.* Hypertension in obesity. **Med Clin North Am.** v. 95, n. 5, p. 903-917, 2011.

LACRAZ, S.; NICOD, L. P.; CHICHEPORTICHE, R. *et al.* IL-10 inhibits metalloproteinase and stimulates TIMP-1 production in human mononuclear phagocytes. **J Clin Invest.** v. 96, n. 5, p. 2304-2310, 1995.

LAIHO, M.; SAKSELA, O.; KESKI-OJA, J. Transforming growth factor-beta induction of type-1 plasminogen activator inhibitor. Pericellular deposition and sensitivity to exogenous urokinase. **J Biol Chem.** v. 262, n. 36, p. 17467-17474, Dec. 1987.

LEE, J. Y.; SOHN, K. H.; RHEE, S. H.; HWANG D. Saturated fatty acids, but not unsaturated fatty acids, induce the expression of cyclooxygenase-2 mediated through Toll-like receptor 4. **J Biol Chem.** v. 276, n. 20, p. 16683-16689, May 2001.

LEE, J. Y.; YE, J.; GAO, Z. *et al.* Reciprocal modulation of Toll-like receptor-4 signaling pathways involving MyD88 and phosphatidylinositol 3-kinase/AKT by saturated and polyunsaturated fatty acids. **J Biol Chem.** v. 278, n. 39, p 37041-37051, Sep. 2003. (LEE *et al.*, 2003a)

LEE, S. H.; LEE, T. W.; IHM, C. G. *et al.* Genetics of diabetic nephropathy in type 2 DM: candidate gene analysis for the pathogenic role of inflammation. **Nephrology (Carlton)**, v. 10, p. S32-S36, Oct. 2005.

LEE, Y.H.; GIRAUD, J.; DAVIS, R. J.; WHITE, M. F. c-Jun N-terminal kinase (JNK) mediates feedback inhibition of the insulin signaling cascade. **J Biol Chem.** v. 278, n. 5, p. 2896-2902, Jan. 2003. (LEE *et al.*, 2003b)

LETTERIO, J. J.; ROBERTS, A. B. Regulation of immune responses by TGF-beta. **Annu Rev Immunol.** v. 16, p. 137-161, 1998.

LI, B.; KHANNA, A.; SHARMA, V. *et al.* TGF-beta1 DNA polymorphisms, protein levels, and blood pressure. **Hypertension**, v. 33, p. 271-275, Jan. 1999.

LI, M. O.; WAN, Y. Y.; SANJABI, S. *et al.* Transforming growth factor-beta regulation of immune responses. **Annu Rev Immunol.** v. 24, p. 99-146, 2006.

LINDHOLM, E.; BAKHTADZE, E.; CILIO, C. *et al.* Association between LTA, TNF and AGER polymorphisms and late diabetic complications. **PLoS One**, v. 3, n. 6, p. e2546, Jun. 2008.

LINDMARK, E.; TENNO, T.; CHEN, J.; SIEGBAHN, A. IL-10 inhibits LPS-induced human Monocyte tissue factor expression in whole blood. **Br J Haematol.** v. 102, n. 2, p. 597-604, 1998.

MALLAT, Z.; BESNARD, S.; DURIEZ, M. *et al.* Protective role of interleukin-10 in atherosclerosis. **Circ Res.** v. 85, n. 8, p. 17-24, 1999.

MALLAT, Z.; TEDGUI, A. The role of transforming growth factor beta in atherosclerosis: novel insights and future perspectives. **Curr Opin Lipidol.** v. 13, n. 5, p. 523-529, Oct. 2002.

MANTOVANI, A.; SICA, A.; LOCATI, M. Macrophage polarization comes of age. **Immunity**, v. 23, v. 4, p. 344-346, Oct. 2005.

MANTOVANI, A.; SICA, A.; SOZZANI, S. *et al.* The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. **Trends Immunol.** v. 25, n. 12, p. 677-686, Dec. 2004.

MANTOVANI, A.; SOZZANI, S.; LOCATI, M. *et al.* Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. **Trends Immunol.** v. 23, n. 11, p. 549-555, Nov. 2002.

MARKS, J. B.; RASKIN, P. Nephropathy and hypertension in diabetes. **Med Clin North Am.** v. 82, n. 4, p. 877-907, Jul. 1998.

MAUER, S. M.; STEFFES, M. W.; ELLIS, E. N. *et al.* Structural-functional relationships in diabetic nephropathy. **J Clin Invest.** v. 74, n. 4, p. 1143-55, Oct. 1984.

MEDZHITOV, R. Origin and physiological roles of inflammation. **Nature**, v. 454, n. 7203, p. 428-435, Jul. 2008.

MINAMI, M.; KUME, N.; KATAOKA, H. *et al.* Transforming growth factor-beta(1) increases the expression of lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1. **Biochem Biophys Res Commun.** v. 272, n. 2, p. 357-361, Jun. 2000.

MOORE, K.W.; DE WAAL MALEFYT, R.; COFFMAN, R. L.; O'GARRA, A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. **Annu Rev Immunol.** v. 19, p. 683-765, 2001.

MTIRAOU, N.; EZZIDI, I.; KACEM, M. *et al.* Predictive value of interleukin-10 promoter genotypes and haplotypes in determining the susceptibility to nephropathy in type 2 diabetes patients. **Diabetes Metab Res Rev.** v. 25, n. 1, p. 57-63, Jan. 2009.

NAGINENI, C. N.; SAMUEL, W.; NAGINENI, S. *et al.* Transforming growth factor-beta induces expression of vascular endothelial growth factor in human retinal pigment epithelial cells: involvement of mitogen-activated protein kinases. **J Cell Physiol.** v. 197, n. 3, p. 453-462, Dec. 2003.

NAIKI, Y.; MICHELSEN, K. S.; ZHANG, W. *et al.* Transforming growth factor-beta differentially inhibits MyD88-dependent, but not TRAM- and TRIF-dependent, lipopolysaccharide-induced TLR4 signaling. **J Biol Chem.** v. 280, n. 7, p. 5491-5495, Feb. 2005.

NAKHJAVANI, M.; ESTEGHAMATI, A.; KHALILZADEH, O. *et al.* Association of macroalbuminuria with oxidized LDL and TGF beta in type 2 diabetic patients: a case-control study. **Int Urol Nephrol.** v. 42, n. 2, p. 487-492, Jun. 2010.

NAVARRO, J. F.; MORA, C.; MACA, M.; GARCA, J. Inflammatory parameters are independently associated with urinary albumin in type 2 diabetes mellitus. **Am J Kidney Dis.** v. 42, n. 1, p. 53-61, Jul. 2003.

NG, D. P.; NURBAYA, Y.; YE, S. H.; KROLEWSKI, A. S. An IL-6 haplotype on human chromosome 7p21 confers risk for impaired renal function in type 2 diabetic patients. **Kidney Int.** v. 74, n. 4, p. 521-527, Aug. 2008.

OUCHI, N.; PARKER, J. L.; LUGUS, J. J.; WALSH K. Adipokines in inflammation and metabolic disease. **Nat Rev Immunol.** v. 11, n. 2, p. 85-97, Feb. 2011.

OZCAN, U.; CAO, Q.; YILMAZ, E. *et al.* Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin action, and type 2 diabetes. **Science**, v. 306, n. 5695, p. 457-461, Oct. 2004.

PAINE, S. K.; BASU, A.; MONDAL, L. K. *et al.* Association of vascular endothelial growth factor, transforming growth factor beta and interferon gamma gene polymorphisms with proliferative diabetic retinopathy in patients with type 2 diabetes. **Mol Vis.** v. 18, p. 2749-2757, Nov. 2012. (PAINE *et al.*, 2012b)

PAINE, S. K.; SEN, A.; CHOUDHURI, S. *et al.* Association of tumor necrosis factor α , interleukin 6, and interleukin 10 promoter polymorphism with proliferative diabetic retinopathy in type 2 diabetic subjects. **Retina**, v. 32, n. 6, p. 1197-1203, Jun. 2012. (PAINE *et al.*, 2012a)

PAPAOIKONOMOU, S.; TENTOLOURIS, N.; TOUSOULIS, D. *et al.* The association of the 174G>C polymorphism of interleukin 6 gene with diabetic nephropathy in patients with type 2 diabetes mellitus. **J Diabetes Complications.** S1056-8727, 2013.

PICKUP, J. C. Inflammation and activated innate immunity in the pathogenesis of type 2 diabetes. **Diabetes Care**, v. 27, n. 3, p. 813-823, 2004.

PICKUP, J. C.; CROOK, M. A. Is type II diabetes mellitus a disease of the innate immune system? **Diabetologia**, v. 41, n. 10, p. 1241-1249, Oct. 1998.

PICKUP, J. C.; MATTOCK, M. B.; CHUSNEY, G. D.; BURT, D. NIDDM as a disease of the innate immune system: association of acute-phase reactants and interleukin-6 with metabolic syndrome X. **Diabetologia**, v. 40, n. 11, p. 1286-1292, Nov. 1997.

PRADHAN, A. D.; MANSON, J. E.; RIFAI, N. *et al.* C-reactive protein, interleukin 6, and risk of developing type 2 diabetes mellitus. **JAMA**. v. 286, n. 3, p. 327-334, Jul. 2001.

PRASAD, P.; TIWARI, A. K.; KUMAR, K. M. *et al.* Association of TGFbeta1, TNFalpha, CCR2 and CCR5 gene polymorphisms in type-2 diabetes and renal insufficiency among Asian Indians. **BMC Med Genet**. v. 8, n. 20, Apr. 2007.

PRAVICA, V.; PERREY, C.; STEVES, A. *et al.* A single nucleotide polymorphism in the first intron of the human IFN-gamma gene: absolute correlation with a polymorphic CA microsatellite marker of high IFN-gamma production. **Hum Immunol**. v. 61, n. 9, p. 863-866, Sep. 2000.

QI, C.; PEKALA, P. H. Tumor necrosis factor-alpha-induced insulin resistance in adipocytes. **Proc Soc Exp Biol Med**. v. 223, n. 2, p. 128-135, Feb. 2000.

RAPTIS, A. E.; VIBERTI, G. Pathogenesis of diabetic nephropathy. **Exp Clin Endocrinol Diabetes**. v. 109 [Suppl 2], p. S424-S437, 2001.

ROSMOND, R.; CHAGNON, M.; BOUCHARD, C.; BJÖRNTORP, P. Increased abdominal obesity, insulin and glucose levels in nondiabetic subjects with a T29C polymorphism of the transforming growth factor-beta1 gene. **Horm Res**. v. 59, n. 4, p. 191-194, 2003.

ROWLEY, M.; VAN NESS, B. Activation of N-ras and K-ras induced by interleukin-6 in a myeloma cell line: implications for disease progression and therapeutic response. **Oncogene**, v. 21, n. 57, p. 8769-8775, Dec. 2002.

RUDOFISKY, G. Jr; SCHLOTTERER, A.; REISMANN, P. *et al.* The -174G>C IL-6 gene promoter polymorphism and diabetic microvascular complications. **Horm Metab Res.** v. 41, n. 4, p. 308-313, Apr. 2009.

SAAD, M. J. A.; MACIEL, R. M. de B.; MENDONÇA, B. B. **Endocrinologia.** 1. ed. São Paulo: Atheneu, 2007. 1251 p.

SALTIEL, A. R.; KAHN, C. R. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. **Nature**, v. 414, n. 6865, p. 799-806, Dec. 2001.

SARTIPY, P.; LOSKUTOFF, D. J. Monocyte chemoattractant protein 1 in obesity and insulin resistance. **Proc Natl Acad Sci U S A.** v. 100, n. 12, p. 7265-7270, Jun. 2003.

SARVETNICK, N.; LIGGITT, D.; PITTS, S. L. Insulin-dependent diabetes mellitus induced in transgenic mice by ectopic expression of class II MHC and interferon-gamma. **Cell**, v. 52, n. 5, p. 773-782, Mar. 1988.

SCARPELLI, D.; CARDELLINI, M.; ANDREOZZI, F. *et al.* Variants of the interleukin-10 promoter gene are associated with obesity and insulin resistance but not type 2 diabetes in caucasian italian subjects. **Diabetes**, v. 55, n. 5, p. 1529-1533, May 2006.

SEKIZUKA, K.; TOMINO, Y.; KURUSU, A. *et al.* Detection of serum IL-6 in patients with diabetic. **Nephron**, v. 68, n. 2, p. 284-285, 1994.

SELMAJ, K. W.; RAINE, C. S. Tumor necrosis factor mediates myelin and oligodendrocyte damage in vitro. **Ann Neurol.** v. 23, n. 4, p. 339-346, Apr. 1988.

SENNLAUB, F.; COURTOIS, Y.; GOUREAU, O. Inducible nitric oxide synthase mediates the change from retinal to vitreal neovascularization in ischemic retinopathy. **J Clin Invest.** v. 107, n. 6, p. 717-725, Mar. 2001.

SHARMA, K.; ZIYADEH, F. N. Hyperglycemia and diabetic kidney disease. The case for transforming growth factor-beta as a key mediator. **Diabetes**, v. 44, n. 10, p. 1139-1146, Oct. 1995.

SHARMA, K.; ZIYADEH, F. N. Renal hypertrophy is associated with upregulation of TGF-beta 1 gene expression in diabetic BB rat and NOD mouse. **Am J Physiol.** v. 267, n. 6, p. F1094-F1011, Dec. 1994.

SHARMA, K.; ZIYADEH, F. N.; ALZAHABI, B. *et al.* Increased renal production of transforming growth factor-beta1 in patients with type II diabetes. **Diabetes**, v. 46, n. 5, p. 854-859, May 1997.

SHIKANO, M.; SOBAJIMA, H.; YOSHIKAWA, H. *et al.* Usefulness of a highly sensitive urinary and serum IL-6 assay in patients with diabetic nephropathy. **Nephron.** v. 85, n. 1, p. 81-85, May 2000.

SHIMOMURA, I.; FUNAHASHI, T.; TAKAHASHI, M. *et al.* Enhanced expression of PAI-1 in visceral fat: possible contributor to vascular disease in obesity. **Nat Med.** v. 2, n. 7, p. 800-803, Jul. 1996.

SHOELSON, S. E.; LEE, J.; GOLDFINE, A. B. Inflammation and insulin resistance. **J Clin Invest.** v. 116, n. 7, p. 1793-1801, Jul. 2006.

SMITH, W. B.; NOACK, L.; KHEW-GOODALL, Y. *et al.* Transforming growth factor-beta 1 inhibits the production of IL-8 and the transmigration of neutrophils through activated endothelium. **J Immunol.** v. 157, n. 1, p. 360-368, Jul. 1996.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. Diabetes na prática clínica (e-book), 2011. Disponível em: <http://www.diabetesebook.org.br/>. Acesso em 29 de outubro de 2013.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes, 2009.

STEPPAN, C. M.; BAILEY, S. T.; BHAT, S. *et al.* The hormone resistin links obesity to diabetes. **Nature**, v. 409, n. 6818, p. 307-312, Jan. 2001.

SULOCHANA, K. N.; RAMAKRISHNAN, S.; RAJESH, M. *et al.* Diabetic retinopathy: molecular mechanisms, present regime of treatment and future perspectives. **Curr Sci**. v. 80, p. 133-142, 2001.

SUMMERS, S. A. Ceramides in insulin resistance and lipotoxicity. **Prog Lipid Res**. v. 45, n. 1, p. 42-72, Jan. 2006.

TEN DIJKE, P.; HILL, C. S. New insights into TGF-beta-Smad signalling. **Trends Biochem Sci**. v. 29, n. 5, p. 265-273, May 2004.

THORAND, B.; LÖWEL, H.; SCHNEIDER, A. *et al.* C-reactive protein as a predictor for incident diabetes mellitus among middle-aged men: results from the MONICA Augsburg cohort study, 1984-1998. **Arch Intern Med**. v. 163, n. 1, p. 93-99, Jan. 2003.

TURNER, D. M.; WILLIAMS, D. M.; SANKARAN, D. *et al.* An investigation of polymorphism in the interleukin-10 gene promoter. **Eur J Immunogenet**. v. 24, n. 1, p. 1-8, Feb. 1997.

VALLADARES-SALGADO, A.; ANGELES-MARTÍNEZ, J.; ROSAS, M. *et al.* Association of polymorphisms within the transforming growth factor- β 1 gene with diabetic nephropathy and serum cholesterol and triglyceride concentrations. **Nephrology (Carlton)**. v. 15, n. 6, p. 644-648, Sep. 2010.

VAN EXEL, E.; GUSSEKLOO, J.; DE CRAEN, A. J. *et al.* Low production capacity of interleukin-10 associates with the metabolic syndrome and type 2 diabetes: the Leiden 85-Plus Study. **Diabetes**, v. 51, n. 4, p. 1088-1092, Apr. 2002.

VENDRELL, J.; FERNANDEZ-REAL, J. M.; GUTIERREZ, C. *et al.* A polymorphism in the promoter of the tumor necrosis factor-alpha gene (-308) is associated with coronary heart disease in type 2 diabetic patients. **Atherosclerosis**, v. 167, n. 2, p. 257-264, Apr. 2003.

VODOVOTZ, Y.; BOGDAN, C.; PAIK, J. *et al.* Mechanisms of suppression of macrophage nitric oxide release by transforming growth factor beta. **J Exp Med.** v. 178, n. 2, p. 605-613, Aug, 1993.

VOZAROVA, B.; WEYER, C.; LINDSAY, R. S. *et al.* High white blood cell count is associated with a worsening of insulin sensitivity and predicts the development of type 2 diabetes. **Diabetes**, v. 51, n. 2, p. 455-461, Feb. 2002.

WANG, P.; WU, P.; SIEGEL, M. I. *et al.* Interleukin (IL)-10 inhibits nuclear factor kappa B (NF kappa B) activation human monocytes. IL-10 and IL-4 suppress cytokine synthesis by different mechanisms. **J Biol Chem.** v. 270, n. 16, p. 9558-9563, 1995.

WANG, Y.; NG, M. C.; SO, W. Y. *et al.* Association between tumour necrosis factor-alpha G-308A polymorphism and risk of nephropathy in obese Chinese type 2 diabetic patients. **Nephrol Dial Transplant.** v. 20, n. 12, p. 2733-2738, Dec. 2005.

WEISBERG, S. P.; MCCANN, D.; DESAI, M. *et al.* Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. **J Clin Invest.** v. 112, n. 12, p. 1796-1808, Dec. 2003.

WONG, T. Y.; POON, P.; CHOW, K. M. *et al.* Association of transforming growth factor-beta (TGF-beta) T869C (Leu 10Pro) gene polymorphisms with type 2 diabetic nephropathy in Chinese. **Kidney Int.** v. 63, n. 5, p. 1831-1835, May 2003.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. 10 Facts about diabetes. Disponível em: <http://www.who.int/features/factfiles/diabetes/facts/en/index4.html>. Acesso em 02 de novembro de 2013.

XI, B.; WANG, O.; PAN, H. Transforming growth factor- β 1 gene +869T/C, but not +915G/C polymorphism is associated with essential hypertension in a Chinese patient cohort. **Mol Biol Rep.** v. 39, n. 5, p. 6107-6112, May, 2012.

XU, H. Obesity and metabolic inflammation. **Drug Discov Today Dis Mech.** v. 10, n. 1-2, p. 21-25, Jun. 2013.

YAMAMOTO, T.; NAKAMURA, T.; NOBLE, N. A. *et al.* Expression of transforming growth factor beta is elevated in human and experimental diabetic nephropathy. **Proc Natl Acad Sci USA.** v. 90, n. 5, p. 1814-1818, Mar. 1993.

YAN-YAN, L. Transforming growth factor β 1 +869T/C gene polymorphism and essential hypertension: a meta-analysis involving 2708 participants in the Chinese population. **Intern Med.** v. 50, n. 10, p. 1089-1092, May. 2011.

YE, J. Mechanisms of insulin resistance in obesity. **Front Med.** v. 7, n. 1, p. 14-24, Mar. 2013.

YOSHIOKA, K.; YOSHIDA, T.; TAKAKURA, Y. *et al.* Relationship between polymorphisms 804C/A and 252A/G of lymphotoxin-alpha gene and -308G/A of tumor necrosis factor alpha gene and diabetic retinopathy in Japanese patients with type 2 diabetes mellitus. **Metabolism**, v. 55, n. 10, p. 1406-1410, Oct. 2006.

YUAN, M.; KONSTANTOPOULOS, N.; LEE, J. *et al.* Reversal of obesity- and diet-induced insulin resistance with salicylates or targeted disruption of Ikkbeta. **Science**, v. 293, n. 5535, p. 1673-1677, Aug. 2001.

ZAMAUSKAITE, A.; YAGOOB, M. M.; MADRIGAL, J. A.; COHEN, S. B. The frequency of Th2 type cells increases with time on peritoneal dialysis in patients

with diabetic nephropathy. **Eur Cytokine Netw.** v. 10, n. 2, p. 219-226, Jun. 1999.

ZEYDA, M.; STULNIG, T. M. Obesity, inflammation, and insulin resistance--a mini-review. **Gerontology**, v. 55, n. 4, p. 379-386, 2009.

ZHANG, J.; GAO, Z.; YIN, J. *et al.* S6K directly phosphorylates IRS-1 on Ser-270 to promote insulin resistance in response to TNF-(alpha) signaling through IKK2. **J Biol Chem.** v. 283, n. 51, p 35375-35382, Dec. 2008.

ANEXOS

ANEXO A – COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA UFMG



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - COEP

Parecer nº. ETIC 0062.0.203.000-11

Interessado(a): Profa. Karina Braga Gomes Borges
Depto. de Análises Clínicas e Toxicológicas
Faculdade de Farmácia - UFMG

DECISÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP aprovou, no dia 06 de maio de 2011, após atendidas as solicitações de diligência, o projeto de pesquisa intitulado "**O papel das citocinas no desenvolvimento do diabetes mellitus tipo 2**" bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

O relatório final ou parcial deverá ser encaminhado ao COEP um ano após o início do projeto.

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Maria Teresa Marques Amaral".

Prof. Maria Teresa Marques Amaral
Coordenadora do COEP-UFMG

ANEXO B – COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA SANTA CASA



Comitê de Ética em Pesquisa

Registro CEP: 059/2011 (Este número deve ser citado nas correspondências referentes a este projeto).

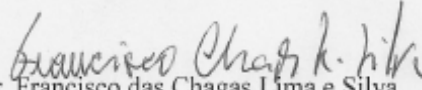
Belo Horizonte, 18 de agosto de 2011.

Ilma. Sra.
Drª. Karina Braga Gomes Borges
Pesquisadora Responsável

Parecer:

O Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Santa Casa de Misericórdia de Belo Horizonte, em reunião do dia 29 de julho de 2011, analisou e **aprovou** o projeto de pesquisa intitulado “**O papel das citocinas no desenvolvimento do diabetes mellitus tipo 2**”, registrado neste CEP sob número 059/2011 no qual V. Sa. figura como pesquisadora responsável.

Atenciosamente,


Dr. Francisco das Chagas Lima e Silva
Coordenador do CEP

ANEXO C – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

PROJETO DE PESQUISA: “O papel de biomarcadores inflamatórios no desenvolvimento do diabetes mellitus tipo 2 e suas complicações”

Prezado (a) Sr.(a),

Este projeto tem por objetivo estudar como a inflamação pode afetar o desenvolvimento do diabetes, bem como as complicações da doença que o paciente pode apresentar. Para obter a conclusão da pesquisa, será necessário comparar os resultados dos exames dos pacientes com diabetes com os resultados de indivíduos sem a doença (grupo controle).

A coleta de amostras de sangue venoso inclui um pequeno risco de acidente de punção, representado, principalmente por extravasamento sanguíneo de pequena gravidade, que pode resultar em leve dor localizada e formação de um pequeno hematoma. Para minimizar este risco, a coleta de sangue será realizada por um profissional com capacidade técnica e experiência. Será utilizado material descartável de boa qualidade (agulhas e tubos a vácuo), visando o êxito da coleta.

Você está sendo convidado para participar desta pesquisa como voluntário, sem custo algum pelos exames realizados. Se você quiser participar poderá fazê-lo doando 20 mL de seu sangue para o uso nesta pesquisa, sendo este material armazenado em condições adequadas para pesquisas. Se você não quiser participar, não haverá qualquer problema e se você fizer parte do grupo de pacientes, não haverá alteração no seu tratamento e assistência recebida pelo seu médico caso você não aceite participar do estudo.

Seu nome será mantido em segredo, não sendo divulgado em nenhuma hipótese.

Se você estiver de acordo, por favor, assine esta folha.

De acordo: _____

(Assinatura)

Nome:

Data: ___/___/___

Qualquer dúvida sobre a sua participação neste estudo, por favor, entre em contato com a Profa. Karina Braga Gomes Borges no telefone 3409-6895- Faculdade de Farmácia/UFMG.

Desde já agradecemos sua valiosa participação.

Nome: _____

Assinatura: _____

Pesquisador responsável

Data:

COEP - Comitê de Ética em Pesquisa - Av. Antônio Carlos, 6627, Unidade Administrativa II - 2º andar - Sala 2005, Campus Pampulha, Belo Horizonte, MG – Brasil. telefax 31 3409-4592. coep@prpq.ufmg.br

ANEXO D – FICHA CLÍNICA

FICHA DE AVALIAÇÃO DE PACIENTE

Data da entrevista: ____/____/____

Data da coleta: ____/____/____

Nome do paciente: _____

Idade: ____ anos

Sexo: ____

Endereço e telefone: _____

Peso: ____ Kg

Altura: ____ m

IMC: ____

Circunferência abdominal: ____ cm

Circunferência do quadril: ____ cm

Tempo de diagnóstico: _____

Co-morbidades: _____

Medicamentos em uso: _____

Tabagista: ____ Sim (Cigarros por dia: _____)

____ Não

____ Ex (Há quanto tempo parou? _____)

Etilista: ____ Sim (Consumo diário: _____)

____ Não

____ Ex (Há quanto tempo parou? _____)

Atividade física: ____ Sim (Atividade: _____ / Frequência: _____)

____ Não

Há alguma doença presente em mais de um membro da família? Qual? Grau de parentesco?

Outras informações:

Exames laboratoriais:

Glicemia jejum: _____ Uréia: _____

Glicemia pós-prandial: _____ PCR: _____

HB A1C: _____ Leptina: _____

CT: _____ Adiponectina: _____

LDL: _____ Insulina: _____

HDL: _____ Proteinúria: _____

VLDL: _____ Microalbuminúria: _____

TG: _____ Peptídeo C: _____

Creatinina sérica: _____ Outros exames: _____

ANEXO E – COMPROVANTE DE SUBMISSÃO DO ARTIGO DO CAPÍTULO 1 PARA PUBLICAÇÃO

18/12/13

Gmail - Fwd: Submission Confirmation



Kathryna Fontana Rodrigues <katyfontanar@gmail.com>

Fwd: Submission Confirmation

1 mensagem

Kathryna Fontana Rodrigues <katyfontanar@gmail.com>

18 de dezembro de 2013 22:53

Para: Kathryna Fontana Rodrigues <katyfontanar@gmail.com>

Dear Dr. Gomes,

Your submission entitled "Association of a large panel of cytokine gene polymorphisms with complications and comorbidities in type 2 diabetes patients." has been received by Diabetes Research and Clinical Practice

You may check on the progress of your paper by logging on to the Elsevier Editorial System as an author.

The URL is

<http://ees.elsevier.com/diab/>.

Your username is: karina@coltec.ufmg.br

If you need to retrieve password details, please go to: http://ees.elsevier.com/diab/automail_query.asp

Your manuscript will be given a reference number once an Editor has been assigned.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

Diabetes Research and Clinical Practice

For further assistance, please visit our customer support site at <http://help.elsevier.com/app/answers/list/p/7923> Here you can search for solutions on a range of topics, find answers to frequently asked questions and learn more about EES via interactive tutorials. You will also find our 24/7 support contact details should you need any further assistance from one of our customer support representatives.

Kathryna F. Rodrigues

Farmacêutica Bioquímica (CRFMG 27692)

Mestranda em Genética

Instituto de Ciências Biológicas, UFMG

[\(31\)9276-4187](tel:(31)9276-4187)

Kathryna F. Rodrigues

Farmacêutica Bioquímica - UFMG (CRF-MG 27692)

Mestre em Genética - ICB/UFMG

Doutoranda em Genética - ICB/UFMG

[\(31\)9276-4187](tel:(31)9276-4187)

ANEXO F – COMPROVANTE DE SUBMISSÃO DO ARTIGO “The role of transforming growth factor-beta (TGF-BETA) in diabetic nephropathy”

31/10/13

Gmail - Fwd: 180270: Acknowledging Receipt



Kathryna Fontana Rodrigues <katyfontanar@gmail.com>

Fwd: 180270: Acknowledging Receipt

Kathryna Fontana Rodrigues <katyfontanar@gmail.com>
Para: Kathryna Fontana Rodrigues <katyfontanar@gmail.com>

31 de outubro de 2013 18:56

----- Forwarded message -----

From: **International Journal of Medical Genetics** <mai.mamdouh@hindawi.com>
Date: 2013/10/5
Subject: 180270: Acknowledging Receipt
To: karinabgb@gmail.com
Cc: mai.mamdouh@hindawi.com, katyfontanar@gmail.com, anav@uai.com.br

Dear Dr. Braga Gomes,

The Review Article titled "THE ROLE OF TRANSFORMING GROWTH FACTOR-BETA (TGF-BETA) IN DIABETIC NEPHROPATHY," by Karina Braga Gomes, Kathryna Fontana Rodrigues and A. Fernandes has been received and assigned the number 180270.

All authors will receive a copy of all the correspondences regarding this manuscript.

Thank you for submitting your work to International Journal of Medical Genetics.

Best regards,

Mai Mamdouh
Editorial Office
Hindawi Publishing Corporation
<http://www.hindawi.com>

—
Professora Karina Braga Gomes Borges
Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas
Faculdade de Farmácia
Universidade Federal de Minas Gerais
Tel: 55 31 3409-6895/Fax: 55 31 3409-6985

—
Kathryna F. Rodrigues
Farmacêutica Bioquímica (CRFMG 27692)
Mestranda em Genética
Instituto de Ciências Biológicas, UFMG
(31)9276-4187

**ANEXOS G – COMPROVANTES DE RESUMOS APRESENTADOS EM
CONGRESSOS**

certificamos que

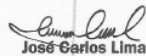
KATHRYNA FONTANA RODRIGUES

participou do

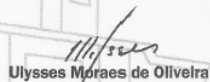
Salvador 46°
**Congresso Brasileiro
de Patologia Clínica
Medicina Laboratorial**
Exposição Técnico-Científica
4 a 7 de setembro de 2012
Centro de Convenções da Bahia

A Evolução do Diagnóstico na Medicina Laboratorial

na qualidade de autor responsável do tema livre "**RELAÇÃO DO PERFIL LIPÍDICO E
GLICÊMICO COM O SEXO E IMC EM PACIENTES COM DIABETES MELLITUS TIPO 2**"
, tendo como co-autores "GIOVANI, N. C., BOSCO, A. A., BORGES, K. B. G.".


José Carlos Lima

Presidente do 46° Congresso
Brasileiro de Patologia Clínica / Medicina Laboratorial


Ulysses Moraes de Oliveira

Coordenador da Comissão Científica do 46° Congresso
Brasileiro de Patologia Clínica / Medicina Laboratorial


Paulo Sérgio Roffé Azevedo

Presidente da Sociedade Brasileira de Patologia Clínica /
Medicina Laboratorial

realização



certificamos que

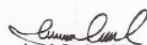
NATHÁLIA CÉSAR GIOVANI

participou do


Salvador **46°**
**Congresso Brasileiro
de Patologia Clínica
Medicina Laboratorial**
Exposição Técnico-Científica
4 a 7 de setembro de 2012
Centro de Convenções da Bahia

A Evolução do Diagnóstico na Medicina Laboratorial

na qualidade de autor responsável do tema livre "**AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DE HBA1C E PARÂMETROS DE FUNÇÃO RENAL EM PACIENTES COM DIABETES MELLITUS TIPO 2**", tendo como co-autores "RODRIGUES, K. F., BOSCO, A. A., BORGES, K. B. G.".


José Carlos Lima

Presidente do 46º Congresso
Brasileiro de Patologia Clínica / Medicina Laboratorial


Ulysses Moraes de Oliveira

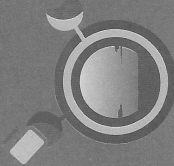
Coordenador da Comissão Científica do 46º Congresso
Brasileiro de Patologia Clínica / Medicina Laboratorial


Paulo Sérgio Roffé Azevedo

Presidente da Sociedade Brasileira de Patologia Clínica /
Medicina Laboratorial

realização





**IMMUNO
NATAL 2013**

XXXVIII Congress of the Brazilian Society of Immunology
VI ESCI – Extra Section of Clinical Immunology

11th WORLD CONGRESS ON
INFLAMMATION
International Association of Inflammation Societies

September 21-25, 2013 NATAL RN BRAZIL



This is to certify that

LIRLÂNDIA PIRES SOUSA*

presented the **Poster** entitled “ASSOCIATION OF TGF-BETA1 CODON 25 (+915C/G) POLYMORPHISM WITH TYPE 2 DIABETES MELLITUS COMPLICATIONS”

Authors: KATHRYNA FONTANA RODRIGUES; NATHALIA TEIXEIRA PIETRANI; ADRIANA APARECIDA BOSCO; LIRLÂNDIA PIRES SOUSA* e KARINA BRAGA GOMES

during the **Poster Session** at the
11th World Congress on Inflammation and XXXVIII Congress of the Brazilian Society of Immunology
held on September 21-25, 2013.

Natal, Rio Grande do Norte, Brazil, September 25th, 2013.

Dr. Sérgio Costa Oliveira
President of the Brazilian Society of Immunology

Dr. B. Boris Vargáfing
Executive President of the Congress

Dr. Mauro Martins Teixeira
Chair of the Scientific Committee of the Congress



**IMMUNO
NATAL 2013**

XXXVIII Congress of the Brazilian Society of Immunology
VI ESCI – Extra Section of Clinical Immunology

11th WORLD CONGRESS ON
INFLAMMATION
International Association of Inflammation Societies

September 21-25, 2013 NATAL RN BRAZIL



This is to certify that


NATHALIA TEIXEIRA PIETRANI*


presented the **Poster** entitled "EVALUATION OF INFLAMMATION IN TYPE 2 DIABETES MELLITUS THROUGH THE INTRACELLULAR SIGNALING PATHWAYS"

Authors: **NATHALIA TEIXEIRA PIETRANI***; KATHRYNA FONTANA RODRIGUES; ADRIANA APARECIDA BOSCO; LIRLÂNDIA PIRES DE SOUSA e KARINA BRAGA GOMES

during the **Poster Session** at the
11th World Congress on Inflammation and XXXVIII Congress of the Brazilian Society of Immunology
held on September 21-25, 2013.

Natal, Rio Grande do Norte, Brazil, September 25th, 2013.


Dr. Sérgio Costa Oliveira
President of the Brazilian Society of Immunology


Dr. B. Boris Vargafitig
Executive President of the Congress


Dr. Mauro Martins Teixeira
Chair of the Scientific Committee of the Congress

ANEXOS H – ACEITES DE RESUMOS PARA APRESENTAÇÃO EM CONGRESSO

31/10/13

Gmail - Fwd: WDC 2013 Melbourne - Abstract accepted as poster



Kathryna Fontana Rodrigues <katyfontanar@gmail.com>

Fwd: WDC 2013 Melbourne - Abstract accepted as poster

Kathryna Fontana Rodrigues <katyfontanar@gmail.com>
Para: Kathryna Fontana Rodrigues <katyfontanar@gmail.com>

31 de outubro de 2013 18:50

10/07/13

Abstract number: ME-1230

Abstract title: Interferon gamma +874 T/A polymorphism is associated with depression in type 2 diabetes mellitus

Dear Professor Gomes,

On behalf of the Programme Committee of the World Diabetes Congress 2013 Melbourne organised by the International Diabetes Federation, it is my pleasure to inform you that your abstract has been accepted as a poster.

Further practical details (poster details and display instructions) will be sent to you by October.

The presenting author must register for the congress and is entitled to the applicable early registration rate. The registration deadline is 20 September 2013.

Should the registration process be incomplete by this date, the abstract will not be published or displayed and will be removed from the Programme.

To register please sign in to your congress profile using the link and enter your username and password as listed below.

<http://conference2.idf.org/MEL2013/CM.NET.WebUI/Portal/portal.aspx?conferenceid=05000000-0000-0000-0000-000000000002>

username: karinabgb@gmail.com

password: 67582

Should the presenting author not be the submitting author, please provide all updated contact details for the presenting author.

All correspondence should be sent to my attention through Jessica Pledge, the Congress Programme Administrator (jessica.pledge@idf.org).

With best wishes,



Professor Paul Zimmet AO
Chair, Programme Committee

31/10/13

Gmail - Fwd: WDC 2013 Melbourne - Abstract accepted as poster



Kathryna Fontana Rodrigues <katyfontanar@gmail.com>

Fwd: WDC 2013 Melbourne - Abstract accepted as poster

Kathryna Fontana Rodrigues <katyfontanar@gmail.com>
Para: Kathryna Fontana Rodrigues <katyfontanar@gmail.com>

31 de outubro de 2013 18:54

10/07/13

Abstract number: ME-1251

Abstract title: Association of TGF-beta 1 Codon 25 (G915C) polymorphism with Type 2 Diabetes Mellitus complications

Dear Professor Gomes,

On behalf of the Programme Committee of the World Diabetes Congress 2013 Melbourne organised by the International Diabetes Federation, it is my pleasure to inform you that your abstract has been accepted as a poster.

Further practical details (poster details and display instructions) will be sent to you by October.

The presenting author must register for the congress and is entitled to the applicable early registration rate. The registration deadline is 20 September 2013.

Should the registration process be incomplete by this date, the abstract will not be published or displayed and will be removed from the Programme.

To register please sign in to your congress profile using the link and enter your username and password as listed below.

<http://conference2.idf.org/MEL2013/CM.NET.WebUI/Portal/portal.aspx?conferenceid=05000000-0000-0000-0000-000000000002>

username: karinabgb@gmail.com

password: 67582

Should the presenting author not be the submitting author, please provide all updated contact details for the presenting author.

All correspondence should be sent to my attention through Jessica Pledge, the Congress Programme Administrator (jessica.pledge@idf.org).

With best wishes,



Professor Paul Zimmet AO
Chair, Programme Committee