



Flavio Fontes Pirozzi

Relação entre o índice de massa corpórea, diabetes *mellitus* tipo 2, estresse oxidativo e polimorfismos nos genes da enzima conversora de angiotensina (*ECA*) e metilenotetrahidrofolato redutase (*MTHRF*)

São José do Rio Preto

2016

Flavio Fontes Pirozzi

Relação entre o índice de massa corpórea, diabetes *mellitus* tipo 2, estresse oxidativo e polimorfismos nos genes da enzima conversora de angiotensina (*ECA*) e metilenotetrahidrofolato redutase (*MTHRF*)

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biociências, junto ao Programa de Pós-Graduação em Biociências, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Orientador: Prof. Dr. Milton Artur Ruiz

Coorientadora: Profa. Dra. Claudia Regina
Bonini Domingos

São José do Rio Preto

2016

Pirozzi, Flavio Fontes

Relação entre o índice de massa corpórea, diabetes *mellitus* tipo 2, estresse oxidativo e polimorfismos nos genes da enzima conversora de angiotensina (*ECA*) e metilenotetrahidrofolato redutase (*MTHRF*) / Flavio Fontes Pirozzi. -- São José do Rio Preto, 2016

87 f. : il., tabs.

Orientador: Prof Dr. Milton Artur Ruiz

Coorientadora: Prof. Dra. Claudia Regina Bonini Domingos

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Genética molecular humana. 2. Obesidade - Aspectos genéticos. 3. Diabetes Mellitus Tipo 2 - Aspectos genéticos. 4. Polimorfismo (Genética). 5. Estresse oxidativo. 6. Índice de massa corporal. I. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. II. Título.

CDU - 575.1

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do IBILCE

UNESP - Câmpus de São José do Rio Preto

Flavio Fontes Pirozzi

Relação entre o índice de massa corpórea, diabetes *mellitus* tipo 2, estresse oxidativo e polimorfismos nos genes da enzima conversora de angiotensina (*ECA*) e metilenotetrahidrofolato redutase (*MTHFR*)

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biociências, junto ao Programa de Pós-Graduação em Biociências, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Comissão Avaliadora

Prof. Dr. Milton Artur Ruiz

UNESP - São José do Rio Preto

Orientador

Prof. Dr. Antônio Carlos Pires

FAMERP

Profa. Dra. Sônia Maria Oliani

UNESP - São José do Rio Preto

São José do Rio Preto

2016

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Hemoglobinas e Genética das Doenças Hematológicas, do Departamento de Biologia e no Laboratório de Biomarcadores de Contaminação Ambiental, do Departamento de Química e Ciências Ambientais, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, UNESP Câmpus de São José do Rio Preto, com recursos próprios.

Dedicatória

Dedico este trabalho aos meus pais, João e Izabel, pois desde cedo, me ensinaram os valores éticos da vida, o amor a profissão e por todo o apoio ao longo de todos estes anos, apoio este que foi a chave fundamental para que eu pudesse alcançar todos os meus sonhos. Dedico também à minha esposa, Graziela, e minha filha, Nicole, por continuarem me dando todo o carinho e amor deste mundo, mesmo quando eu tive que dividir o meu eterno carinho e amor que tenho por elas, com o carinho e amor que também tenho pelo que faço.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, **João Octávio de Biasi Pirozzi** e **Izabel Cristina Ferreira Fontes Pirozzi**, pelo amor, carinho, conhecimento, confiança e exemplos de dedicação com a família e o trabalho.

À minha esposa, **Graziela Alves Pereira Pirozzi (Gabi)**, por todo amor, carinho, cumplicidade, confiança, compreensão, respeito e admiração; te amo para sempre minha vida.

À minha filha, **Nicole Alves Pirozzi**, o meu presente da vida, minha razão de viver, desculpa pelos momentos de ausência das brincadeiras e obrigado por todo amor que recebo de você.

À minha irmã, **Renata Fontes Bizarri**, e meu cunhado, **João Henrique Bizarri** (e não esquecendo da minha sobrinha, **Bianca Bizarri**) por todo amor, carinho, respeito e admiração.

Para toda a família **Ferreira Fontes** e a família **Pirozzi**, pelo carinho, respeito, amor e companheirismo ao longo de todos estes anos.

Ao meu sogro, **Wilson Corrêa Pereira Filho**, e minha sogra, **Sônia Corrêa**, por todo carinho, respeito e admiração.

Aos meus professores de graduação da Disciplina de Endocrinologia da Faculdade de Medicina de Catanduva, **Dr. Marcos Antônio Lopes** e **Dr. Marino Cattalini**, por sempre confiarem no meu trabalho e serem fontes inspiradoras de ética e trabalho na minha carreira e que tanto me deram força para seguir na carreira acadêmica.

Aos meus professores da residência de Endocrinologia na Faculdade de Medicina de Rio Preto, **Dr. Antônio Carlos Pires**, **Dr. Marco Antônio Dias**, **Dra. Lucia Helena Tácito**, **Dra Luciana Vilela** e **Dra. Maristela Rui** pelos dois anos de convívio intenso e muito aprendizado.

Aos meus colegas do Laboratório de Hemoglobinas e genética das Doenças Hematológicas - IBILCE/UNESP, **Jéssika**, **Mariana**, **Edis**, **Patrícia**, **Lidiane**, **Danilo** e todos àqueles que de uma forma, direta e indireta, contribuíram para

este trabalho, o auxílio com a análise laboratoriais e os dados estatísticos deste estudo, e claro, pelos momentos de profunda discussão científica e descontração.

*À **Prof. Dra. Lilian Castiglioni** e **Prof. Dr. Edis Belini Júnior** pela grandiosa ajuda e toda paciência do mundo com a avaliação estatística.*

*Aos meus amigos, colegas de especialidade e de disciplina, **Dr. Cleber Favaro** e **Dra. Danielli Favaro**, por todo respeito, companheirismo e admiração que sempre tive de vocês (o mesmo é recíproco).*

*Ao colega **Dr. Edmo Atique Gabriel**, e todos os docentes da faculdade de Medicina da UNILAGO.*

*À minha coorientadora, **Profa. Dra. Cláudia Regina Bonini Domingos**, pela paciência, dedicação e amor pela ciência, serei eternamente grato pelas portas que me foram abertas.*

*Ao meu orientador, **Prof. Dr. Milton Artur Ruiz**, pela confiança por você depositada para que tivesse mais este êxito em minha vida profissional e tanto contribuir para o meu crescimento científico.*

*À **Deus** pelo dom da vida e da sabedoria.*

"A verdadeira viagem de descobrimento não consiste em procurar novas paisagens, e sim em ter novos olhos"

(Marcel Proust)

RESUMO

Introdução: o aumento da prevalência da obesidade e do diabetes mellitus tipo 2 (DM2) é um grande desafio de saúde pública mundial e, por serem doenças heterogêneas e que elevam a chance do surgimento de doenças cardiovasculares, parâmetros de avaliação de risco são necessário na avaliação destes indivíduos. **Objetivos:** correlacionar diferentes variáveis como o índice de massa corpórea (IMC), os polimorfismos I/D *ECA* e C677T *MTHFR* e provas de estresse oxidativo em uma população de obesos brasileiros, com e sem diabetes, e doenças associadas com a síndrome metabólica. **Casuística e métodos:** avaliamos 125 indivíduos com obesidade (IMC maior ou igual a 30 Kg/m²) que foram divididos em dois grupos: grupo DM2 (obesos com DM2, n = 47) e grupo controle (obesos sem DM2, n= 78). Os pacientes do grupo DM2 apresentavam maior média de idade (p=0,02) e maior número de indivíduos com dislipidemia (p<0,05). Por meio de uma amostra de sangue periférico foi avaliado os polimorfismos I/D *ECA* e C677T *MTHFR* e as provas de estresse oxidativo, o TBARS e o TEAC. **Resultados:** na comparação entre os grupos com os polimorfismos analisados, não encontramos diferença significativa de chance de ocorrência e proteção para o DM2 em diferentes modelos de herança, na avaliação dos genótipos e no sinergismo entre eles. No polimorfismo I/D *ECA*, o genótipo mais frequente em ambos os grupos é o DD. Também não encontramos diferença significativa destes polimorfismos e as complicações microvasculares no grupo DM2. Correlacionando o IMC com o estresse oxidativo, encontramos uma correlação diretamente com o TBARS (r =0,7941) e inversamente proporcional com o TEAC (r=-0,6022) de forma significativa (p<0,0001). Entretanto, não houve diferença nos valores médios de TBARS e do TEAC entre os grupos DM2 e controle. O genótipo DD foi o mais frequente em ambos e o mesmo está relacionado com aumento do risco cardiovascular. Na presença do genótipo DD do polimorfismo I/D *ECA*, notamos um pior estresse oxidativo em relação aos outros genótipos. O mesmo não ocorreu na análise do homocigoto mutante TT no polimorfismo C677T *MTHFR*. **Discussão:** em uma população multiétnica, não encontramos relação destes polimorfismos na gênese do DM2 mas a maior frequência do genótipo DD em obesos com e sem diabetes e um pior padrão do estresse oxidativo nesses indivíduos se correlacionam com os dados na literatura e o maior risco do desenvolvimento de doenças cardiovasculares estaria mais relacionado com a obesidade do que a presença do diagnóstico do DM2. **Conclusões:** pela análise do estresse oxidativo, o IMC e a presença do genótipo DD são importantes ferramentas na avaliação de risco cardiovascular. Ressaltamos que, pela primeira vez, avaliamos o papel desses dois polimorfismos em uma população multiétnica de obesos brasileiros.

Palavras-chaves: Obesidade. Índice de massa corpórea. Diabetes. Polimorfismo. Estresse oxidativo

ABSTRACT

Introduction: the increase in the prevalence of obesity and type 2 diabetes mellitus (T2DM) is a major global public health challenge and, because they are heterogeneous diseases that increase the chance of cardiovascular diseases, risk assessment parameters are necessary in the evaluation of these individuals. Aims: to correlate different variables such as body mass index (BMI), *ACE* I/D and *MTHFR* C677T polymorphisms, and oxidative stress tests in a population of obese Brazilians, with and without diabetes, and diseases associated with metabolic syndrome. Casuistry and methods: we evaluated 125 individuals with obesity (BMI greater than or equal to 30 kg /m²) who were divided into two groups: T2DM group (obese with T2DM, n = 47) and control group (obese without T2DM, n = 78). Patients in the T2DM group presented higher mean age (p=0.02) and higher number of individuals with dyslipidemia (p<0.05). The *ACE* I/D and *MTHFR* C677T polymorphisms and the oxidative stress, TBARS and TEAC tests, were evaluated using a peripheral blood sample. Results: in the comparison between the groups with the analyzed polymorphisms, we do not find a significant difference in the chance of occurrence and protection for T2D in different inheritance models, in the evaluation of genotypes and in the synergism between them. In the *ACE* I/D polymorphism, the most frequent genotype in both groups is DD. We also do not find a significant difference of these polymorphisms and the microvascular complications in the T2DM group. Relating BMI to oxidative stress, we found a correlation directly with TBARS (r=0.7941) and inversely proportional to the TEAC (r =-0.6022) in a significant way (p <0.0001). However, there was no difference in the mean values of TBARS and TEAC between T2DM and control groups. The DD genotype was the most frequent in both, and the same is related to increased cardiovascular risk. In the presence of the DD genotype of the *ACE* I/D polymorphism, we noticed a worse oxidative stress in relation to the other genotypes. The same do not occur in the analysis of the mutant homozygote TT in the *MTHFR* C677T polymorphism. Discussion: in a multiethnic population, we do not find a relation of these polymorphisms in the genesis of T2DM, but the greater frequency of the DD genotype in obese patients with and without diabetes and a worse pattern of oxidative stress in these individuals correlate with the data in the literature and the greater risk of development of cardiovascular diseases would be more related to obesity than the presence of the diagnosis of T2DM. Conclusions: BMI and presence of the DD genotype are important tools for assessing cardiovascular risk by oxidative stress analysis. We emphasize that, for the first time, we evaluated the role of these two polymorphisms in a multiethnic population of obese Brazilians.

Keywords: Obesity. Body mass index. Diabetes. Polymorphism. Oxidative stress

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Epidemiologia global da obesidade.....	25
Figura 2: Ranking dos países com números absolutos e relativos de pacientes obesos entre 1975 e 2014.....	26
Figura 3. Dados epidemiológicos do diabetes <i>mellitus</i>	28

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Fórmula e classificação da obesidade conforme o Índice de Massa Corpórea (IMC).....	23
Tabela 2. Ranking dos países com maior número de pacientes diabéticos.....	28
Tabela 3. Dados demográficos e clínicos dos participantes do estudo; gráfico comparando os grupos com pacientes obesos com diabetes <i>mellitus</i> tipo 2 (DM2) e grupo controle de pacientes obesos sem diabetes <i>mellitus</i> tipo 2 (controles).....	37
Tabela 4. Avaliação dos genótipos e frequências alélicas dos polimorfismos de I/D <i>ECA</i> e C677T <i>MTHFR</i> entre indivíduos obesos com diabetes <i>mellitus</i> tipo 2 (DM2) em comparação com o grupo controle (controles).....	44
Tabela 5. Análise da associação de DM2 com os polimorfismos I/D <i>ECA</i> e C677T <i>MTHFR</i> em diferentes modelos de heranças.....	45
Tabela 6. Análise de associação de diabetes <i>mellitus</i> tipo 2 (DM2) com a combinação de polimorfismos (sinergismo entre I/D <i>ECA</i> e C677T <i>MTHFR</i>).....	46

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A1c	hemoglobina glicada
ABTS	2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolínaácido-6-sulfônico-diamônio
ABTS+	radical cátion do ABTS
ACE	<i>angiotensin converting enzyme</i>
ADA	<i>American Diabetes Association</i>
AHA	<i>American Heart Association</i>
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AVC	acidente vascular cerebral
CAAE	Certificado de Apresentação para Apreciação Ética
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CNS	Conselho Nacional de Saúde
DAP	doença arterial periférica
DCV	doença cardiovascular
DDP4	dipeptidil peptidase tipo 4
DLP	dislipidemia
DM2	diabetes <i>mellitus</i> tipo 2
DNA	ácido desoxirribonucléico
ECA	enzima conversora de angiotensina
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético
FDA	<i>Food and Drug Association</i>
FTO	<i>fat mass and obesity-associated protein</i>
GLP1	<i>glucagon like-peptide 1</i>

GLUT4	transportador de glicose tipo 4
G↓ANTC'	sítio de reconhecimento
HAS	hipertensão arterial sistólica
Hinfl	enzima de restrição <i>Haemophilus influenzae</i> I
IAM	infarto agudo do miocárdio
IDF	International Diabetes Federation
IMC	índice de massa corpórea
I/D	inserção/deleção
K ₂ S ₂ O ₈	persulfato de potássio
KCNJ11	<i>potassium voltage-gated channel subfamily J member 11</i>
Kg/m ²	quilogramas por metros ao quadrado
LDL	lipoproteína de baixa densidade
mg/dL	miligrama por decilitro
mg/mL	miligrama por mililitro
mM/L	milimol por litro
MTHFR	metilenotetrahidrofolato redutase
nm	nanômetro
pb	pares de bases
PCR	<i>polymorphism chain reaction</i>
PCR/RFLP	polymorphism chain reaction/restriction fragment lenght polymorphism
PPARG	<i>peroxisome proliferator-activated receptor gamma</i>
SAHOS	síndrome da apneia/hiponeia obstrutiva do sono
SGLT2	cotransportador sódio/glicose tipo 2

SM	síndrome metabólica
TBA	ácido tiobarbitúrico
TBARS	espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico
TCF7L2	<i>transcription factor 7-like-2</i>
TCLE	termo de consentimento livre e esclarecido
TEAC	capacidade antioxidante das amostras
Trolox	ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrameticromono-2-carboxílico
UV	ultravioleta

LISTA DE SÍMBOLOS

α	alfa
β	beta
γ	gama

SUMÁRIO

1. Introdução.....	21
1.1 Aspectos gerais.....	21
1.2 Etiologia da Obesidade.....	22
1.3 Classificação da Obesidade.....	23
1.4 Epidemiologia da Obesidade.....	24
1.5 Aspectos gerais do DM2.....	26
1.6 Etiologia do DM2.....	27
1.7 Epidemiologia do DM2.....	27
1.8 Tratamento da Obesidade.....	29
1.9 Tratamento do DM2	29
1.10 Polimorfismos Genéticos do DM2.....	30
1.10.1 Polimorfismo I/D <i>ECA</i> no DM2.....	30
1.10.2 Polimorfismo C677T <i>MTHFR</i> no DM2.....	31
1.11 Estresse oxidativo.....	31
2. Objetivos.....	34
2.1 Objetivo Geral.....	34
2.2 Objetivos Específicos.....	34
3. Casuística e métodos.....	36
3.1 Casuística.....	36
3.2 Considerações Éticas.....	38
3.3 Metodologia.....	39
3.3.1 Coleta das Amostras.....	39
3.3.2 Polimorfismo I/D da <i>ECA</i>	39
3.3.3 Polimorfismo C677T da <i>MTHFR</i>	39
3.3.4 Dosagens bioquímicas para determinação da peroxidação lipídica e capacidade antioxidante total.....	40
3.3.4.1 Dosagem das espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS).....	40
3.3.4.2 Determinação da capacidade antioxidante em equivalência ao Trolox (TEAC).....	40
3.3.5 Análise Estatística.....	41
4. Resultados.....	43
4.1 Avaliação Geral e Comparação Entre os Grupos.....	43
4.2 Análise dos Polimorfismos Genéticos em Relação aos Grupos.....	44
4.3 Análise dos Grupos em Relação ao estresse Oxidativo.....	47
5. Discussão.....	50
6. Conclusões.....	56
Referências.....	58
Apêndice A.....	64
Apêndice B.....	65

Apêndice C.....	67
Apêndice D.....	71

1. Introdução

1. INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos Gerais

A obesidade é um grave problema de saúde pública na atualidade. Estudo epidemiológico recente aponta para um importante aumento em todo o mundo. Comparando dados mundiais, desde o ano de 1975 até o ano de 2014, observa-se uma nítida diminuição dos indivíduos com peso normal e baixo peso e aumento importante no número de pacientes com sobrepeso e obesidade (NCR RISK FACTOR COLLABORATION, 2016).

O acúmulo de tecido gorduroso corporal, principalmente o tecido adiposo visceral ou abdominal, além de causar outros problemas de saúde, tais como esteatose hepática, osteoartrites e aumento de risco de neoplasias, também pode gerar distúrbios psicológicos pelo estigma social que envolve a obesidade. Dentre as doenças relacionadas com a obesidade destacam-se o diabetes *mellitus* tipo 2 (DM2), hipertensão arterial sistêmica (HAS) e a dislipidemia (DLP), doenças que compõem a síndrome metabólica (SM) e aumentam de forma significativa o risco de desenvolvimento de doenças cardiovasculares, como o infarto agudo do miocárdio (IAM) e o acidente vascular cerebral (AVC) (KRANENDONK et al., 2015).

Além destas doenças acima descritas, a obesidade ainda pode aumentar o risco para outros problemas de saúde como a síndrome da apneia/hipopneia e obstrutiva do sono (SAHOS), problemas osteoarticulares, distúrbios respiratórios, insuficiência venosa crônica, diversos tipos de neoplasias e problemas psicossociais (GURNANI, BIRKEN, HAMILTON, 2015).

Este conjunto de distúrbios metabólicos, em especial a obesidade e o DM2, tem tratamentos complexos que envolvem aspectos fisiopatológicos (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2016). Mesmo com o uso de ferramentas clínicas e cirúrgicas, orientações sobre mudança do estilo de vida e o uso de diversas medicações, são discretos os avanços para a redução da morbidade e mortalidade destes pacientes. Por este motivo, existe a necessidade pela investigação de outras causas para o desenvolvimento destas doenças e novas formas de tratamento.

1.2 Etiologia da Obesidade

A obesidade é uma doença crônica, inflamatória, subaguda, de etiologia multifatorial, na qual estão envolvidos fatores genéticos e ambientais (GRÜN, 2010). Na questão genética, apesar de existir formas monogênicas de obesidade e síndromes genéticas relacionadas com a obesidade, a principal influência genética envolvida com o aumento de peso é poligênica conferindo maior susceptibilidade de acordo com a dieta, os hábitos alimentares e maior risco de desenvolver distúrbios metabólicos (HINNEY, HEBEBRAND, 2008). Recente estudo aponta mais de 400 genes envolvidos na gênese da obesidade com *loci* em todos os cromossomos, com exceção do cromossomo Y. Dentre as alterações genéticas relacionadas com a obesidade destaca-se o polimorfismo do gene *fat mass and obesity-associated protein (FTO)*, responsável pelo acúmulo de gordura visceral e resistência a ação da insulina (KIM et al, 2016).

Por ser uma doença multifatorial, existe um forte envolvimento dos fatores genéticos com o meio ambiente. Segundo o médico americano, Dr. George Bray, fundador da *The Obesity Society*, "a genética carrega a arma e o ambiente aperta o gatilho" (BRAY, 2004). Dentre os aspectos ambientais mais importantes, destacam-se os maus hábitos alimentares e o sedentarismo, no acúmulo de tecido adiposo na região abdominal, o que determina maior risco para o desenvolvimento de doenças relacionadas a SM.

Apesar dos dados científicos relacionando os aspectos genéticos e ambientais com a obesidade, ainda existem grandes lacunas a serem desvendadas. Recentemente, novos genes envolvidos com o excesso de peso vem sendo descobertos (LOPOMO , BURGIO , MIGLIORE , 2016). Também vêm sendo relatados novos fatores ambientais relacionados com a obesidade, em especial os disruptores endócrinos (PONTELLI, NUNES, DE OLIVEIRA, 2016) presentes em produtos que usamos no cotidiano (como plástico, bisfenol A, pesticidas,...) e problemas ligados a qualidade do sono e redução na produção da melatonina durante o período noturno (CIZZA, REQUENA, DE JONGE, 2011).

1.3 Classificação da Obesidade

A obesidade pode ser classificada de forma qualitativa e quantitativa. Além das diferentes forma de distribuição do tecido adiposo, das medidas de circunferência abdominal e a relação das circunferências da cintura e do quadril, bioimpedância elétrica e a quantificação do tecido adiposo por meio de exames de imagem, uma das principais formas de classificar a obesidade é por meio do cálculo do índice de massa corpórea (IMC).

O IMC é calculado pela divisão do peso (em quilogramas) pela altura (em metros) elevado ao quadrado - $IMC = \text{peso (Kg)} / \text{altura (m)} \times \text{altura (m)}$ - e o paciente pode ser classificado como: baixo peso ($IMC < 18,5 \text{ Kg/m}^2$), peso normal (IMC entre 18,5 e 24,9 Kg/m^2), sobrepeso (IMC entre 25,0 e 29,9 Kg/m^2) e obesidade ($IMC \geq 30 \text{ Kg/m}^2$). A obesidade pode ser dividida em três graus: obesidade grau I (IMC entre 30,0 e 34,9 Kg/m^2), obesidade grau II (IMC entre 35,0 e 39,9 Kg/m^2) e obesidade grau III ($IMC \geq 40,0 \text{ Kg/m}^2$) (Tabela 1) (DE LORENZO et al, 2016).

Tabela 1. Fórmula e classificação da obesidade conforme o Índice de Massa Corpórea (IMC).

$IMC = \frac{\text{Peso (Kg)}}{\text{Altura (m)}^2}$	
Classificação	IMC
Baixo peso	Menor ou igual a 18,4
Peso normal	18,5 até 24,9
Sobrepeso	25,0 até 29,9
Obesidade grau I	30,0 até 34,9
Obesidade grau II	35,0 até 39,9
Obesidade grau III	Maior ou igual a 40,0

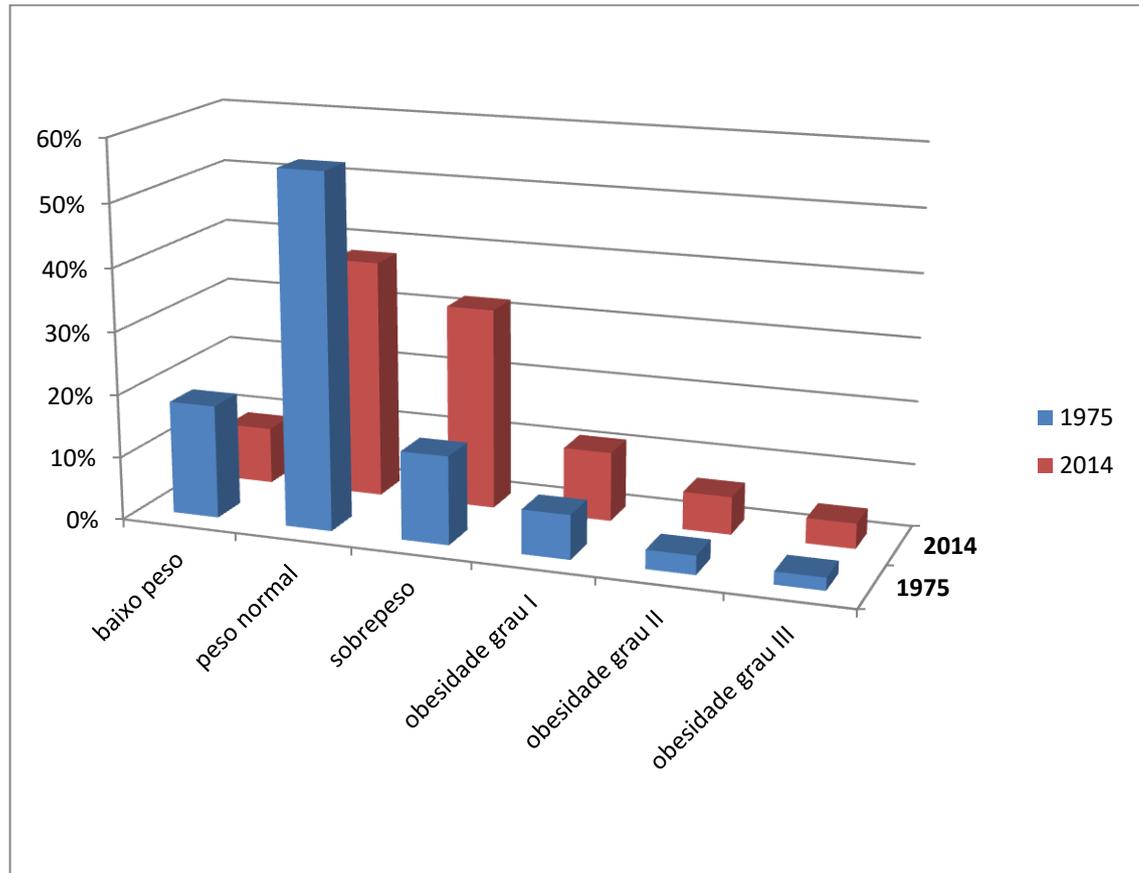
Fórmula para o cálculo do IMC e a classificação (baixo peso, peso normal, sobrepeso e obesidade grau I, II e III) de acordo com o peso (em Kg) e altura (em metros). (Fonte: Sociedade Brasileira de Endocrinologia e Metabologia, 2016).

Apesar das críticas sobre a aplicação do IMC em relação a gravidade da obesidade e a sua associação com o desenvolvimento de comorbidades e mortalidade, o IMC é uma das formas mais usadas para a classificação da obesidade, em grande parte dos artigos científicos (BOSSELO, DONATACCIO, CUZZOLARO, 2016).

1.4 Epidemiologia da Obesidade

Estudos recentes, com dados do ano de 2014, mostram que existiam mais de 600 milhões de pessoas com $IMC \geq 30 \text{ Kg/m}^2$, a maioria do sexo feminino, sendo que, no ano de 1975 existia pouco mais de 100 milhões de pacientes apresentando obesidade. Em uma avaliação epidemiológica das últimas quatro décadas, foi bem evidente uma redução do número de indivíduos com baixo peso e peso normal e um importante incremento daqueles que apresentam sobrepeso e obesidade, em todas as partes do mundo (Figura 1). Dos obesos, quase 30% destes pacientes foram classificados como obesidade grave, ou seja, apresentavam obesidade grau II e grau III. Apenas 18,4% destes pacientes com obesidade viviam em países desenvolvidos, o que implica em menor uso de recursos financeiros para o tratamento direto e indireto para a obesidade e suas complicações (NCR RISK FACTOR COLLABORATION, 2016).

Figura 1. Epidemiologia global da obesidade



Avaliação epidemiológica da população mundial entre os anos de 1975 até 2014 mostrando globalmente uma redução dos indivíduos com baixo peso e peso normal e um importante incremento dos pacientes com sobrepeso e obesidade (Fonte: Adaptado de *NCD Risk Factor Collaboration, Lancet* 2016; 387: 1377-1396).

No Brasil, seguindo uma tendência mundial, vem ocorrendo uma diminuição dos indivíduos que apresentam baixo peso e um importante aumento no número de pessoas com sobrepeso e obesidade. Comparando os dados entre os ano de 1975 e 2014, entre os homens, o país passou da décima para terceira colocação em números absolutos de pacientes com obesidade. Entre as mulheres, neste mesmo período, o Brasil passou da nona para a quinta posição (Figura 2). De forma geral, os dados epidemiológicos mostram aumento de 75% nos casos de obesidade entre os brasileiros na última década (NCR RISK FACTOR COLLABORATION, 2016)

Figura 2: Ranking dos países com números absolutos e relativos de pacientes obesos entre 1975 e 2014

Homens						Mulheres					
1975			2014			1975			2014		
Ranking	Países	%obesos	Ranking	Países	%obesos	Ranking	Países	%obesos	Ranking	Países	%obesos
1	Estados Unidos	22,5	1	China	16,3	1	Rússia	17	1	China	12,4
2	Rússia	7,4	2	Estados Unidos	15,7	2	Estados Unidos	14,8	2	Estados Unidos	12,3
3	Alemanha	5,9	3	Brasil	4,5	3	Ucrânia	5,3	3	Índia	5,3
4	Reino Unido	5,1	4	Rússia	4	4	Alemanha	3,4	4	Rússia	5
5	França	4	5	Índia	3,7	5	Itália	3	5	Brasil	4,8
10	Brasil	2,6				9	Brasil	2,6			

Homens com obesidade do lado esquerdo; mulheres com obesidade do lado direito; destaque para o importante aumento no número de indivíduos obesos no Brasil nas últimas quatro décadas (Fonte: adaptado do *NCD Risk Factor Collaboration, Lancet 2016; 387: 1377-1396*).

1.5 Aspectos Gerais do DM2

O DM2 é uma doença crônica caracterizada por hiperglicemia devido ao aumento da resistência e redução da produção da insulina (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2016). De todas as formas de diabetes *mellitus*, o DM2 representa cerca de 90% dos casos de diabetes em todo o mundo (BHUPATHIRAJU, HU, 2016). O bom controle glicêmico é fundamental para estes pacientes pois, do contrário, a hiperglicemia crônica pode acarretar em diversas complicações microvasculares e macrovasculares (CHAWLA, CHAWLA, JAQQI, 2016).

As complicações microvasculares são a retinopatia diabética (principal causa de cegueira em todo o mundo), a nefropatia diabética (uma das principais causas de insuficiência renal crônica e de ingresso em programas de

diálise) e neuropatia diabética (relacionada com lesões periféricas e amputações, principalmente de membros inferiores)

1.6 Etiologia do DM2

O DM2 é uma doença crônica multifatorial. Entre os principais fatores de risco para o desenvolvimento do DM2 destacam-se os maus hábitos alimentares, sedentarismo, a presença de doenças relacionadas a SM (obesidade, HAS e DLP), os antecedentes pessoais de síndrome do ovário policístico e diabetes gestacional e o antecedente familiar de pacientes de primeiro grau com diagnóstico de DM2 (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2016). Apesar dos efeitos positivos sobre a redução do peso com melhor dieta e a prática de exercícios regulares, cerca de 10% a 20% dos pacientes com DM2 apresentam peso normal o que mostra a importância dos aspectos genéticos na fisiopatologia da doença (ACOSTA et al, 2016).

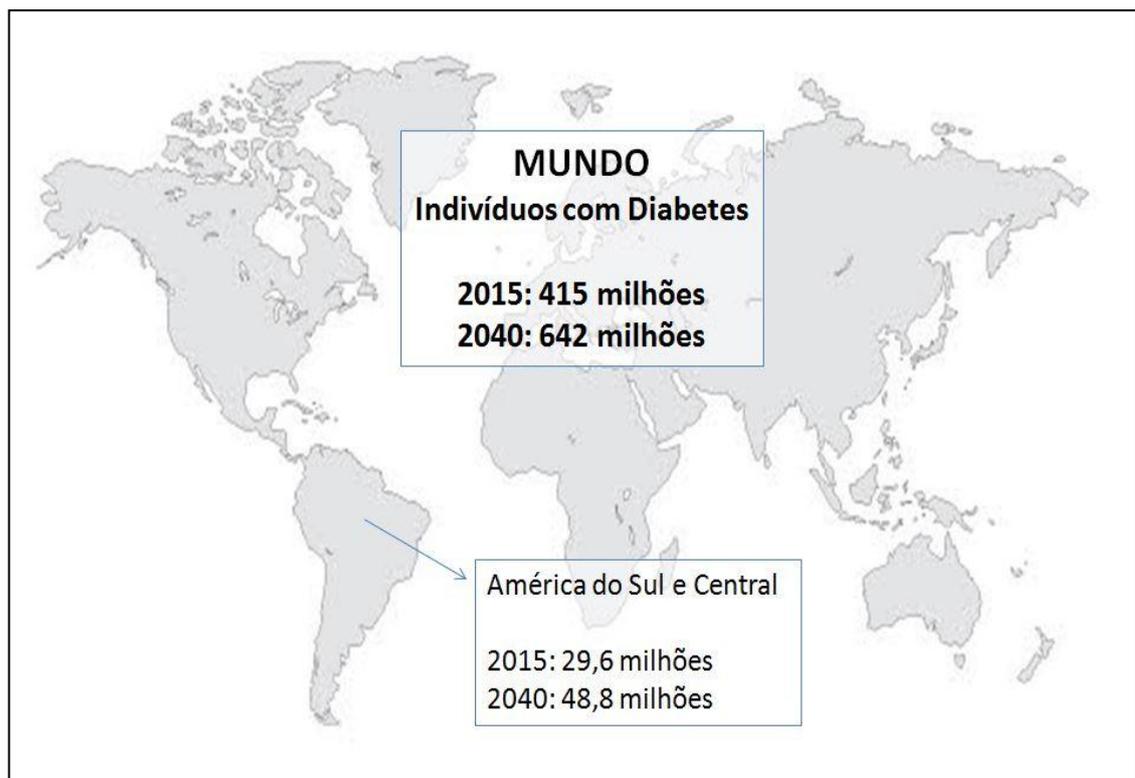
Muitos genes estão envolvidos na gênese do DM2, com destaque para as variantes nos genes *transcription factor 7-like-2 (TCF7L2)*, *peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARG)* e *potassium voltage-gated channel subfamily J member 11 (KCNJ11)*. Porém, existem na literatura científica a descrição de diversos outros genes no desenvolvimento desta doença, mas não de forma significativa e que podem variar de acordo com a população estudada (ABBAS et al, 2013).

1.7 Epidemiologia do DM2

Seguindo a perspectiva mundial do aumento do número de indivíduos com sobrepeso e obesidade, vem ocorrendo um espantoso aumento na prevalência de pacientes com diabetes *mellitus*. Segundo os dados epidemiológicos mais recentes da *International Diabetes Federation (IDF)*, existiam, no total, cerca de 415 milhões de pacientes diabéticos. No início deste século, segundo a mesma organização, acreditava-se que alcançaríamos 360 milhões de indivíduos com diabetes somente no ano de 2030. Uma reavaliação dos dados prevê que no ano de 2040 teremos cerca de 642

milhões de pacientes diabéticos (Figura 3). Segundo o mesmo estudo epidemiológico, em 2015, o Brasil ocupava a quarta posição em número de pacientes com diabetes *mellitus*, com cerca de 14,3 milhões de indivíduos com a doença (Tabela 2) (INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION, 2015). Levantamento epidemiológico mostra uma prevalência de DM2 em torno de 15% na população no município de Ribeirão Preto-SP (MORAES et al, 2010).

Figura 3. Dados epidemiológicos do diabetes *mellitus*



Números absolutos de pacientes diabéticos no mundo, em 2015, e as perspectivas estatísticas para o ano de 2040, de acordo com a *International Diabetes Federation* (Fonte: adaptado do *IDF Diabetes Atlas* - sétima edição).

Tabela 2. Ranking dos países com maior número de pacientes diabéticos

China	109,6 milhões
Índia	69,2 milhões
Estados Unidos	29,3 milhões
Brasil	14,3 milhões
Rússia	12,1 milhões
México	11,5 milhões
Indonésia	10 milhões

Dados epidemiológicos com o número absoluto de indivíduos com diabetes por país, de acordo com a *International Diabetes Federation* (Fonte: *IDF Diabetes Atlas* - sétima edição).

1.8 Tratamento da Obesidade

A mudança do estilo de vida, com a adoção de bons hábitos alimentares e a prática regular de atividade física, são passos fundamentais para a perda de peso. Estudos apontam que além destas duas práticas, o uso de substitutos alimentares e psicoterapia são fundamentais para o sucesso do tratamento clínico (APOVIAN, GARVEY, RYAN, 2015).

O tratamento clínico pode ser complementado com o uso de algumas medicações. Atualmente, no Brasil, estão disponíveis comercialmente o uso do orlistate, sibutramina e, mais recentemente, o liraglutide (FARIA et al, 2010). Há um ano foi aprovado pelo *Food and Drugs Administration* (FDA) novas medicações para o tratamento da obesidade (APOVIAN, GARVEY, RYAN, 2015), medicações que ainda não passaram pela avaliação da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), no Brasil.

Para indivíduos com obesidade grau III ou pacientes com obesidade grau II, com a presença de comorbidades que melhoram com a perda de peso (como o DM2, HAS, DLP, SAHOS e osteoartropatias), existe a indicação de diferentes técnicas de cirurgia bariátrica (DE LORENZO, 2016).

1.9 Tratamento do DM2

Assim como na obesidade, a mudança do estilo de vida - a adoção de uma dieta saudável e evitar o sedentarismo - é parte fundamental no tratamento do DM2 para o bom controle glicêmico (MOZAFFARIAN, 2016). Além disso, na quase totalidade dos casos existe a necessidade do uso adjunto de medicações pertencentes a diferentes classes farmacológicas (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2016). Podemos dividir estas medicações de acordo com os seus efeitos, como:

- Sensibilizadores de insulina: biguanidas (metformina) e agonistas do PPAR- γ ou glitazonas (pioglitazona);
- Secretores de insulina: medicações que atuam sobre os canais de potássio nas células β pancreáticas como as sulfoniluréias e as glinidas;

- Inibição da absorção de carboidratos: inibidores da α -glucosidase (acarbose);
- terapia baseada em incretinas ou incretinomiméticos: inibidores da DPP4 e análogos do GLP1;
- Inibidores da reabsorção renal de glicose ou glicosúricos ou glifozinas; inibidores da SGLT2;
- Insulinas: insulina humana ou análogos de insulina com diferentes aspectos de farmacodinâmica e farmacocinética.

Mais recentemente, algumas sociedades científicas sugerem que a cirurgia bariátrica entre como parte do arsenal terapêutico para o paciente com DM2, desde que, o mesmo apresente obesidade grave (obesidade grau II ou grau III) (BATTERHAM, CUMMINGS, 2016).

1.10 Polimorfismos Genéticos no DM2

Como descrito acima, existem diversas alterações genéticas envolvidas no desenvolvimento do DM2 e atuando em diferentes aspectos na fisiopatologia desta doença. Alterações no gene *TCF7L2* estão relacionadas com distúrbios na secreção de insulina pelas células β pancreáticas. Alterações no gene *FTO* estão relacionadas com resistência a ação deste hormônio. Outras alterações genéticas ganham destaque na literatura científica, em especial os polimorfismos inserção/deleção (I/D) no gene da enzima conversora de angiotensina (*ECA*) e do polimorfismo C677T no gene da metilenotetrahidrofolato redutase (*MTHFR*) (KHODAEIAN et al, 2015).

1.10.1 Polimorfismo I/D ECA no DM2

Apesar das divergências, de acordo com a população estudada, o polimorfismo D/I *ECA* parece ter um papel importante em diversos aspectos do DM2 como no seu desenvolvimento, no surgimento de complicações microvasculares e macrovasculares e também na gênese do diabetes gestacional (DAIMON et al, 2003). A presença do genótipo DD e do alelo D

determinam maior risco para doenças cardiovasculares (LEI et al, 2012; YAKO et al, 2016).

1.10.2 Polimorfismo C677T MTHFR no DM2

Este polimorfismo está envolvido diretamente no ciclo do folato e a sua presença promove incremento nos níveis de homocisteína, o que também eleva o risco cardiovascular em pacientes com DM2. Apesar de ser mais divergente na literatura do que o polimorfismo descrito acima, principalmente no que diz respeito ao risco no desenvolvimento do DM2 e de suas complicações macrovasculares, o polimorfismo C677T *MTHFR* parece ter um papel importante na gênese das complicações microvasculares causadas pelo diabetes (AL-HARBI et al, 2015; LUO et al, 2016).

1.11 Estresse Oxidativo

Além de avaliações através do exame físico e simples exames laboratoriais, os problemas metabólicos como obesidade, DM2, HAS e DLP podem ser estratificados por meio da avaliação do estresse oxidativo causado por estas doenças. Se o sistema antioxidante não for suficiente para superar os fenômenos oxidativos, o estresse oxidativo pode causar lesão no endotélio destes pacientes e aumentar o risco de problemas vasculares, como o IAM e o AVC (FERREIRA, 2011).

Este desequilíbrio resulta na formação de espécies reativas de oxigênio e na oxidação de diferentes moléculas como lipídeos, proteínas e DNA (POLI, 2008). A oxidação destas substâncias causa lesões importantes levando a mudanças na estrutura das células, na sua função e morte celular. As reações de lipoperoxidação ganham destaque na SM pois geram grandes danos da formação e ação da insulina, glicose-6-fosfato desidrogenase e função endotelial (FERREIRA, 2011).

Com o ganho de peso, além da hipertrofia dos adipócitos, com o aumento do seu conteúdo citoplasmático de gordura, também ocorre infiltração de células inflamatórias, como os macrófagos, que também são importantes

geradores de estresse oxidativo (NAMGALADZE, BRÜNE, 2016). O estresse oxidativo sobre o tecido adiposo e a produção de interleucinas, agiontesinogênio, entre outras, é uma das bases fisiopatológicas para o surgimento das outras doenças que compõem a SM (JOHNSON et al, 2016).

No paciente diabético, a hiperglicemia por si só é uma importante fonte de estresse oxidativo. O excesso de glicose no sangue induz a sua própria oxidação com aumento do sorbitol, pela via dos polióis, ativação da proteína quinase C, ativação da via das hexosaminas e a produção de produtos finais de glicação avançados, o que gera uma memória metabólica ruim, devido ao aumento do estresse oxidativo neste grupo de pacientes, e também é a uma via fisiopatológica para o desenvolvimento das complicações causadas pelo diabetes (CERIELLO, IHNAT, THORPE, 2009; YAO, BROWNLEE, 2010).

A disfunção endotelial é uma das possíveis complicações em pacientes com distúrbios metabólicos. Espécies reativas de oxigênio induzem a oxidação da fração do LDL-colesterol e formação de células espumosas, base da fisiopatologia das doenças ateroscleróticas, como IAM e AVC. Pacientes obesos e hipertensos têm aumento na produção de angiotensina-II e endotelina, o que gera um incremento na geração de superóxidos e, conseqüentemente, redução na biodisponibilidade de óxido nítrico, vasoconstrição e aumento na resistência vascular periférica (BAHIA, et al, 2006).

Apesar do seu uso na literatura científica, o IMC não reflete com clareza a relação entre tecido muscular e tecido gorduroso. Recentes estudos discutem novas nomenclaturas devido ao achado de pacientes obesos metabolicamente saudáveis e pacientes magros metabolicamente doente, ou seja, o paradoxo da obesidade (DE LORENZO et al, 2016, BOSSELO, DONATACCIO, CUZZOLARO, 2016). Diante destes achados na avaliação de indivíduos com distúrbios metabólicos, a avaliação dos polimorfismos e o estresse oxidativo surge como uma opção na avaliação dos pacientes de maior risco para o desenvolvimento de complicações cardiovasculares.

2. Objetivos

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar o estresse oxidativo e os polimorfismos em uma população de indivíduos obesos Brasileiros e a sua relação com o grau de obesidade entre estes pacientes de acordo com o IMC e se há diferença nos seus valores entre os grupos de participantes obesos com e sem o diagnóstico de DM2.

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a frequência dos polimorfismos e o sinergismo entre os polimorfismos I/D *ECA* e C677T *MTHFR* em um grupo de indivíduos obesos, com e sem DM2, para avaliar o papel destes como fator de proteção ou de ocorrência;
- Avaliar o estresse oxidativo e a sua relação com a frequência dos polimorfismos I/D *ECA* e C677T *MTHFR*;
- Avaliar o estresse oxidativo e a sua relação com as comorbidades relacionadas a SM (HAS e DLP) e o diagnóstico de doença cardiovascular prévia (IAM e/ou AVC) encontradas nesta população de obesos;
- Avaliar o estresse oxidativo e a sua relação com as complicações microvasculares encontradas no subgrupo de pacientes obesos com diagnóstico de DM2.
- Avaliar o estresse oxidativo e a ação antioxidante das amostras analisadas em relação aos hábitos do sono e o uso da metformina.

3. Casuística e Métodos

3. CASUÍSTICA E MÉTODOS

3,1 Casuística

O grupo de estudo envolveu 125 adultos obesos, sendo 47 diabéticos (grupo DM2) e 78 não diabéticos (grupo controle). Os critérios de inclusão foram: pessoas na faixa etária entre 18 a 65 anos, homens e mulheres com IMC maior ou igual a 30 Kg/m².

Em uma análise descritiva de todos os 125 pacientes com média de idade de 44 anos, 90 (71,4%) são do gênero feminino, 87 (69%) são casados no estado civil e a grande maioria se autodeclarou como sendo da etnia branca (81%) (Tabela 3). Em relação a escolaridade, 43,7% e 35,7% tem o terceiro e segundo grau completo, respectivamente. A maioria dos participantes dormiam de 6 a 8 horas por dia (51,6%) e mais de um terço deles (35,7%) dormiam de 4 a 6 horas por dia.

Tabela 3. Dados demográficos e clínicos dos participantes do estudo; gráfico comparando os grupos com pacientes obesos com diabetes *mellitus* tipo 2 (DM2) e grupo controle de pacientes obesos sem diabetes *mellitus* tipo 2 (controles).

Características	DM2 (n=47)	Controles (n=78)	p value
Idade (média ± DP)	47.8 (8.8)	41.6 (11.5)	0.020 ^c
Masculino [n (%)]	17 (36.2)	19 (24.4)	0.157 ^b
Feminino [n (%)]	30 (63.8)	59 (75.6)	
Caucasianos [n (%)]	39 (83.0)	62 (79.5)	0.631 ^b
Afro-Brasileiros [n (%)]	8 (17.0)	16 (20.5)	
Obesidade grau I (IMC: 30 – 34,99)	23 (48.9)	43 (55.1)	0.416 ^b
Obesidade Grau II (IMC: 35 – 39,99)	13 (27.7)	24 (30.8)	
Obesidade grau III (IMC: ≥ 40)	11 (23.4)	11 (14.1)	
Retinopatia [n (%)]	3 (6.4)	0	< 0.05 ^a
Nefropatia [n (%)] ^a	7 (14.8)	0	< 0.05 ^a
Neuropatia [n (%)] ^a	7 (14.8)	0	< 0.05 ^a
Hipertensão [n (%)] ^b	24 (51.1)	30 (38.5)	0.168 ^b
Dislipidemia [n (%)] ^b	25 (53.2)	12 (15.4)	< 0.05 ^b
Doença cardiovascular [n (%)] ^a	3 (6.4)	1 (1.3)	0.148 ^a

^a teste exato de Fisher

^b teste do chi-quadrado de Person

^c teste do t Student

DP: desvio padrão

Foram considerados diabéticos os indivíduos que apresentavam duas medidas de glicemia de jejum ≥ 126 mg/dL e/ou glicemia 2 horas pós dextrosol 75 gramas ≥ 200 mg/dL e/ou hemoglobina glicada (HbA1c) $\geq 6,5\%$ e/ou glicemia ao acaso ≥ 200 mg/dL na presença de sintomas de hiperglicemia/hipoinsulinemia, segundo os critérios da *American Diabetes Association* (ADA), ou que já estivessem usando alguma medicação para o tratamento do diabetes (metformina, sulfoniluréias, glinidas, inibidor da α -glucosidase, pioglitazona, inibidor da DDP4, agonistas do GLP1, inibidores da SGLT2 e insulina) (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2016). Entre os pacientes diabéticos, também foi analisada a presença de complicações microvasculares como a retinopatia diabética (diagnóstico realizado por

oftalmologista), nefropatia diabética (microalbuminúria, macroalbuminúria ou insuficiência renal crônica) e neuropatia diabética (de acordo com o quadro clínico e exame físico) (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2016).

Investigamos também se os pacientes apresentavam diagnóstico prévio de:

- Hipertensão: pacientes com diagnóstico prévio de HAS em uso de alguma medicação anti hipertensiva ou pela avaliação do nível da pressão arterial sistêmica, através de aferição da mesma com esfigmomanômetro posicionado em membro superior esquerdo, em repouso, de acordo com as normativas da *American Heart Association* (AHA) e a diretriz brasileira de hipertensão (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 2016);
- Dislipidemia: pacientes com diagnóstico prévio de DLP em uso de estatinas e/ou fibratos ou níveis de triglicérides em jejum de 12 horas > 200 mg/dL e/ou avaliação do risco cardiovascular pelo valor dos níveis séricos individuais do LDL-colesterol (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 2013);
- Doença cardiovascular: diagnóstico prévio de IAM e/ou AVC e/ou DAP em acompanhamento com cardiologista, neurologista e cirurgião vascular, respectivamente.

Os pacientes foram selecionados, de acordo com os critérios de inclusão descritos acima, em uma clínica particular de Endocrinologia no município de São José do Rio Preto-SP no período de junho/15 até novembro/15.

3.2 Considerações Éticas

O presente projeto foi registrado sob o número 43467515.5.0000.5466 CAAE (Certificado de Apresentação para Apreciação Ética) com número de comprovante 024866/2015 na Plataforma Brasil e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" Campus de São José do Rio Preto (UNESP/IBILCE) obedecendo aos princípios estabelecidos na Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde (CNS) (Apêndice A).

Após explanação sobre o estudos, seus objetivos e os procedimentos que seriam adotados, todos participantes, junto do pesquisador principal (Flavio

Fontes Pirozzi) preencheram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) e, após isso, preencheram também um questionário sobre dados clínicos, exame físico e perguntas sobre a qualidade do sono, uso de medicações e presença ou ausência de comorbidades (Apêndice B e C).

3.3 Metodologia

3.3.1 Coleta das Amostras

Foram coletados 4 mL de sangue periférico por venopunção de um dos membros superiores de todos os indivíduos e colocados em tubos contendo EDTA 5% para a extração do DNA de leucócitos, entre 8 e 9 horas manhã.

3.3.2 Polimorfismo I/D da ACE

A detecção do polimorfismo inserção/deleção (I/D) de 278 pb (rs1799752) no gene *ACE1* (17q23.3) foi realizado por reação em cadeia da polimerase (PCR) baseado em duas amplificações com *primers* diferentes. A primeira amplificação utilizamos o *primer* ACE1 (sense) 5'CTGGAGACCACTCCCATCCTTTCT3' e a ACE2 (antisense) 5'GATGTGGCCATCACATTCGTCAGAT3' e, como resultado, o fragmento de inserção apresenta 490 pb e de deleção 190 pb. Nesta primeira amplificação, há uma preferência do alelo com inserção amplificar como deleção. Assim, as amostras homozigotas para a deleção passam por uma segunda amplificação para a correta identificação do heterozigoto. Os *primers* utilizados nesta segunda amplificação são o ACE3 (sense) 5'TGGGACCACAGCGCCCGCCACTAC3' e o ACE4 (antisense) 5'TCGCCAGCCCTCCATGCCATAAT3'. O fragmento de inserção amplificado apresenta 355 pb e o de deleção não é amplificado. Ambas as amplificações foram analisadas por eletroforese em gel de agarose a 2,0% sob corrente constante de 80 V por 30 minutos e visualizados sob luz UV após coloração com brometo de etídio.

3.3.3 Polimorfismo C677T da MTHFR

Para o polimorfismo C677T (rs1801133) do gene *MTHFR* utilizamos PCR seguido da restrição de polimorfismo único (RFLP). Para a amplificação, utilizamos o *primer* MTHFR1 (sense) 5'TGAAGGAGAAGGTGTCTGCCG3' e o MTHFR2 (antisense) 5'AGGACGGTGCGGTGAGAGTG3'. A amplificação gerou um fragmento de 198 pb o qual foi digerido pela enzima *Hinf*I (G↓ANTC). A mutação gera um sítio de restrição para a enzima. Portanto, o homocigoto selvagem (CC) apresenta uma banda de 198 pb, o homocigoto mutante (TT) apresenta duas bandas - uma de 175 pb e a outra de 23 pb - e o heterocigoto (CT) apresenta as três bandas, 198 pb, 175 pb e 23 pb. O resultado foi analisado por eletroforese em gel de agarose a 4,0% sob corrente constante de 80 V por 40 minutos e visualizados sob luz UV após coloração com brometo de etídio.

3.3.4 Dosagens bioquímicas para determinação da peroxidação lipídica e capacidade antioxidante total

3.3.4.1 Dosagem das espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

A dosagem das espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) é utilizada para avaliar a peroxidação lipídica das amostras. Este método é baseado na reação do malondialdeído e de outros aldeídos com o ácido tiobarbitúrico (TBA) em pH baixo e temperatura elevada, para formar um complexo com absorção máxima em 535 nm, considerando normal os valores de até 440mg/mL (MIHARA, UCHIYAMA, 1978; PERCARIO et al, 2004)

3.3.4.2 Determinação da capacidade antioxidante em equivalência ao Trolox (TEAC)

A capacidade antioxidante das amostras (TEAC) foi determinada pela sua equivalência ao Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametocromono-2-carboxílico), um antioxidante análogo sintético hidrossolúvel da vitamina E. A técnica colorimétrica é baseada na reação entre o ABTS (2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolínaácido-6-sulfônico-diamônio) com persulfato de potássio

(K₂S₂O₈) que produz o radical cátion ABTS+, cromóforo de coloração verde/azul. A adição das amostras contendo antioxidantes a este radical cátion pré formado o reduz novamente a ABTS e a descoloração é avaliada em 734 nm (MILLER et al, 1993; RE et al, 1999). Os valores de normalidade para este trabalho foram estabelecidos entre 1,85 a 2,31 mM/L.

3.3.5 Análise Estatística

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa R versão 3.2.3 (<http://www.r-project.org>) e SPSS (IBM) e $p < 0,05$ foi considerado significativo. As variáveis quantitativas foram expressas como média \pm desvio padrão e foram testadas para a distribuição normal e de homogeneidade de variâncias. Médias entre os grupos foram comparados pelo teste de t Student e diferenças de proporções foram avaliadas por meio do teste exato de Fisher ou o teste do qui-quadrado de Pearson usando o pacote Rcmdr. Frequências alélicas e genotípicas e desvios de Hardy-Weinberg foram avaliados utilizando o pacote SNPAssoc. Análises de correlação para verificar a associação entre variáveis foram conduzidas pelo método de Spearman. Um modelo de regressão logística binária foi construído para avaliar a associação dos polimorfismos com pacientes com diabetes *mellitus* em diferentes modelos genéticos de herança. O valor de p foi ajustado para covariáveis usando o mesmo modelo de regressão logística por pacote SNPAssoc.

4. RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1 Avaliação Geral e Comparação Entre os Grupos

Em relação ao grau de obesidade pelo IMC, 53,2% apresentam obesidade grau I, 29,4% obesidade grau II e 17,5% obesidade grau III. Dos 125 indivíduos, 47 (37,3%) tinham diagnóstico prévio de DM2. De todos os pacientes obesos com DM2, apenas três (6,3%) não estavam usando metformina em monoterapia ou em associação com outros antidiabéticos orais e/ou insulina. Entre os indivíduos do grupo controle, três (3,8%) fazem uso da metformina devido esteatose hepática e síndrome dos ovários policísticos. De todos os participantes, 54 (42,9%), 37 (29,4%) e 4 (3,2%) tinham diagnóstico prévio de HAS, DLP e DAC, respectivamente.

A Tabela 2 mostra a divisão dos grupos de pacientes obesos com DM2 (grupo DM2) e obesos não diabéticos (grupo controle). O grupo DM2 apresentou média de idade de $47,8 \pm 8,8$ anos e o grupo controle de $41,6 \pm 11,5$ anos, com diferença significativa ($p= 0,02$). Não houve diferença significativa em relação ao gênero, etnia e o grau da obesidade pelo IMC. Apesar da população brasileira ser multiétnica, a maioria dos indivíduos, em ambos os grupos, eram caucasianos.

Em relação ao IMC, não foi encontrada diferença estatística na porcentagem de indivíduos com obesidade grau I, II e III entre o grupo DM2 e o grupo controle ($p= 0,416$). Entretanto, conforme observado na população geral, ambos os grupos apresentam maior proporção de pacientes com obesidade grau I, em comparação com obesidade grau II e III ($p < 0,01$).

Não houve diferença significativa entre os dois grupos quando comparamos o número de indivíduos com hipertensão e doença cardiovascular. Quanto a dislipidemia, o grupo DM2 apresentou maior frequência quando comparado com o grupo controle. Destacamos que, no grupo controle não houve pacientes com retinopatia, nefropatia e neuropatia por outras causas, desta forma o grupo DM2 teve mais pacientes com essas manifestações.

4.2 Análise dos Polimorfismos Genéticos em Relação aos Grupos

Analizamos as frequências genótípicas e alélicas dos polimorfismos analisados nos genes *ECA* e *MTHFR* entre o grupo DM2 e o grupo controle, e não houve diferença estatística significativa para a população estudada (Tabela 4). Além disso, os genótipos dos polimorfismos avaliados não apresentaram chances de ocorrência e nem de proteção para o desenvolvimento de DM2.

Tabela 4. Avaliação dos genótipos e frequências alélicas dos polimorfismos de I/D *ECA* e C677T *MTHFR* entre indivíduos obesos com diabetes *mellitus* tipo 2 (DM2) em comparação com o grupo controle (controles).

Genótipos/Alelos	DM2	Controles	OR (95% IC)	p value
<i>ACE</i> (rs1799752)	(n=45)	(n=75)		
<i>Genótipos</i>				
II	6 (13.3)	9 (12.0)	0.87 (0.27-2.77)	
ID	17 (37.8)	28 (37.3)	0.95 (0.43-2.12)	0.97
DD	22 (48.9)	38 (50.7)	1.00	
<i>Alelos</i>				
I	29 (32.2)	46 (30.7)	0.93 (0.53-1.63)	0.88
D	61 (67.8)	104 (69.3)		
<i>MTHFR</i> (rs1801133)	(n=47)	(n=77)		
<i>Genótipos</i>				
CC	17 (36.2)	30 (39.0)	1.0	
CT	22 (46.8)	38 (49.3)	0.98 (0.44-2.16)	0.71
TT	8 (17.0)	9 (11.7)	0.64 (0.21-1.96)	
<i>Alelos</i>				
C	56 (59.6)	98 (63.6)	0.84 (0.49-1.42)	0.59
T	38 (40.4)	56 (36.4)		

Avaliamos diferentes modelos de herança gênica para verificar o efeito de chance na ocorrência ou proteção do DM2 entre os dois grupos. Os resultados dos diferentes genótipos podem ser observados na Tabela 5 e, de acordo com os achados, nenhum dos modelos de herança analisados (codominância, dominância, recessiva e log aditivo) apresentam influência no desenvolvimento do DM2 em pacientes obesos.

Tabela 5. Análise da associação de DM2 com os polimorfismos I/D ECA e C677T MTHFR em diferentes modelos de heranças.

Modelos	Genótipo	DM2	Controles	OR (95% IC)	p value
<i>ACE (rs1799752)</i>		n=45	n=75		
Codominante	II	6 (13.3)	9 (12.0)	0.87 (0.27-2.77)	0.97
	ID	17 (37.8)	28 (37.3)	0.95 (0.43-2.12)	
	DD	22 (48.9)	38 (50.7)	1.00	
Dominante	DD	22 (48.9)	38 (50.7)	1.00	0.85
	ID-II	23 (51.1)	37 (49.3)	0.93 (0.44-1.95)	
Recessiva	II	6 (13.3)	9 (12.0)	1.00	0.83
	DD-ID	39 (86.7)	66 (88.0)	0.89 (0.29-2.68)	
Log aditivo	-----	-----	-----	0.94 (0.55-1.59)	0.81
<i>MTHFR (rs1801133)</i>		n=47	n=77		
Codominante	CC	17 (36.2)	30 (39.0)	1.0	0.71
	CT	22 (46.8)	38 (49.4)	0.98 (0.44-2.16)	
	TT	8 (17.0)	9 (11.7)	0.64 (0.21-1.96)	
Dominante	CC	17 (36.2)	30 (39.0)	1.0	0.76
	CT-TT	30 (63.8)	47 (61.0)	0.89 (0.42-1.88)	
Recessivo	TT	8 (17.0)	9 (11.7)	0.65 (0.23-1.81)	0.41
	CC-TT	39 (83.0)	68 (88.3)	1.00	
Log aditivo	-----	-----	-----	0.84 (0.49-1.43)	0.52

Com o intuito de avaliar o sinergismo dos polimorfismos na chance de ocorrência ou de proteção do DM2, foi avaliado diferentes combinações dos polimorfismos entre os grupos DM2 e controle. Diante das análises demonstradas (Tabela 6), não foi encontrado diferença significativa em nenhuma combinação de polimorfismos.

Tabela 6. Análise de associação de diabetes *mellitus* tipo 2 (DM2) com a combinação de polimorfismos (sinergismo entre I/D *ECA* e C677T *MTHFR*).

Combinação	DM2 (n=45)	Controles (n=74)	OR (95% IC)	p value
DD/CC	8 (17.8)	15 (20.3)	0.85 (0.33-2.20)	0.74
DD/CT	12 (26.7)	18 (24.3)	1.13 (0.48-2.64)	0.77
DD/TT	2 (4.4)	5 (6.8)	0.64 (0.12-3.45)	0.63
ID/CC	7 (15.6)	9 (12.2)	1.31 (0.45-3.86)	0.59
ID/CT	7 (15.6)	15 (20.3)	0.72 (0.27-1.94)	0.52
ID/TT	3 (8.8)	3 (3.5)	2.46 (0.51-13.81)	0.35
II/CC	1 (2.2)	5 (6.8)	0.31 (0.03-2.77)	0.41
II/CT	2 (4.5)	3 (4.0)	1.14 (0.18-7.12)	0.89
II/TT	3 (36.2)	1 (39.0)	5.2 (0.53-51.74)	0.15

Analisando somente o grupo de pacientes com DM2, não encontramos diferença estatística significativa entre os polimorfismos nos genes *ECA* e *MTHFR* em relação a presença ou ausência de complicações microvasculares (retinopatia, nefropatia e neuropatia diabética), apesar de termos uma amostra pequena de indivíduos com estas comorbidades, e outras doenças relacionadas com a síndrome metabólica como a hipertensão, dislipidemia e doenças cardiovasculares.

Os dados gerais e análise dos grupos em relação a ambos os polimorfismos foram mostrados no Exame Geral de Qualificação do Mestrado, no dia 23/05/15. Análise submetida ao periódico 'Archives of Endocrinology and Metabolism' da Sociedade Brasileira de Endocrinologia e Metabologia e aguardando avaliação dos revisores (Apêndice D).

4.3 Análise dos Grupos em Relação ao Estresse Oxidativo

Em uma análise de correlação de Spearman entre o grau de obesidade pelo IMC e o estresse oxidativo encontramos uma correlação forte e diretamente proporcional com o TBARS ($r = 0,7941$) e moderada e inversamente proporcional com o TEAC ($r = -0,6022$), ambos significativos ($p < 0,0001$). Em uma análise comparativa entre os grupos DM2 e controle com o valor médio do TBARS (262,60 x 281,97, $p = 0,305$) e do TEAC (2,50 x 2,42, $p = 0,234$), não foi encontrado diferença significativa.

Foi realizado uma análise estatística pelo teste do qui-quadrado em relação as provas de estresse oxidativo e os polimorfismos I/D *ECA* e C677T *MTHRF*. No polimorfismo I/D *ECA*, encontramos uma diferença significativa para o genótipo DD, genótipo mais frequente em ambos os grupos e com maior risco para eventos cardiovasculares (LEI t al, 2012), em comparação aos outros genótipos, para os valores do TBARS ($p = 0,04$) e TEAC ($p < 0,0001$). Em relação ao polimorfismo C677T *MTHRF* e a presença do homozigoto mutante (TT), não encontramos diferença significativa para os valores de TBARS ($p = 0,51$) e TEAC ($p = 0,46$).

Realizamos uma análise com teste de qui-quadrado de Pearson com a prova de estresse oxidativo pelo TBARS e sua associação com o diagnóstico de HAS, DLP e DAC e não encontramos significância ($p = 0,629$, $p = 0,827$ e $p = 0,649$, respectivamente). Realizamos a mesma análise com a prova de estresse oxidativo, o TEAC, e sua associação com o diagnóstico de HAS, DLP e DAC e novamente não encontramos diferença significativa ($p = 0,150$, $p = 0,557$ e $p = 1,000$, respectivamente).

Também realizamos uma análise com teste de qui-quadrado de Pearson com a prova de estresse oxidativo pelo TBARS e sua relação com o diagnóstico de retinopatia, nefropatia e neuropatia entre os indivíduos do grupo DM2 e não encontramos diferença significativa ($p = 0,640$, $p = 0,454$ e $p = 0,454$, respectivamente). Realizamos a mesma análise com a prova de estresse oxidativo pelo TEAC e sua relação com as mesmas complicações microvasculares e novamente não encontramos diferença significativa ($p = 0,525$, $p = 0,727$ e $p = 0,638$, respectivamente)

Estudos mostram uma relação inversa com o tempo de sono e o grau da obesidade (CIZZA, REQUENA, DE JONGE, 2011; CRISPIM et al, 2007). Avaliamos o estresse oxidativo em relação ao tempo de sono relatado pelos participantes no questionário inicial (Apêndice C). Em uma correlação de Spearman do tempo de sono com o IMC, TBARS e TEAC, não encontramos diferença significativa ($p = 0,834/r = -0,01$, $p = 0,32/r = 0,08$ e $p = 0,20/r = 0,11$, respectivamente). Em uma análise estatística por qui-quadrado de Pearson entre os indivíduos que fazem uso da metformina, em ambos os grupos, com as provas de estresse oxidativo não encontramos significância para análise com o TBARS ($p = 0,837$) e TEAC ($p = 0,854$).

5- Discussão

5. DISCUSSÃO

A obesidade e o DM2 são importantes epidemias do século XXI. A principal estratégia de prevenção e tratamento é a mudança do estilo de vida, com adoção de bons hábitos alimentares e prática regular de atividade física. Apesar da sua importância e da magnitude das campanhas em relação a essas condutas saudáveis, a prevalência da obesidade e do DM2 continuam aumentando perigosamente (NCR RISK FACTOR COLLABORATION, 2016; INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION, 2015).

Se por um lado, as melhorias no campo da saúde trouxeram aumento na expectativa de vida e diminuição no número de indivíduos com baixo peso, por outro lado notamos um importante aumento na frequência de indivíduos com sobrepeso e obesidade, em todas as faixas etárias (NCR RISK FACTOR COLLABORATION, 2016). Dados brasileiros mostram que mais da metade da população adulta brasileira está acima do peso (sobrepeso e obesidade). Porém, é entre as crianças e adolescentes que identificamos o maior problema. Nesta faixa etária, na últimas duas décadas, dobramos o número de indivíduos que estão acima do peso e houve um aumento de 300% de crianças e adolescentes obesos (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA PARA O ESTUDO DA OBESIDADE E SÍNDROME METABÓLICA, 2016). De forma diretamente proporcional, o aumento da prevalência da obesidade acarreta no aumento da prevalência do DM2. No início deste século, dados estatísticos previam que teríamos mais de 360 milhões de pacientes diabéticos no mundo (INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION, 2015; SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2016). Com metade deste tempo percorrido, já ultrapassamos esta marca em 50 milhões.

Além das formas tradicionais de prevenção para os problemas metabólicos, novos conceitos vem sendo estudados como os hábitos relacionados ao sono (CIZZA, REQUENA, DE JONGE, 2011). Estudo mostra uma relação inversa entre o tempo de sono com o aumento do peso e o desenvolvimento de doenças metabólicas (CRISPIM et al, 2007). Trabalhadores noturnos, que invertem o ciclo sono-vigília estão mais propensos ao surgimento de doenças como a obesidade e o DM2 (FROY,

2010). Estudo que relaciona imagens noturnas de satélite e dados epidemiológicos da obesidade mostram que locais mais iluminados no período da noite estão associados com maior prevalência de obesidade (RYBNIKOVA, HAIM, PORTNOV, 2016). Recente pesquisa com adolescentes brasileiros mostra uma piora no perfil metabólico dos participantes que dormiam menos, independente do IMC destes indivíduos (DE BERNARDI RODRIGUES et al, 2016). Como nova medida preventiva, a adoção de uma boa higiene do sono, dormir no tempo recomendado e evitar a exposição a iluminação no período noturno parecem ser medidas importantes a serem tomadas.

Em uma análise geral entre dois grupos de indivíduos com obesidade, com e sem o diagnóstico de DM2, sem diferença significativa em relação ao gênero, etnia e o IMC, os pacientes obesos com DM2 apresentam maior média na idade ($p = 0,02$) e maior prevalência no diagnóstico de DLP ($p < 0,05$). Em relação ao diagnóstico prévio de HAS e DCV, não encontramos diferença significativa

O papel da genética com a obesidade e o DM2 não está muito bem estabelecido. A história familiar destes problemas metabólicos em parentes de primeiro grau são importantes fatores de risco para o desenvolvimento destas doenças. No DM2 em humanos, por exemplo, estima-se a participação de cerca de 150 genes (PERSAUD, JONES, 2016). Porém, diferente de outras nacionalidades, a população brasileira apresenta como peculiaridade o fato de ser multiétnica e isso, por vezes, dificulta a avaliação genética para estas doenças. No presente estudo, fizemos uma análise entre grupos de indivíduos obesos, com e sem o diagnóstico de DM2, e a sua relação com os polimorfismos I/D *ECA* e C677T *MTHRF*. Estudos anteriores brasileiros analisaram estes polimorfismos em pacientes diabéticos sem considerar a sua presença associada com a fisiopatogênese do DM2 (COSTA et al, 2002; MELLO et al, 2012). Na nossa análise, a presença destes polimorfismos não apresentaram chance nem de proteção e nem de ocorrência para o surgimento do DM2. Avaliando as heranças alélicas de ambos os polimorfismos, também não encontramos diferença significativa para o desenvolvimento do DM2. Apesar de alguns trabalhos estrangeiros mostrarem o papel do sinergismo dos polimorfismos I/D *ECA* e C677T *MTHRF* na gênese do DM2, também não encontramos a chance de ocorrência e proteção deste sinergismo para o

surgimento desta doença. Pesquisa internacional, avaliando o polimorfismo I/D *ECA* e sua associação com o desenvolvimento do DM2 não achou diferença significativa entre os participantes da etnia caucasiana. Ressaltamos que, na nossa análise, ambos os grupos, a maioria dos participantes (80,8%) se auto declaram caucasianos.

Pesquisas relacionam a associação destes mesmos polimorfismos e a presença de complicações microvasculares (retinopatia, nefropatia e neuropatia) e macrovasculares (IAM, AVC e DAP) (MA, YU, WANG, 2015; WU et al, 2016). No grupo de indivíduos obesos com DM2, avaliamos os polimorfismos I/D *ECA* e C677T *MTHFR* com o diagnósticos associado de complicações microvasculares e não encontramos diferença significativa. Também avaliamos estes mesmos polimorfismos, em ambos os grupos, e a associação com HAS, DLP e DCV e, novamente, não encontramos grau de significância. Porém, ressaltamos um número muito pequeno de indivíduos com história prévia de DCV o que limita a avaliação estatística.

Estudo aponta para um maior risco de DCV em indivíduos com DM2 na presença do alelo D na análise do gene da *ECA* (LEI et al, 2012) Outra pesquisa mostra um maior risco de DCV, menor circulação colateral coronariana e pior condicionamento isquêmico na presença do genótipo DD analisando o mesmo polimorfismo (CEYHAN et al, 2012). Na nossa amostra, encontramos maior frequência alélica D e do genótipo DD em ambos os grupos e sem diferença significativa. Com estes dados, em uma análise secundária desta presente pesquisa, concluímos que a obesidade parece ter uma relação mais importante do que o DM2 com a DCV.

Em uma análise comparando o estresse oxidativo com o grau da obesidade pelo IMC encontramos uma importante correlação diretamente proporcional com o TBARS e inversamente proporcional com o TEAC. Porém, não encontramos diferença significativa entre os valores de TBARS e de TEAC entre os grupos DM2 e controle. Apesar das críticas a classificação da obesidade pelo IMC, o presente estudo mostra uma importante relação do grau de inflamação quanto pior o grau da obesidade por esta classificação e não houve uma diferença desta análise com a presença ou ausência do diagnóstico de DM2 entre indivíduos obesos.

Fazendo uma avaliação dos polimorfismos I/D *ECA* e C677T *MTHRF* e o estresse oxidativo, encontramos significância da relação entre o alelo DD do gene da *ECA* com TBARS e o TEAC. O mesmo não acontece na avaliação do gene *MTHRF* com o seu homozigoto mutante TT. Novamente, este achado vem de encontro com a descrição da literatura da associação da frequência alélica D e do genótipo DD com maior risco para o surgimento de DCV (LEI et al, 2012; CEYHAN et al, 2012).

Realizamos uma análise estatística para avaliar o estresse oxidativo pelo TBARS e o TEAC com o diagnóstico de HAS, DLP e DCV, em ambos os grupos, e a presença de complicações microvasculares no grupo de indivíduos obesos com DM2, e não encontramos diferença significativa. O surgimento destas doenças e complicações relacionadas com a obesidade e o DM2 tem diversos outros fatores (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2016) e estas provas de inflamação não foram eficazes para avaliar a gravidade destes indivíduos. Em ambos os grupos, a mesma análise foi feita para avaliar as mesmas provas de estresse oxidativo com o tempo de sono e também com o uso da metformina e, novamente, não encontramos diferença significativa. Apesar do tempo de sono ter uma importante relação metabólica no peso e no controle da glicemia não encontramos uma relação eficiente entre a quantidade de horas dormidas com os resultados analisados pelo TBARS, TEAC e o grau da obesidade pelo IMC. A metformina, principal e primeira escolha no tratamento do DM2, também usadas para outras doenças associadas a resistência insulínica, (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2016) não se mostrou eficaz em reduzir o estresse oxidativo analisado através dessas provas inflamatórias.

Em relação a etnia, por apresentar uma população extremamente miscigenada, a análise genética dos polimorfismos I/D *ECA* e C677T *MTHRF* para avaliar o risco de desenvolvimento do DM2, em um grupo de adultos obesos brasileiros, não mostrou-se efetiva. Estudos recentes apontam para outros polimorfismos mais relevantes, como no gene *TCF7L2* e *FTO*, que não foram avaliados neste presente estudo (LESLIE et al, 2016; ABBAS et al, 2013). Na avaliação do estresse oxidativo foi notado uma importante correlação com o grau da obesidade o que valida o IMC como um importante instrumento para predizer risco cardiovascular aos indivíduos obesos. Fazendo uma relação

entre o polimorfismo I/D *ECA*, TBARS e TEAC para a presença do genótipo DD encontramos uma piora do estresse oxidativo. O mesmo genótipo tem uma importante relação com um maior risco para o surgimento de DCV (LEI et al, 2012; CEYHAN et al, 2012). Na avaliação deste polimorfismo entre os grupos DM2 e controle, não encontramos diferença significativa o que implica, em uma análise secundária, que a obesidade teria um impacto maior do que o DM2 e o risco cardiovascular.

6- Conclusões

6- CONCLUSÕES

A partir do desenvolvimento do presente estudo é possível concluir que:

- A obesidade, analisada através do IMC, analisando os grupos DM2 e controle, apresentou importante relação com o estresse oxidativo sendo diretamente proporcional ao TBARS e inversamente proporcional ao TEAC. Porém, comparando entre os grupos DM2 e controle, não há diferença significativa entre os valores médios destas duas provas de estresse oxidativo.
- Não existe correlação entre os grupos e os polimorfismos I/D *ECA* e C677T *MTHRF* para ocorrência e proteção, em relação ao DM2. Entretanto, existem associações significativas entre o estresse oxidativo e o polimorfismo I/D *ECA* com a presença do genótipo DD.
- Na análise entre as provas de estresse oxidativo e o polimorfismo I/D *ECA* com a presença do genótipo DD, nota-se uma diferença significativa para os valores de TBARS e TEAC. Na mesma análise para o polimorfismo C677T *MTHRF* com a presença do homozigoto mutante TT, não encontramos este mesmo achado.
- Na avaliação do estresse oxidativo pelo TBARS e TEAC e a presença de comorbidades (HAS, DLP e DAC), entre ambos os grupos, não há diferença significativa.
- No subgrupo de pacientes obesos com DM2 e sua relação entre o estresse oxidativo pelo TBARS e TEAC e a presença de complicações microvasculares (retinopatia, nefropatia e neuropatia), não foi possível determinar uma relação.
- Comparando os grupo DM2 e o grupo controle, relacionando os hábitos de sono pelo tempo de sono durante a noite (duração do sono auto reportado no questionário inicial - anexo 3) e as provas de estresse oxidativo pelo TBARS e TEAC, não há diferença significativa. Analisando o tempo de sono e o grau da obesidade pelo IMC não encontramos diferença significativa. Também não encontramos grau de significância entre o uso da metformina e as provas de estresse oxidativo pelo TBARS e TEAC, analisando ambos os grupos.

Sumarizando, não encontramos diferença significativa entre os polimorfismos I/D *ECA* e C677T *MTHFR* entre os grupos mas notamos uma importante relação do estresse oxidativo com o IMC e a presença do genótipo DD. Apesar deste genótipo estar relacionado com o aumento do risco cardiovascular em pacientes com DM2, não encontramos diferença na avaliação do genótipo DD entre os indivíduos obesos com e sem diabetes. Este achado sugere que o risco cardiovascular nesta população é independente do diagnóstico de DM2 neste grupo de obesos Brasileiros e a correlação do TBARS e do TEAC com o IMC mostra que a obesidade é um importante fator de risco para o surgimento de doenças cardiovasculares.

REFERÊNCIAS

- Abbas S, Raza ST, Ahmed F, Ahmad A, Risvi A, Mahdi F. **Association of genetic polymorphism of PPAR γ -2, ACE, MTHFR, FABP-2 and FTO genes in risk prediction of type 2 diabetes mellitus.** J Biomed Sci 2013; 20:80
- Acosta JR, Douagi I, Andersson DP, Bächdahl J, Rydén M, Arner P, Laurencikiene J. **Increased fat cell size: a major phenotype of subcutaneous white adipose tissue in non-obese individuals with type 2 diabetes.** Diabetologia 2016; 59(3): 560-570.
- Al-Harbi EM, Farid EM, Gumaa KA, Darwish AH, Alenizi M, Singh J. **Genetic combination of angiotensin-converting enzyme with methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms and the risk of type 2 diabetes mellitus in Bahrain.** J Renin Angiotensin Aldosterone Syst 2015; 16(1): 172-177.
- American Diabetes Association. **Approaches to glycemic treatment.** Diabetes Care 2016; 39(Suppl1): S52-S59.
- American Diabetes Association. **Classification and diagnosis of diabetes.** Diabetes Care 2016; 39(Suppl1); S13-S22.
- Apovian CM, Garvey WT, Ryan DH. **Challenging obesity: patient, provider, and expert perspectives on the roles of available and emerging nonsurgical therapies.** Obesity (Silver Spring) 2015; 23(Suppl 2); S1-S26.
- Associação Brasileira para o Estudo da Obesidade e Síndrome Metabólica. **Diretrizes Brasileiras de Obesidade 2016.** ABESO; 4a. ed., 2016.
- Bahia L, de Aguiar LG, Villela NR, et al. **The endothelium in the metabolic syndrome.** Arq Bras Endocrinol Metab 2006; 50(2): 291-303.
- Batterham RL, Cummings DE. **Mechanisms of diabetes improvement following bariatric/metabolic surgery.** Diabetes care 2016; 39: 893-901.
- Bhupathiraju SN, Hu FB. **Epidemiology of obesity and diabetes and their cardiovascular complications.** Circ Res 2016; 118(11): 1723-1735.

Bosello O, Donataccio MP, Cuzzolaro M. **Obesity or obesities? Controversies on the association between body mass index and premature mortality.** Eat Weight Disord 2016; 21(2): 165-174.

Bray GA. **The epidemic of obesity and changes in food intake: the fluoride hypothesis.** Physiology & Behavior 2004; 82: 115-121.

Ceriello A, Inhat MA, Thorpe JE. **The "metabolic memory": is more than just tight glucose control necessary to prevent diabetic complications?** J Clin Endocrinol Metab 2009; 94: 410-415.

Ceyhan K, Kadi H, Celik A, Burucu T, Koc F, Sogut E, Sahin S, Onalan O. **Angiotensin-converting enzyme DD polymorphism is associated with poor coronary collateral circulation in patients with coronary artery disease.** J Investig Med 2012; 60(1): 49-55.

Chawla A, Chawla R, Jaqqi S. **Microvascular and macrovascular complications in diabetes mellitus: distinct or continuum?** Indian J Endocrinol Metab 2016; 20(4): 546-551.

Cizza G, Requena M, Galli G, de Jonge L. **Chronic sleep deprivation and seasonality: implications for the obesity epidemic.** J Endocrinol Invest 2011; 34(10): 793-800.

Costa LA, Canani LH, Maia AL, Gross JL. **The ACE insertion/deletion polymorphism is not associated with the metabolic syndrome (WHO Definition) in Brazilian type 2 diabetic patients.** Diabetes Care 2002; 25(12): 2365-2366.

Crispim CA, Zalcman I, Dattilo M, Padilha HG, Tufik S, de Mello MT. **Relação entre sono e obesidade: uma revisão da literatura.** Arq Bras Endocrinol Metab 2007; 51(7): 1041-1049.

Daimon M, Oizumi T, Saitoh T, Kameda W, Hirata A, Yamaguchi H, Ohnuma H, Igarashi M, Tominaga M, Kato T. **The D allele of the angiotensin-converting enzyme insertion/deletion (I/D) polymorphism is a risk factor for type 2 diabetes in a population-based Japanese sample.** Endocrine J 2003; 50(4): 393-398.

De Bernardi Rodrigues AM, da Silva C de C, Vasques AC, Camilo DF, Barreiro F, Cassani RS, Zambon MP, Antonio MA, Geloneze B; Brazilian Metabolic Syndrome Study (BRAMS) Investigators. **Association of sleep deprivation with reduction in insulin sensitivity as assessed by the hyperglycemic clamp technique in adolescents.** JAMA Pediatr 2016; 170(5): 487-494.

De Lorenzo A, Soldati L, Sarlo F, Calvani M, Di Lorenzo N, Di Renzo L. **New obesity classification criteria as a tool for bariatric surgery indication.** World J Gastroenterol 2016; 22(2): 681-703.

Faria AM, Mancini MC, de Melo ME, Cercato C, Halpern A. **Progressos recentes e novas perspectivas em farmacoterapia da obesidade.** Arq Bras Endocrinol metab 2010; 54(6): 516-526.

Ferreira AL, Correa CR, Freire CM, Moreira PL, Berchieri-Ronchi CB, Reis RS, Nogueira CR. **Síndrome metabólica: atualização de critérios diagnósticos e impacto do estresse oxidativo na patogênese.** Rev Bras Clin Med 2011; 9(1): 54-61.

Froy O. **Metabolism and circadian rhythms - implications for obesity.** Endocrine Reviews 2010; 31: 1-24.

Grün F. **Obesogens.** Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes 2010; 17: 453-459.

Gurnani M, Birken C, Hamilton J. **Childhood obesity: causes, consequences and management.** Pediatr Clin North Am 2015; 62(4): 821-840.

Hinney A, Hebebrand J. **Polygenic obesity in humans.** Obes Facts 2008; 1(1): 35-42.

International Diabetes Federation. **IDF Diabetes Atlas.** International Diabetes Federation; 7 ed, 2015.

Johnson AR, Wilkerson MD, Sampey BP, Troester MA, Hayes DN, Makowski L. **Cafeteria diet-induced obesity causes oxidative damage in white adipose.** Biochem Biophys Res Commun 2016; 473(2): 545-550.

Kranendonk ME, Van Herwaarden JA, Stupkova T et al. **Inflammatory characteristics of distinct abdominal adipose tissue depot relate differently to**

metabolic risk factors of cardiovascular disease: distinct fat depots and vascular risk factors. *Atherosclerosis* 2015; 239(2): 419-427.

Kim JY, DeMenna JT, Puppala S, Chittoor G, Schneider J, Duggirala R, Mandarino LJ, Shaibi GQ, Colleta DK. **Physical activity and FTO genotype by physical activity interactive influences on obesity.** *BMC Genet* 2016; 17:47. doi: 10.1186/s12863-016-0357-6.

Khodaeian M, Enayati S, Tabatabaei-Malazy O, Amoli MM. **Association between genetic variants and diabetes mellitus in Iranian populations: a systematic review of observational studies.** *J Diabetes Res* 2015; 2015:585917. doi: 10.1155/2015/585917.

Lei HP, Chen HM, Zhong ZL, Yao QZ, Tan HH, Yang M, Lin QX, Shan ZX, Zheng ZW, Zhu JN, Zhou ZL, Lin SG, Yu XY. **Association between polymorphisms of the renin-angiotensin system and coronary disease in Chinese patients with type 2 diabetes.** *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* 2012; 13(2): 305-313.

Leslie RD, Palmer J, Schloot NC, Lernmark A. **Diabetes at the crossroads: relevance of disease classification to pathophysiology and treatment.** *Diabetologia* 2016; 59(1): 13-20.

Lopomo M, Burgio E, Migliore L. **Epigenetics of obesity.** *Prog Mol Biol Transl Sci* 2016; 140: 151-184.

Luo S, Wang F, Shi C, Wu Z. **A meta-analysis of association between methylenetetrahydrofolate reductase gene (MTHFR) polymorphism and diabetic retinopathy.** *Int J Environ Res Public Health* 2016; 13(8). pii: E806. doi: 10.3390/ijerph13080806.

Ma H, Yu C, Wang R. **Association of ACE polymorphism and diabetic nephropathy susceptibility.** *Int J Clin Exp Med* 2015; 8(2): 2962-2965.

Mello AL, Cunha SF, Fross-Freitas MC, Vannucchi H. **Evaluation of plasma homocysteine level according to the C677T and A1298C polymorphism of the enzyme MTHFR in type 2 diabetic adults.** *Arq Brasil Endocrinol Metab* 2012; 56(7): 429-434.

- Mihara M, Uchiyama M. **Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test.** Analytical Biochemistry 1978; 86: 271-278.
- Miller NJ, Rice-Evans C, Davies MJ, Gopinathan V, Milner A. **A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates.** Clin Sci (Lond) 1993; 84(4): 407-412.
- Moraes AS, Freitas ICM, Gimeno SGA, Mondini L. **Prevalência de diabetes mellitus e identificação de fatores associados em adultos residentes em área urbana de Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil 2006: Projeto OBEDIARP.** Cad Saúde Pública 2010; 26(5): 929-941.
- Mozaffarian D. **Dietary and policy priorities for cardiovascular disease, diabetes, and obesity: a comprehensive review.** Circulation 2016; 133(2): 187-225.
- Namgaladze D, Brüne B. **Macrophage fatty oxidation and its role in macrophage polarization and fatty acid-induced inflammation.** Biochim Biophys Acta 2016; 1861(11): 1796-1807.
- NCD Risk Factor Collaboration (NCD-RisC). **Trends in adult body-mass index in 200 countries from 1975 to 2014: a pooled analysis of 1698 population-based measurement studies with 19,2 million participants.** Lancet 2016; 387: 1377-1396
- Percario S et al. **Dosagem do malonaldeído (TBARS).** Newlabs 2004; 6: 46-50.
- Persaud SJ, Jones PM. **A wake-up call for type 2 diabetes?** N Engl J Med 2016; 375(11): 1090-1092.
- Poli G, Schaur RJ, Siems WG et al. **4-hydroxynonenal: a membrane lipid oxidation product of medicinal interest.** Med Res Rev 2008; 28(4): 569-631.
- Pontelli RC, Nunes AA, de Oliveira SV. **Impact of human health of endocrine disruptors present in environmental water bodies: is there an association with obesity?** Cienc Saude Colet 2016; 21(3): 753-766.
- Re R et al. **Antioxidant capacity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay.** Free Radical Biology & Medicine 1999; 26: 1231-2137.

Ribnikova NA, Haim A, Portnov BA. **Does artificial light-at-night (ALAN) exposure contribute to the worldwide obesity pandemic?** Int J Obes (Lond) 2016; 40(5): 815-823.

Sociedade Brasileira de Cardiologia. **VII Diretriz Brasileira de Hipertensão Arterial.** Arq Bras Cardiol 2016; 107(3): 1-83.

Sociedade Brasileira de Cardiologia. **V Diretriz Brasileira de Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose.** Arq Bras Cardiol 2013; 101(4): 1-20.

Sociedade Brasileira de Diabetes. **Diretrizes da Sociedade Brasileira 2015/2016.** A.C. Farmacêutica 2016.

Wu S, Han Y, Hu Q, Zhang X, Cui G, Li Z, Guan Y. **Effects of common polymorphisms in the MTHFR and ACE genes on diabetic peripheral neuropathy progression: a meta-analysis.** Mol Neurobiol 2016; mar 2016; DOI: 10.1007/s12035.016-9823-4.

Yako YY, Guewo-Fokeng M, Balti EV, Bouatia-Naji N, Matsha TE, Sobngwi E, Erasmus RT, Echouffo-Tcheugui JB, Kengne AP. **Genetic risk of type 2 diabetes in populations of the Africa continent: a systematic review and meta-analyses.** Diabetes Pract Clin Pract 2016, 114:135-50. doi: 10.1016/j.diabres.2016.01.003.

Yao D, Brownlee M. **Hyperglycemia-induced reactive oxygen species increase expression of the receptor for advanced glycation end products (RAGES) and RAGE ligands.** Diabetes 2010; 59(1): 249-255.

APÊNDICE A - CEP

UNESP - INSTITUTO DE
BIOCIÊNCIAS LETRAS E
CIÊNCIAS EXATAS/ CAMPUS



COMPROVANTE DE ENVIO DO PROJETO

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Relação entre o índice de massa corpórea, diabetes mellitus tipo 2, níveis séricos de melatonina e polimorfismos nos genes da enzima conversora de angiotensina (ACE1) e metileno tetrahydrofolato redutase (MTHRF)

Pesquisador: Flavio Pirozzi

Versão: 3

CAAE: 43467515.5.0000.5466

Instituição Proponente: Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas/ Campus de São José do Rio Preto

DADOS DO COMPROVANTE

Número do Comprovante: 024866/2015

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

Informamos que o projeto Relação entre o índice de massa corpórea, diabetes mellitus tipo 2, níveis séricos de melatonina e polimorfismos nos genes da enzima conversora de angiotensina (ACE1) e metileno tetrahydrofolato redutase (MTHRF) que tem como pesquisador responsável Flavio Pirozzi, foi recebido para análise ética no CEP UNESP - Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas/ Campus de São José do Rio Preto/IBILCE em 31/03/2015 às 14:02.

Endereço: CRISTOVAO COLOMBO 2265

Bairro: JARDIM NAZARETH

CEP: 15.054-000

UF: SP

Município: SAO JOSE DO RIO PRETO

Telefone: (17)3221-2428

Fax: (17)3221-2500

E-mail: liliane@ibilce.unesp.br

APÊNDICE B - TCLE

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - TCLE

(Conselho Nacional de Saúde, Resolução 466/2012)

Você está sendo convidado a participar como voluntário do projeto de pesquisa **“Relação entre o índice de massa corpórea, diabetes *mellitus* tipo 2, níveis séricos de melatonina e polimorfismos nos genes da enzima conversora de angiotensina (*ACE1*) e metileno tetrahidrofolato redutase (*MTHFR*)”** sob responsabilidade do pesquisador Flavio Fontes Pirozzi. O estudo será realizado com amostras de sangue para avaliação dos níveis sanguíneos do hormônio melatonina e de alterações em dois genes relacionados ao diabetes. Haverá um risco mínimo para saúde física caracterizado por dor e hematoma no local da coleta de sangue que poderá ser amenizado com compressa gelada logo após a coleta do exame e/ou medicações analgésicas, posteriormente. Você poderá consultar o pesquisador responsável em qualquer época, pessoalmente ou pelo telefone, para esclarecimento de qualquer dúvida. Você está livre para, a qualquer momento, deixar de participar da pesquisa. Todas as informações por você fornecidas e os resultados obtidos serão mantidos em sigilo e, estes últimos só serão utilizados, em conjunto, para divulgação em reuniões e revistas científicas. Você será informado de todos os resultados obtidos, independentemente do fato destes poderem mudar seu consentimento em participar da pesquisa. Você não terá quaisquer benefícios ou direitos financeiros sobre os eventuais resultados decorrentes da pesquisa. Este estudo é importante porque seus resultados fornecerão informações para investigar novas causas para obesidade e suas complicações, como o diabetes mellitus tipo 2 e suas complicações microvasculares, e poderá fornecer novas formas de tratamento para essas doenças. O material biológico cedido será armazenado e você poderá ser chamado para dar a sua autorização para uso em novo(s) projeto(s). Caso isso seja impossível, seu material biológico somente será utilizado mediante aprovação pelo CEP ou pela CONEP, em cumprimento à Resolução do CNS vigente. Diante dessas explicações, se você concorda em participar deste projeto, coloque sua assinatura a seguir e forneça os dados solicitados.

Nome: _____ R.G. _____

Endereço: _____ Fone: _____

_____, _____ de _____ de 2015

Usuário ou responsável legal

Pesquisador(a) responsável

OBS.: Termo apresenta duas vias, uma destinada ao usuário ou seu representante e a outra ao pesquisador

Nome Pesquisador(a): Flavio Fontes Pirozzi	Cargo/Função: Médico
Instituição: Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" - Campus de São José do Rio Preto/SP - UNESP/IBILCE	
Endereço: rua Cristovão Colombo, n 2265, Jardim Nazareth, CEP 15054-000, São José do Rio Preto/SP, fone: (17) 3221.2000	
Projeto submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa do IBILCE/UNESP	
São José do Rio Preto – fone 17-3221.2428/2563 e 3221.2482	

APÊNDICE C - Questionário**Questionário:**

1- nome/número

2- data de nascimento: / / (idade atual = anos)

3- gênero: masculino () / feminino ()

4- raça: branca () / pardo () / negra ()

5- escolaridade: estudo fundamental () / estudo médio () / estudo superior ()

- completo () / incompleto ()

6- estado civil: solteiro () / casado () / viúvo ()

7- tem algum distúrbio do sono? sim () / não (); se sim,
qual(is)_____

8 - faz uso contínuo ou esporádico de alguma medicação da classe dos benzodiazepínicos ou indutores do sono ? sim () / não (); se sim, qual(is)? _____

9- tem o hábito de assistir TV ou manipular celulares/smartphone/tablets no período da noite? sim () / não ()

10- tempo total de sono: 4-6 horas () / 6-8 horas () / mais de 8 horas ()

11- faz uso de alguma medicação que possa interferir na qualidade do sono ? sim () / não ()- se sim qual(is) e dose:

12- faz uso de algum antidiabético oral? sim () / não ()

- se sim, qual(is) e dose:

() metformina: _____

() sulfoniluréia: _____

() glitazona: _____

() acarbose: _____

() inibidor DPP4: _____

() análogo de GLP-1: _____

() glifozinas: _____

13- faz uso de algum tipo de insulina: sim () / não ()

- se sim, qual(is) e dose:

() NPH _____

() regular _____

() análogo basal _____

() análogo ultra rápido _____

() pré-mistura _____

14- faz uso de medicação (*on/off label*) para tratamento da obesidade: sim () / não ()

); se sim, qual(is) e dose: _____

15- faz uso de anti hipertensivos: sim () / não ()

- se sim, qual(is) e dose:

16 - faz uso de estatina para dislipidemia: sim () / não (); se sim, qual e dose: _____

17- já teve manifestações clínica e/ou subclínicas de DAC? sim () / não (); se sim, qual(is): IAM () / AVC () / DAP ()

18- dados para o trabalho:

- peso:

- altura:

- IMC:

- obesidade: grau I () / grau II () / grau III ()

- DM2: sim () / não ()

- se for DM2, tem complicações microvasculares: sim () / não ()

se sim, qual(is): retinopatia () / nefropatia () / neuropatia ()

19- ocupação

trabalha a noite? sim () / não ()

APÊNDICE D - Trabalho Submetido

Trabalho submetido para a revista 'Archives of Endocrinology and Metabolism', da Sociedade Brasileira de Endocrinologia e Metabologia (SBEM); aguardando decisão dos revisores.

The relationship between of *ACE I/D* and the *MTHFR C677T* polymorphisms in the pathophysiology of type 2 diabetes mellitus in a population of Brazilian obese patients

Flavio Fontes Pirozzi^{1,2,3} Edis Belini Junior^{1,4}, Jessika Viviani Okumura¹, Mariana Salvarani¹,
Claudia Regina Bonini-Domingos¹, Milton Artur Ruiz^{1,2}

1- UNESP - Sao Paulo State University, Department of Biology, Sao Jose do Rio Preto, Brazil.

2- Associação Portuguesa de Beneficencia, Sao Jose do Rio Preto, Brazil.

3- Unilago Medical School, Sao Jose do Rio Preto, Brazil.

4- Unilago - Uniao das Faculdades dos Grandes Lagos, Sao Jose do Rio Preto, Brazil

Correspondence:

Flavio Fontes Pirozzi

rua Delegado Pinto de Toledo, n 2820, apto 111

Sao Jose do Rio Preto/SP/Brazil

Phone: (55)17-997136049

email: fpirozzi@hotmail.com

5 keywords: Type 2 diabetes mellitus, *angiotensin-converting enzyme* gene, *methylenetetrahydrofolate reductase* gene, polymorphism.

Count words: 1934

Article type: original article

Abstract

Brazil has a high prevalence of patients with type 2 diabetes mellitus (T2DM) but there are few epidemiological studies correlating genetic polymorphisms with the disease. This study aimed to evaluate the frequencies of the *angiotensin converting enzyme* (*ACE*) gene insertion/deletion (I/D) and *methylenetetrahydrofolate reductase* (*MTHFR*) gene C677T polymorphisms in obese patients with and without T2DM. This polymorphisms were analyzed by polymerase chain reaction in 125 patients with obesity, 47 (T2DM) and 78 (control group). No significant difference was found on comparing the T2DM and control groups in respect to the genotypic frequencies of the polymorphisms (II: 13.3% vs. 12.0%; ID: 37.8% vs. 37.3; DD: 48.9% vs. 50.7%; CC: 36.2% vs. 39.0%; CT: 46.8% vs. 49.3%; TT: 17.0% vs. 11.7%), and alleles (I: 32.2% vs. 30.7%; D: 67.8% vs. 69.3%; C: 59.6% vs. 63.6%; T: 40.4% vs. 36.4%) and their synergisms in the pathophysiology of T2DM. On analyzing the group of T2DM, there were no significant differences in the presence of complications. In this population of Brazilian obese patients, no correlation was found with the *ACE* and *MTHFR* polymorphisms in the development of T2DM. Analyzing only the group with diabetes, there was also no relationship between these polymorphisms with comorbidities.

Keywords: Type 2 diabetes mellitus, *angiotensin-converting enzyme* gene, *methylenetetrahydrofolate reductase* gene, polymorphism.

Introduction

Type 2 diabetes mellitus (T2DM) is considered a serious public health problem (1,2). Currently, there are about 415 million diabetics in the world, with more than 14 million in Brazil (3). In addition to the known environmental risk factors such as obesity, there are several genetic changes that are correlated to the pathophysiology of T2DM and its complications (4,5).

As in hypertension, some studies implicate *angiotensin converting enzyme (ACE)* gene polymorphisms in the pathogenesis of T2DM, nephropathy and diabetic retinopathy (6,7). The relationship of *MTHFR* polymorphisms associated with hyperhomocysteinemia and changes in the folate cycle is unclear in respect to the development of T2DM with some studies linking these conditions with microvascular complications (8,9).

Epidemiological studies show the relationship of environmental factors in the development of T2DM in the Brazilian population, but few epidemiological studies show the relationship of this metabolic disease with genetic alterations in the same population (10,11), especially in respect to the polymorphisms of the *ACE* and *MTHFR* genes. This study aimed to evaluate the frequency of the insertion/deletion (I/D) polymorphism of the *ACE* gene and the C677T polymorphism of the *MTHFR* gene in a population of obese individuals with and without T2DM. Additionally, the association between these polymorphisms and the occurrence of T2DM and its complications were investigated.

Subjects and Methods

Subjects

This study enrolled 125 obese adults, 47 with T2DM and 78 nondiabetic patients (control group) from June 2015 to November 2015. Inclusion criteria were male and female patients aged 18 to 65 with a body mass index (BMI) greater than or equal to 30 kg/m². The control

group was matched with respect to gender, BMI and ethnicity (Caucasian and Afro-Brazilian).

Individuals who had two fasting glucose measurements ≥ 126 mg/dL or glycemia levels ≥ 200 mg/dL two hours after ingesting 75g dextrosol or glycated hemoglobin (HbA1c) $\geq 6.5\%$ were considered diabetics according to the criteria of the American Diabetes Association (12). Moreover, patients who were already taking medication to treat diabetes (metformin, sulfonylureas, inhibitor of α -glucosidase, pioglitazone inhibitor, DDP-4, GLP-1 agonists, SGLT-2 inhibitors and insulin) were included in this group.

Microvascular complications, such as diabetic retinopathy (diagnosis by an ophthalmologist), diabetic nephropathy (microalbuminuria, macroalbuminuria or chronic renal failure) and diabetic neuropathy (according to clinical conditions, physical examination and electromyography) were also investigated in diabetic patients. Additionally, this study investigated whether the patients had previous diagnoses of hypertension, dyslipidemia or cardiovascular disease (myocardial infarction, stroke and peripheral arterial disease). This research was approved by the Ethics Committee of the Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho" (UNESP/IBILCE) in Sao Jose do Rio Preto, and followed the ethical principles stated in the Declaration of Helsinki. Informed consent was obtained from all participating individuals.

Sample collection

After fasting for 10 hours, 4 mL of peripheral blood were drawn by venipuncture of the upper limbs and placed into tubes containing 5% EDTA in order to extract DNA from leukocytes (13).

I/D polymorphism of the ACE gene

The investigation of the I/D polymorphism of 278 bp (rs1799752) in the *ACE1* gene (17q23.3) was carried out by polymerase chain reaction (PCR) using two amplifications with different primers. The first amplification used the ACE1 (sense)

5'CTGGAGACCACTCCCATCCTTTCT3' and ACE2 (antisense) 5'GATGTGGCCATCACATTCGTCAGAT3' primers; the resulting insertion fragment has 490 bp and the deletion fragment has 190 bp. In this first amplification, there is a preference for the insertion allele to amplify as a deletion allele. Thus, samples homozygous for the deletion allele are submitted to a second amplification to identify heterozygous samples. In this second amplification, the ACE3 (sense) 5'TGGCACGACAGCGCCGCCCACTAC3' and ACE4 (antisense) 5'TCGCCAGCCCTCCATGCCATAAT3' primers are used. The amplified insertion fragment has 355 bp and the deletion fragment is not amplified (14). Both amplifications were analyzed by 2.0% agarose gel electrophoresis under a constant current of 80V for 30 minutes and visualized under ultraviolet (UV) light after staining with ethidium bromide.

C677T polymorphism of the *MTHFR* gene

The PCR-restriction fragment length polymorphism (RFLP) technique was used to investigate the C677T polymorphism (rs1801133) of the *MTHFR* gene. The MTHFR1 (sense) 5'TGAAGAAGGAGGTGTCTGCGG3' and MTHFR2 (antisense) 5'AGGACGGTGCGGTGAGAGTG3' primers were used for amplification generating a 198 bp fragment which was digested using the *HinfI* enzyme (G↓ANTC). The mutation creates a restriction site for the enzyme. The wild homozygous genotype (CC) gives a 198 bp band, the homozygous TT genotype has two bands - one of 175 bp and the other of 23 bp and the heterozygous genotype (CT) gives all three bands (198 bp, 175 bp and 23 bp) (15). The result was analyzed by 4.0% agarose gel electrophoresis under a constant current of 80V for 40 minutes and visualized under UV light after staining with ethidium bromide.

Statistical analysis

Statistical analyzes were performed using the R program, version 3.2.3 (<http://www.r-project.org>) and p-values <0.05 were considered significant. Quantitative variables, tested for normal distribution and homogeneity of variances, are expressed as means ± standard deviation. Mean scores between groups were compared using Student's t test and

differences in proportions were evaluated using the Fisher exact test or Pearson chi-square test using the Rcmdr package (16). Allelic and genotypic frequencies and Hardy-Weinberg deviations were evaluated using the SNPAssoc package (17). A binary logistic regression model was constructed to evaluate the association of polymorphisms in patients with T2DM in different genetic models of inheritance. The p-value was adjusted for variables using the same logistic regression model using the SNPAssoc package (17).

Results

The Table 1 shows the characteristics of the obese T2DM and nondiabetic groups (control group). The T2DM group had a mean age of 47.8 ± 8.8 years and the mean age of the control group was 41.6 ± 11.5 years (p-value = 0.02). There was no significant differences in relation to the gender or ethnicity.

There were no statistical differences in the percentages of subjects with Class I, II and III obesity between the T2DM and control groups (p-value = 0.416). However, as noted in the general population, both groups had a higher proportion of patients with Class I obesity compared to Class II and III (p-value <0.01) (18).

There was no significant difference between the two groups in respect to the number of individuals with hypertension and cardiovascular disease. However, the T2DM group had a higher frequency of dyslipidemia compared to the control group. No patients in the control group had retinopathy, nephropathy or neuropathy due to other causes, thus the T2DM group had more patients with these manifestations.

Table 1

There was no statistically significant differences in the genotypic and allelic frequencies of the polymorphisms of the *ACE* and *MTHFR* genes between the T2DM and control groups (Table 2). Additionally, the genotypes of the polymorphisms evaluated showed no predisposition for elevated risk or protection against the development of T2DM.

Table 2

Different models of gene inheritance were evaluated to check any predisposition for elevated risk or protection against T2DM by comparing the two groups. The results are shown in Table 3, and according to the findings, none of the analyzed inheritance models (codominant, dominant, recessive and additive log) have any influence on the development of T2DM in this obese population.

Table 3

Different combinations of polymorphisms in the T2DM and control groups were evaluated in relation to possible synergism between the polymorphisms to check any predisposition for elevated risk or protection against T2DM. Significant differences between groups were not found with any combination of polymorphisms (Table 4).

Table 4

The number of individuals with T2DM as well as microvascular complications (retinopathy, nephropathy or diabetic neuropathy) or other diseases related to metabolic syndrome such as hypertension, dyslipidemia, and cardiovascular diseases was small and no statistically significant difference was found in relation to polymorphisms of the *ACE* and *MTHFR* genes.

Discussion

Brazil has one of the highest number of obese and diabetic patients in the world but few epidemiological studies exist, especially related to the association of genetic polymorphisms with this disease and its complications (3,10,11,18). Two groups of obese patients, with and without T2DM, were matched with respect to gender, BMI and ethnicity (Caucasian and Afro-Brazilian). The main objective of this study was to evaluate the frequency of polymorphisms (ACE I/D and MTHFR C677T) and their influence on the pathophysiology of T2DM and microvascular complications in individuals with a BMI ≥ 30 kg/m².

According to the findings of this study, the *ACE* I/D and *MTHFR* C677T polymorphisms are not involved in the development of T2DM in this population. Studies had previously correlated these polymorphisms, especially the I/D polymorphism of the *ACE* gene, with T2DM (4-9) even in Indian women with gestational diabetes (19). These polymorphisms have also been implicated in the development of microvascular complications linked to diabetes (20-22). However, studies in Caucasian populations show no significant relationship with the polymorphism of the *ACE* gene (23). Although the Brazilian population is multiethnic, most of the participants of this study (80.8%) were Caucasians, which supports this finding.

Recent studies point to a synergism between different polymorphisms as the triggering factor for diseases that have a genetic component in their pathogenesis, such as T2DM. Although some studies point to this effect on the development of diabetes, including synergism between the *ACE* I/D and *MTHFR* C677T polymorphisms (24), our study found no significant difference between the patients and controls. Moreover, in the group of patients with T2DM, we did not find significant differences in the analysis of these polymorphisms in relation to microvascular complications and comorbidities such as hypertension, dyslipidemia and cardiovascular disease.

One study reported a higher frequency of the D allele in patients with T2DM and cardiovascular disease and the DD genotype had higher risk for these individuals to present with a cardiovascular event (25). Another study in patients with coronary artery disease, with and without diabetes, showed that the DD genotype is associated with poor coronary collateral circulation, which implies worse ischemic conditioning during acute myocardial infarction (26). The frequencies of the D allele and the DD genotype of the *ACE* gene were higher in both groups pointing to an increased cardiovascular risk probably due to obesity and not T2DM. However, these results should be interpreted with caution, as the numbers of individuals previously diagnosed with cardiovascular disease was very small in both groups.

One Brazilian study did not find any association between the I/D polymorphism of the *ACE* gene and patients with T2DM and metabolic syndrome according to the criteria of the World

Health Organization (27), and there are no studies reporting the risk of individuals with this polymorphism developing diabetes. Although there is a Brazilian study that correlates homocysteine levels in patients with and without T2DM to the polymorphism of the *MTHFR* gene (28), there are no studies showing any association of this gene with the risk of developing diabetes in the same population.

Even with the two matched groups, despite the higher age in the T2DM group and more patients with hypertension (not statistically significant) and dyslipidemia (with statistical significance) compared to the control group, the number of participants was small in this study and because only patients with obesity were selected, this evaluation did not include overweight patients with metabolic problems.

No association was found between the polymorphisms of the *ACE* and *MTHFR* genes and the development of T2DM in a population of obese Brazilians. Additionally, no evidence of synergism between the polymorphisms of these two genes and the emergence of diabetes was found. Additionally, no relationship between polymorphisms of the *ACE* and *MTHFR* genes with microvascular complications and diseases associated with the metabolic syndrome (hypertension, dyslipidemia and cardiovascular diseases) was identified in the group of T2DM patients. This is the first multiethnic Brazilian population study to evaluate polymorphisms of the *ACE* and *MTHFR* genes in obese individuals.

Tables

Table 1: Demographic and clinical data of the study participants

Characteristic	T2DM (n = 47)	Controls (n = 78)	p-value
Age (mean \pm SD)	47.8 (8.8)	41.6 (11.5)	0.020 ^c
Male [n (%)]	17 (36.2)	19 (24.4)	0.157 ^b
Female [n (%)]	30 (63.8)	59 (75.6)	
Caucasian [n (%)]	39 (83.0)	62 (79.5)	0.631 ^b
Afro-Brazilian [n (%)]	8 (17.0)	16 (20.5)	
Obesity [n (%)]			0.416 ^b
Class I (BMI: 30 – 34.99)	23 (48.9)	43 (55.1)	
Class II (BMI: 35 – 39.99)	13 (27.7)	24 (30.8)	
Class III (BMI: \geq 40)	11 (23.4)	11 (14.1)	
Retinopathy [n (%)]	3 (6.4)	0	< 0.05 ^a
Nephropathy [n (%)]	7 (14.8)	0	< 0.05 ^a
Neuropathy [n (%)]	7 (14.8)	0	< 0.05 ^a
Hypertension [n (%)]	24 (51.1)	30 (38.5)	0.168 ^b
Dyslipidemia [n (%)]	25 (53.2)	12 (15.4)	< 0.05 ^b
Cardiovascular disease [n (%)]	3 (6.4)	1 (1.3)	0.148 ^a

T2DM: type 2 diabetes *mellitus*; SD: standard deviation

^a Fisher exact test

^b Pearson chi-square test or chi-square goodness-of-fit test

^c Student's *t*-test

Table 2: Genotypic and allelic frequencies of *ACE* I/D and *MTHFR* C667T polymorphisms in patients with type 2 diabetes *mellitus* (T2DM) and controls

Genotype/Allele	T2DM	Controls	OR (95% CI)	p-value
<i>ACE</i> (rs1799752)	(n = 45)	(n = 75)		
<i>Genotype</i>				
II	6 (13.3)	9 (12.0)	0.87 (0.27-2.77)	0.97
ID	17 (37.8)	28 (37.3)	0.95 (0.43-2.12)	
DD	22 (48.9)	38 (50.7)	1.00	
<i>Allele</i>				
I	29 (32.2)	46 (30.7)	0.93 (0.53-1.63)	0.88
D	61 (67.8)	104 (69.3)		
<i>MTHFR</i> (rs1801133)	(n = 47)	(n = 77)		
<i>Genotype</i>				
CC	17 (36.2)	30 (39.0)	1.0	0.71
CT	22 (46.8)	38 (49.3)	0.98 (0.44-2.16)	
TT	8 (17.0)	9 (11.7)	0.64 (0.21-1.96)	
<i>Allele</i>				
C	56 (59.6)	98 (63.6)	0.84 (0.49-1.42)	0.59
T	38 (40.4)	56 (36.4)		

95% CI: 95% confidence interval

Table 3: Analysis of the association of type 2 diabetes *mellitus* (T2DM) with *ACE* I/D and *MTHFR* C677T gene polymorphisms in different models of inheritance

Model	Genotype	T2DM	Controls	OR (95% IC)	p-value
<i>ACE</i> (<i>rs1799752</i>)		n = 45	n = 75		
Codominant	II	6 (13.3)	9 (12.0)	0.87 (0.27-2.77)	0.97
	ID	17 (37.8)	28 (37.3)	0.95 (0.43-2.12)	
	DD	22 (48.9)	38 (50.7)	1.00	
Dominant	DD	22 (48.9)	38 (50.7)	1.00	0.85
	ID-II	23 (51.1)	37 (49.3)	0.93 (0.44-1.95)	
Recessive	II	6 (13.3)	9 (12.0)	1.00	0.83
	DD-ID	39 (86.7)	66 (88.0)	0.89 (0.29-2.68)	
Additive log	-----	-----	-----	0.94 (0.55-1.59)	0.81
<i>MTHFR</i> (<i>rs1801133</i>)		n = 47	n = 77		
Codominant	CC	17 (36.2)	30 (39.0)	1.0	0.71
	CT	22 (46.8)	38 (49.4)	0.98 (0.44-2.16)	
	TT	8 (17.0)	9 (11.7)	0.64 (0.21-1.96)	
Dominant	CC	17 (36.2)	30 (39.0)	1.0	0.76
	CT-TT	30 (63.8)	47 (61.0)	0.89 (0.42-1.88)	
Recessive	TT	8 (17.0)	9 (11.7)	0.65 (0.23-1.81)	0.41
	CC-TT	39 (83.0)	68 (88.3)	1.00	
Additive log	-----	-----	-----	0.84 (0.49-1.43)	0.52

95% CI: 95% confidence interval

Table 4: Association analysis of type 2 diabetes *mellitus* (T2DM) using combinations of polymorphisms (*ACE* I/D and *MTHFR* C667T)

Combination	T2DM (n = 45)	Controls (n = 74)	OR (95% IC)	p-value
DD/CC	8 (17.8)	15 (20.3)	0.85 (0.33-2.20)	0.74
DD/CT	12 (26.7)	18 (24.3)	1.13 (0.48-2.64)	0.77
DD/TT	2 (4.4)	5 (6.8)	0.64 (0.12–3.45)	0.63
ID/CC	7 (15.6)	9 (12.2)	1.31 (0.45-3.86)	0.59
ID/CT	7 (15.6)	15 (20.3)	0.72 (0.27-1.94)	0.52
ID/TT	3 (8.8)	3 (3.5)	2.46 (0.51-13.81)	0.35
II/CC	1 (2.2)	5 (6.8)	0.31 (0.03-2.77)	0.41
II/CT	2 (4.5)	3 (4.0)	1.14 (0.18-7.12)	0.89
II/TT	3 (36.2)	1 (39.0)	5.2 (0.53-51.74)	0.15

95% CI: 95% confidence interval

Acknowledgements

The authors wish to thank the staff of the CDA Laboratory and of the Laboratório de Hemoglobinas e Genética das Doenças Hematológicas, UNESP/IBILCE in Sao Jose do Rio Preto, Brazil, for their assistance in data analysis.

Conflict of interests

The authors declare that they have no conflict of interests regarding the publication of this paper

References

- 1- Tracey ML, Glimartin M, O'Neill K, Fitzgerald AP, McHugh SM, Buckley CM, Canavan RJ, Kearney PM. Epidemiology of diabetes and complications among adults in the Republic of Ireland 1998-2005: a systematic review and meta-analysis. *BMC Public Health* 2016;doi: 10.1186/s12889-016-2818-2.
- 2- Borges NB, Ferraz MB, Chacra AR. The cost of type 2 diabetes in Brazil: evaluation of a diabetes care center in the city of São Paulo, Brazil. *Diabetol Metab Syndr* 2014;6(1):122.
- 3- International Diabetes Federation. *IDF Diabetes Atlas - Seventh Edition*, 2015.
- 4- Khodaeian M, Enayati S, Tabatabaei-Malazy O, Amoli MM. Association between genetic variants and diabetes mellitus in Iranian populations: a systematic review of observational studies. *J Diabetes Res* 2015:585917.
- 5- Abbas S, Raza ST, Ahmed F, Ahmad A, Rizvi S, Mahdi F. Association of genetic polymorphism of *PPAR γ -2*, *ACE*, *MTHFR*, *FABP-2* and *FTO* genes in risk prediction of type 2 diabetes mellitus. *J Biomed Sci* 2013;20:80.

- 6- Daimon M, Oizumi T, Saitoh T, Kameda W, Hirata A, Yamaguchi H, Ohmura H, Igarashi M, Tominaga M, Kato T. The D allele of angiotensin converting enzyme insertion/deletion (I/D) polymorphism is a risk factor for type 2 diabetes in a population-based Japanese sample. *Endocrine J* 2003;50:393-398.
- 7- Ha SK. *ACE* insertion/deletion polymorphism and diabetic nephropathy: clinical implications of genetic information. *J Diabetes Res* 2014;doi:10.1155./2014/846068.
- 8- Zhong JH, Rodríguez AC, Yang NN, Li LQ. Methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphism and the risk of type 2 diabetes mellitus. *PlosOne* 2013;doi: 10.1371/journal.pone.0074521.
- 9- Yang S, Zhang J, Feng C, Huang G. *MTHFR* C677T variant contributes to diabetic nephropathy risk in a Caucasian individuals with type 2 diabetes: a meta-analysis. *Metabolism* 2013;62(4):586-594.
- 10- Da-Mata FA, Galvao TF, Pereira MG, Silva MT. Prevalence of self-reported diabetes and its associated factors: a population-based study in Brazil. *Int J Endocrinol* 2015;doi: 10.1155/2015/610790.
- 11- Domingos AC, Iacida EC, de Oliveira RM, Bonini-Domingos CR, de Mattos CC, de Mattos LC. Type 2 diabetes mellitus and the frequency of the G22A polymorphism of the adenosine deaminase gene in a mixed population in Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2014;108(7):439-443.
- 12- American Diabetes Association. Classification and diagnosis of diabetes. *Diabetes Care* 2016;39(Suppl1):S13-S22.
- 13- Sambrook J, Fritsch EF, Manatis T. *Molecular Cloning: a laboratory manual* (2 ed). Cold Spring Harbor Laboratory Press;1989.

- 14- Rigat B, Hubert C, Alhenc-Gelas F, Cambien F, Corvol P, Soubrier F. An insertion/deletion polymorphism in the angiotensin I-converting enzyme gene accounting for half the variance of serum enzyme levels. *J Clin Invest* 1990;86(4):1343-1346.
- 15- Frosst P, Blom HJ, Milos R, Goyette P, Sheppard CA, Matthews RG, Boers GJ, den Heijer M, Kluijtmans LA, van de Heuve LP, et al. A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nat Genet* 1995;10:111-113.
- 16- Fox, J. The R Commander: A Basic Statistics Graphical User Interface to R. *Journal of Statistical Software* 2005;14(9):1-42.
- 17- González JR, Armengol L, Solé X, Guinó E, Mercader JM, Estivill X, Moreno V. SNPAssoc: an R package to perform whole genome association studies. *Bioinformatics* 2007;23(5):644-645.
- 18- NCD Risk Factor Collaboration (NCD-RisC). Trends in adult body-mass index in 200 countries from 1975 to 2014: a pooled analysis of 1698 population-based measurement studies with 19,2 million participants. *Lancet* 2016;387:1377-1396.
- 19- Aqqarwal P, Agarwal N, Das N, Dalal K. Association of polymorphisms in angiotensin-converting enzyme gene with gestacional diabetes mellitus in Indian women. *Int J Appl Basic Med Res* 2016;6(1):31-37.
- 20- Xu W, Qian Y, Zhao L. Angiotensin-converting enzyme I/D polymorphism is a genetic biomarker of diabetic peripheral neurophathy: evidence from a meta-analysis. *Int J Clin Exp Med* 2015;8(1):944-948.
- 21- Ma H, Yu C, Wang R. Association of *ACE* polymorphisms and diabetic nephropathy susceptibility. *Int J Clin Exp Med* 2015;8(2):2962-2965.
- 22- Yigit S, Karakus N, Inanir A. Association of *MTHFR* gene C677T mutation with diabetic peripheral neuropathy and diabetic retinopathy. *Molecular Vision* 2013;19:1626-1630.

- 23- Arfa I, Abid A, Noura S, Elloumi-Zghal H, Malouche D, Mannai I, Zorgati MM, Ben Alaya N, Rebai A, Zouari B, Ben Ammar S, Ben Rayana MC, Hmida S, Blousa-Chabchoub S, Abdelhak S. Lack of association between the angiotensin converting enzyme gene (I/D) polymorphism and diabetic nephropathy in Tunisian type 2 diabetic patients. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* 2008;9:32-36.
- 24- Al-Harbi EM, Farid EM, Gumaa KA, Darwish AH, Alenzi M, Singh J. Genetic combination of angiotensin-converting enzyme with methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms and the risk of type 2 diabetes mellitus in Bahrain. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* 2015;16:172-177.
- 25- Lei HP, Chen HM, Zhong SL, Yao QZ, Tan HH, Yang M, Lin QX, Shan ZX, Zheng ZW, Zhu JN, Zhou ZL, Lin SG, Yu XY. Association between polymorphisms of the renin-angiotensin system and coronary artery disease in Chinese patients with type 2 diabetes. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* 2012;13:305-313.
- 26- Ceyhan K, Kadi H, Celik A, Burucu T, Koc F, Soqut E, Sahin S, Onalan O. Angiotensin-converting enzyme DD polymorphism is associated with poor coronary collateral circulation in patients with coronary artery disease. *J Investig Med* 2012;60(1):49-55.
- 27- Costa LA, Canani LH, Maia AL, Gross JL. The ACE insertion/deletion polymorphism is not associated with the metabolic syndrome (WHO definition) in Brazilian type 2 diabetic patients. *Diabetes Care* 2012;25(12):2365-2366.
- 28- Mello AL, Cunha SF, Foss-Freitas MC, Vannucchi H. Evaluation of plasma homocysteine level according to the C677T and A1298C polymorphism of the enzyme *MTHFR* in type 2 diabetic adults. *Arq Bras Endocrinol Metabol* 2012;56(7):429-434.