



BÁRBARA SCORALICK VILLELA

Avaliação da expressão gênica em pacientes com Diabetes Mellitus tipo 2

Araraquara

2013

BÁRBARA SCORALICK VILLELA

Avaliação da expressão gênica em pacientes com Diabetes Mellitus tipo 2

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao curso de Graduação em
Farmácia-Bioquímica da Faculdade de
Ciências Farmacêuticas de Araraquara,
da Universidade Estadual Paulista, para
obtenção do grau de Farmacêutica-
bioquímica.

Orientadora: Prof^a Dr^a. Raquel Mantuaneli Scarel Caminaga

Araraquara

2013

Agradecimentos

Aos meus pais, Paulo e Rita, e irmãos, Artur e Guilherme

Eu não seria nada hoje sem o apoio de vocês que nunca deixaram de acreditar em mim. Vocês são meus exemplos, minha inspiração, meu porto-seguro. Obrigada por todo o amor e carinho.

À minha orientadora Profa. Dra. Raquel Mantuaneli Scarel Caminaga

Desde o primeiro dia em que entrei no laboratório sempre fui muito bem acolhida e sua orientação foi fundamental em todos estes anos de faculdade. Agradeço por ser uma orientadora presente e sempre dedicada aos alunos e nossas pesquisas.

À Profa. Dra. Silvana Regina Perez Orrico e à aluna Alliny de Souza Bastos

Pelo compartilhamento dos dados obtidos com os experimentos de seu estudo. Obrigada pelos exemplos de competência e dedicação à Periodontia e à pesquisa.

Aos amigos do Laboratório de Genética Molecular

À amiga Sâmia Cruz Tfaile Corbi por ter acompanhando todo meu Trabalho de Conclusão de Curso desde os primeiros dias até os momentos finais de escrita. Este trabalho não seria possível sem sua ajuda. À Suzane C. Pigossi que me

ensinou tudo do básico, desde meu primeiro dia. À aluna Livia S. Finoti que me ajudou com todas as complicadas análises estatísticas bem como vários outros aspectos do trabalho. Aos amigos Giovana Anovazzi, Cliscea Tereza Corso, Rafael Nepomuceno, Rone Aparecido de Grandis, Débora Leite, Fernanda Coelho, Flávia Cera, Larissa Polli e Profa. Dra. Ticiane Capote pelo contato e ajuda diária no laboratório. Mais importante é que estiveram presentes em todos os momentos, bons ou ruins, me ajudando em tudo o que era necessário.

Aos meus amigos

Foram sempre meus exemplos e agradeço por sempre acreditarem em mim e me apoiarem em todas as idéias, por mais estranhas que fossem. Amigos de Juiz de Fora. Amigos da turma 79. Amigos do PET, especialmente PET Farmácia e meu tutor João Aristeu da Rosa. Amigos da All Pharma Jr, especialmente da Diretoria da Qualidade que sempre irão ficar no meu coração. Amigos farmacêuticos pelo mundo afora (Viva la pharmacie!). Amigos da Universidade de Alberta, brasileiros ou não, que me ajudaram a fazer o ano no Canadá ainda mais especial. Estes últimos seis anos não teriam sido os mesmos sem vocês e sempre serão parte de mim.

Aos Pacientes

Aos pacientes que fizeram parte desta pesquisa, os quais foram receptivos e tornaram possível a realização deste estudo. Muito obrigada pela paciência e confiança.

Ao Apoio Financeiro recebido

À CAPES e FAPESP pelo apoio financeiro para realizar esta pesquisa.

Sumário

Resumo7

Lista de Ilustrações9

Lista de Tabelas11

Lista de Abreviaturas e Siglas12

Introdução15

Desenvolvimento25

Conclusão44

Referências Bibliográficas45

Anexo56

Dados Finais57

Resumo

Villela BS. Avaliação da expressão gênica em pacientes com Diabetes Mellitus tipo 2 [Trabalho de Conclusão de Curso]. Araraquara: Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP; 2013.

O Diabetes Mellitus caracteriza-se como um grupo de doenças metabólicas, marcado pela hiperglicemia resultante de defeitos na secreção de insulina, em sua ação ou em ambos. O aparecimento da doença está relacionado a fatores de risco genéticos, ambientais e comportamentais, com aumento da prevalência em todo o mundo. Com relação à expressão gênica e Diabetes Mellitus tipo 2 (DM2), informação muito limitada foi encontrada enfocando-se genes relacionados ao sistema imune. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da descompensação do DM2 sobre a expressão de genes do sistema imune, tais como *IL10RB*, *IL10RA*, *IL10*, *JAK1*, *STAT3*, *SOCS3*, *IP10* e *ICAM1*. A amostra foi constituída por 60 pacientes divididos em 2 grupos: Grupo 1 (DM2 Compensado metabolicamente) e Grupo 2 (DM2 Descompensado metabolicamente). Toda a amostra foi submetida a exame físico e avaliação laboratorial para verificação da glicemia de jejum, hemoglobina glicada (HbA1c), insulina e proteína C-reativa. De cada paciente foi coletado sangue em tubo com EDTA, sendo separados os leucócitos para investigar a expressão gênica. Após a extração de RNA total do sangue dos pacientes de ambos os Grupos, foi confeccionado o cDNA e a expressão gênica foi avaliada por qPCR (Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real, ou quantitativo). Como resultado da expressão gênica comparando os Grupos 1 e 2, obtiveram-se diferenças significantes para os genes *IL10RA*, *JAK1*, *STAT3*, *SOCS3* e *ICAM1*. Todos esses genes se mostraram mais expressos no Grupo 2 (DM2

Descompensado metabolicamente) do que no Grupo 1 (DM2 Compensado metabolicamente). Portanto, a descompensação metabólica do DM2 provavelmente pode interferir na cascata da via de sinalização da *IL10* contribuindo possivelmente com a indução significativa da expressão de citocinas inflamatórias e/ou interação com outras moléculas que favorecem a descompensação metabólica.

Palavras-Chave: Diabetes mellitus tipo 2; expressão gênica; citocinas

Lista de Ilustrações

Figura 1. Sinalização da citocina IL-10 pela via JAK/STAT. A citocina IL-10 se liga ao receptor *IL10R1* dando início à cascata de eventos de transdução de sinal que inclui a fosforilação de JAK-1 e consequente fosforilação dos resíduos de tirosina (Y) no receptor *IL10R1* que servem como sítios de ancoragem para o STAT-3 que torna-se ativada e se dissocia do receptor *IL10R1* ligando-se a outra molécula STAT-3. Os dímeros STAT-3 migram para o núcleo da célula e se ligam às sequências de DNA nas regiões promotoras de genes responsivos a IL-10, e ativam a transcrição desse gene; que neste exemplo é o SOCS3, gene que inibe a expressão de *ICAM1* e *IP10* (figura baseada no artigo de DONNELLY, DICKENSHEETS, FINBLOOMB (1999)).

Figura 2. Curva padrão para verificação da eficiência de amplificação por PCR em Tempo Real. A eficiência de amplificação é determinada pela função: $Efic = 10^{-1/\text{slope}}$.

Figura 3. Ciclo térmico da reação de qPCR à qual as amostras foram submetidas.

Figura 4. Curvas de dissociação dos genes alvo mostrando um único pico referente ao T_m (Temperatura de Melting) do respectivo amplicon, o que comprova a especificidade de cada par de primers (via de sinalização do gene *IL10*).

Figura 5. Expressão dos genes *IL10RB*, *IL10RA*, *IL10*, *JAK1*, *STAT3*, *SOCS3*, *IP10* e *ICAM1* nos Grupos 1 e 2. Todos os valores foram normalizados para β -Actina. Dados representam a média $\pm$ DP. * $p\leq 0.05$ em relação ao grupo 1; # $p<0.0001$ em relação ao grupo 1; (Teste Mann Whitney; $\alpha=5\%$).

Lista de Tabelas

Tabela 1. Primers específicos para cada gene (Via de sinalização do gene *IL10*).

Tabela 2. Características Demográficas.

Tabela 3. Dados relativos ao Diabetes.

Tabela 4. Média ($\pm$ Desvio-Padrão) dos dados relativos ao Exame Físico.

Tabela 5. Média ($\pm$ Desvio-Padrão) para Parâmetros Laboratoriais.

Lista de Abreviaturas e Siglas

β *Actina*: gene beta actina

°C – Grau Celsius

μ l – Microlitro

AGE- produtos finais da glicação avançada (*Advanced Glycation End-products*)

B7-1 - grupamento de diferenciação 80 (*cluster of differentiation 80*)

cDNA - DNA complementar

CT - Threshold cycle

DEPC - Dietil Pirocarbonato

DM - Diabetes Mellitus

DM1 - Diabetes Mellitus tipo 1

DM2 - Diabetes Mellitus tipo 2

DNA - Ácido Desoxirribonucleico

DP - Desvio Padrão

EDTA - Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético

FOAr - Faculdade de Odontologia de Araraquara

GPD2 - gene glicerol-3-fosfato desidrogenase 2 mitocondrial (gene *Glycerol-3-phosphate Dehydrogenase 2 mitochondrial*)

HbA1c - Hemoglobina Glicada A1C

ICAM1 - gene molécula de Adesão Intercelular 1

IGF-1 - fator de crescimento semelhante à insulina 1 (*insulin-like growth factor 1*)

IGF2 - gene fator de crescimento semelhante à insulina 2 (*gene Insulin-like Growth Factor 2*)

IGF2BP2 - gene fator de crescimento semelhante à insulina 2 proteína ligante ao mRNA (*gene Insulin-like Growth Factor 2 mRNA-binding Protein 2*)

IMC - Índice de Massa Corpórea

IL10 – gene interleucina 10

IL10RA - gene interleucina 10 receptor alfa

IL10RB - gene interleucina 10 receptor beta

IP-10 - Proteína 10 Induzida por Interferon Gamma

IRS-1 - Substrato do receptor de insulina 1 (*Insulin receptor substrate 1*)

IRS-2 - Substrato do receptor de insulina 2 (*Insulin receptor substrate 2*)

JAK1 - gene janus-quinase 1

JAK2 - gene janus-quinase 2

LPS – Lipopolissacarídeos

MODY - *Maturity-Onset Diabetes of the Young*

NaCl - Cloreto de Sódio

nm – Nanômetro

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase (*Polymerase Chain Reaction*)

qPCR - PCR Quantitativo em Tempo Real

RAGE - Receptores de AGE

RNA - Ácido Ribonucleico

RNA_m – RNA mensageiro

ROS – Espécies reativas do oxigênio (*Reactive Oxygen Species*)

RT-qPCR – Transcrição Reversa seguida de Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real

SOCS3 - gene supressor de sinalização de citocina 3 (*suppressor of cytokine signaling 3*)

STAT1 - gene Transdutor de Sinal e Ativador de Transcrição 1

STAT3 - gene Transdutor de Sinal e Ativador de Transcrição 3

TCF7L2 - gene Fator de transcrição 7-tipo 2 (*Transcription Factor 7-like 2*)

T_m - Temperatura de Melting

TNF – Fator de Necrose Tumoral

UTR – Região não traduzida (*untranslated region*)

Introdução

Diabetes Mellitus

O Diabetes Mellitus (DM) vem sendo reconhecido como um problema mundial de saúde pública em decorrência dos gastos envolvidos no seu tratamento bem como seus altos índices de morbidade e mortalidade (ORTIZ; ZANETTI, 2000). É caracterizado como um grupo de doenças metabólicas marcada pela hiperglicemia crônica resultante de defeitos na secreção de insulina, em sua ação ou em ambos alterando o metabolismo de carboidratos, lipídeos e proteínas (ALBERTI, 1998).

Atualmente, os tipos mais comuns de DM são tipo 1 (DM1), em que as células beta do pâncreas são destruídas por autoimunidade, levando à uma deficiência absoluta de insulina, e o tipo 2 (DM2), onde há graus variados de diminuição de secreção e resistência à insulina (ALBERTI, 1998). Existem outros tipos mais específicos de DM, como por exemplo, os de defeitos genéticos da função da célula β , defeitos genéticos da ação da insulina, doenças do pâncreas exócrino, endocrinopatias, indução por drogas ou produtos químicos (diabetes medicamentosa), relacionada às infecções, formas incomuns de diabetes imuno-mediado e diabetes gestacional (GROSS et al., 2002). Um tipo mais específico que tem sido alvo de pesquisa é o MODY (*Maturity Onset Diabetes of the Young*) em que os pacientes apresentam um defeito de secreção de insulina relacionado a mutações em genes específicos, chamada, portanto de forma monogênica do DM (REIS; VELHO, 2002). Acredita-se que exista uma possível interação genética entre os dois tipos principais da DM, pois estudos recentes descrevem uma prevalência duas vezes maior de DM1 em famílias com DM2 (HAIYAN, 2001). Seus efeitos, caso não seja tratado, incluem disfunção ou falências de múltiplos órgãos como olhos,

rins, nervos, coração e vasos sanguíneos. Como resultado direto da hiperglicemia, o paciente pode apresentar poliúria, polidipsia, polifagia, perda de peso e visão turva, bem como complicações mais graves como cetoacidose diabética, em pacientes que apresentam o DM do tipo 1, e a síndrome hiperosmolar hiperglicêmica não cetótica, em pacientes que apresentam o DM do tipo 2 (ALBERTI, 1998; FOSS-FREITAS, 2003). Essa situação é problemática, uma vez que 50% dos portadores desconhecem o diagnóstico (GROSS et al., 2002). Este estado pode levar à coma, funções neurológicas prejudicada e doença oclusiva vascular e é caracterizado pela marcada hiperglicemia com hiperosmolaridade, desidratação e falta relativa de insulina (MAGEE; BHATT, 2001). A deficiência na secreção e/ou na ação da insulina levam então à anormalidades metabólicas no DM2 incluindo hiperglicemia como resultado da falha da absorção de glicose pela estimulação da insulina e produção hepática descontrolada de glicose, bem como a dislipidemia (MUOIO; NEWGARD, 2008). Esse aumento de lipídeos e glicose circulantes podem prejudicar ainda mais a secreção de insulina causando mais danos aos tecidos (MUOIO; NEWGARD, 2008).

Diversos processos patogênicos estão envolvidos com o desenvolvimento do DM e o aparecimento da doença está relacionado a fatores de risco genéticos, ambientais e comportamentais (KING et al., 1994). Como mencionado, no DM1 a destruição das células β do pâncreas ocorre por processos auto-imunes (tipo 1A) ou por causa desconhecida (tipo 1B). Na forma 1A ocorre um processo de insulite (processo inflamatório das ilhotas pancreáticas) no qual as ilhotas de Langerhans presentes no pâncreas tornam-se infiltradas por células mononucleares levando a um processo inflamatório (SAÏ, 1997). A presença de auto-anticorpos (como anti-

insulina e anti-ilhotas) induz a uma instalação abrupta do quadro citado anteriormente (insulite). Este processo leva à destruição das células β do pâncreas levando a uma deficiência completa de insulina. Já na forma 1B, não há insulite nem a presença de auto-anticorpos, sendo por isso uma forma idiopática da doença (GROSS et al., 2002).

O DM2, a forma mais freqüente, é caracterizado por problemas na ação e/ou na secreção da insulina e sua etiologia não está completamente definida, mas sabe-se que não está relacionado com o processo auto-imune descrito anteriormente (GROSS et al., 2002). A maioria dos indivíduos com DM2 é obesa, sendo que a obesidade é causada ou agravada pela resistência à insulina. O risco para o desenvolvimento do DM2 aumenta conforme a idade (início geralmente em torno dos 40 anos), com a presença da obesidade e ausência da prática de exercícios físicos. No entanto, o DM2 também está associado a fatores genéticos ainda não bem definidos (SARTORELLI; FRANCO; CARDOSO, 2006). Pacientes com DM2 geralmente apresentam características da síndrome metabólica, isto é, resistência à insulina, hipertensão e hipertrigliceridemia (REAVEN, 1988).

Nos pacientes com DM2, o excesso de glicose no sangue interage de forma não-enzimática com proteínas, lipídios e ácidos nucleicos, ocorrendo a formação de produtos finais da glicação avançada (AGE- advanced glycation end-products) (BROWNLEE, 1991). Macrófagos, monócitos e células endoteliais possuem receptores específicos para AGE, chamados RAGE, que quando interagem entre si geram tipos celulares hiper-responsivos, havendo maior secreção de citocinas pró-inflamatórias, dentre elas a interleucina 1β (IL- 1β) e o fator de necrose tumoral α (TNF- α) (YAN et al, 1994).

Estudos mostram que na DM2 os neutrófilos apresentam-se com deficiência de aderência, quimiotaxia e fagocitose (GULOB, 1982; UETA, 1993). Devido a ação de AGEs, os macrófagos e monócitos podem expressar um fenótipo com caráter destrutivo, por meio de um aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (ROS-Reactive Oxygen Species); aumento na síntese de citocinas e mediadores pró-inflamatórios; além de uma inibição da liberação de citocinas anti-inflamatórias associadas ao reparo tecidual (BROWNLEE, 1991; LACOPINO, 1995; SALVI, 1997).

Existem evidências que sugerem que a adoção de um estilo de vida saudável representa um efeito protetor contra o desenvolvimento do DM2. Um estudo mostrou que ausência de tabagismo, a prática diária de atividades físicas, a manutenção do peso e alimentação rica em fibras e ácidos graxos polinsaturados, pobre em gordura saturada e ácido graxos trans, reduz em 91% o risco de desenvolver este tipo de DM (SARTORELLI; FRANCO; CARDOSO, 2006).

DM2 e a Genética Humana

A influência genética no DM2 pode ser percebida na medida em que há uma alta prevalência em certas populações e entre familiares de primeiro grau de pacientes que apresentam DM2, bem como uma concordância na ocorrência da doença de 50 a 80% entre gêmeos monozigóticos (REIS; VELHO, 2002). Alguns genes já foram relacionados com a susceptibilidade ao DM2, como por exemplo (WINBLAD, 2005; SAXENA et al., 2007; JIN & LIU, 2008):

- Desidrogenase glicerofosfato mitocondrial (*glycerol-3-phosphate dehydrogenase 2 mitochondrial*, *GPD2*) o qual catalisa a conversão de glicerol-3-fosfato para fosfato de di-hidroxiacetona);
- Gene fator de crescimento semelhante à insulina 2 proteína ligante ao mRNA (*insulin-like growth factor 2 mRNA-binding protein 2*, *IGF2BP2*) o qual regula o fator de crescimento 2 semelhante à insulina (*IGF2*) e liga a porção 5' UTR do mesmo;
- Gene fator de transcrição 7-tipo 2 (*transcription factor 7-like 2*, *TCF7L2*), o qual age como fator de transcrição.

Quando o DM2 acomete indivíduos com idade mais avançada fica evidente a interação entre fatores ambientais e genéticos, uma vez que o estilo de vida sedentário e a alimentação desbalanceada são importantes fatores no desenvolvimento da doença (GROSS et al., 2002). Os genes relacionados ao desenvolvimento do DM2 são expressos em diversos tipos celulares como do fígado, adipócitos, células β do pâncreas, entre outros. A transmissão dos alelos desses genes não segue o padrão mendeliano e estes atuam em fenótipos intermediários do DM que irão influenciar a massa gordurosa, a sensibilidade à insulina e o padrão secretório da insulina (REIS; VELHO, 2002). Cada gene gera, portanto, um pequeno efeito, mas se os alelos relacionados ao risco ao DM forem transmitidos a um mesmo paciente, estes efeitos podem ser mais expressivos clinicamente (REIS; VELHO, 2002). Entretanto, não se pode deixar de citar a importância dos fatores ambientais no desenvolvimento do DM2. Já para subtipos mais raros de DM, como a forma monogênica desta, a influência genética torna-se

mais expressiva em comparação aos fatores ambientais que pouco interferem no quadro (REIS; VELHO, 2002).

DM2 e o Sistema Imune

Cada molécula que compõe o sistema imune é regulada por uma complexa rede de sinalização entre citocinas, por isto, podem ocorrer diferentes padrões de ativação e inibição de citocinas e enzimas durante a evolução do DM (FUJIHASHI et al., 1993).

A IL-10 é uma importante citocina anti-inflamatória, produzida sobretudo por macrófagos, que atua principalmente na inibição de macrófagos ativos, sendo assim um excelente regulador de feedback negativo. Os macrófagos secretam citocinas como TNF- α que aumentam a ativação de células T. Como a IL-10 inibe a função dos macrófagos ativados, ela colabora para o retorno do sistema imune ao estado de repouso (ABBAS; LICHTMAN; POBER, 2005). Ao mesmo tempo, a IL-10 atua como ativadora de linfócitos B, estimulando sua proliferação e diferenciação (FUJIHASHI et al., 1993; YAMAMOTO et al, 1997).

Estudos mostraram dados interessantes a respeito da relação de IL-10 e DM2. YAGHINI et al. (2011) demonstraram uma diferença significativa na dosagem de IL-10 em soro de pacientes com e sem DM2, concluindo que baixas quantidades de IL-10 em soro de pacientes seria um fator de risco para o desenvolvimento do DM2. No entanto, GACKA et al. (2010) analisaram a expressão gênica de *IL10* em pacientes com DM2 e pacientes controle, não encontrando expressão diferenciada significativa na comparação entre os grupos de estudo. Notou-se que apesar da

importância do papel biológico da IL-10 no sistema imune, há pouquíssimos estudos investigando a relação de genes desta via com o DM2.

A resposta imune ocorre mediante a ligação das citocinas aos seus receptores na superfície das células e por este motivo é importante investigar também a expressão dos receptores da IL-10. O gene *IL10* possui dois receptores: IL10R- α (*IL10R1*) e IL10R- β (*IL10R2*) (REBOUL et al, 1999). Ao se ligar a estes receptores, forma-se um complexo entre IL-10 e os dois receptores levando à transdução do sinal que ativam respostas específicas nas células-alvo. Esta transdução é mediada pela via JAK-STAT, ou seja, envolve as enzimas Janus-quinase 1 (JAK-1) e o Transdutor de Sinal e Ativador de Transcrição 3 (STAT-3) (ABBAS; LICHTMAN; POBER, 2005).

Após a formação do complexo, ocorre então a fosforilação do JAK-1 e consequentemente a fosforilação de resíduos específicos de tirosina (Y) no domínio intracelular do receptor IL10R- α que servirão como sítios de ancoragem para o STAT-3. Este processo ativa a proteína STAT-3 a qual se dissocia do receptor IL10R- α e liga-se a outra STAT-3. Esse dímero migra para o núcleo celular e se liga ao DNA nas regiões promotoras de genes responsivos a IL-10, ativando a transcrição dos mesmos (Figura 1). Um exemplo de gene responsivo à IL-10 é o *SOCS3*, o qual produz a proteína SOCS-3 que inibe a sinalização dependente de JAK/STAT, por inibir a fosforilação do STAT (DONNELLY; DICKENSHEETS; FINBLOOM, 1999). A habilidade da IL-10 em rapidamente induzir a expressão de *SOCS3* pode explicar, ao menos em parte, como esta interleucina inibe a expressão de muitos genes de citocinas pró-inflamatórias, como a IL-1 β e TNF- α , em monócitos e macrófagos (DONNELLY et al., 1999; ABBAS et al., 2005; WONG et al., 2006).

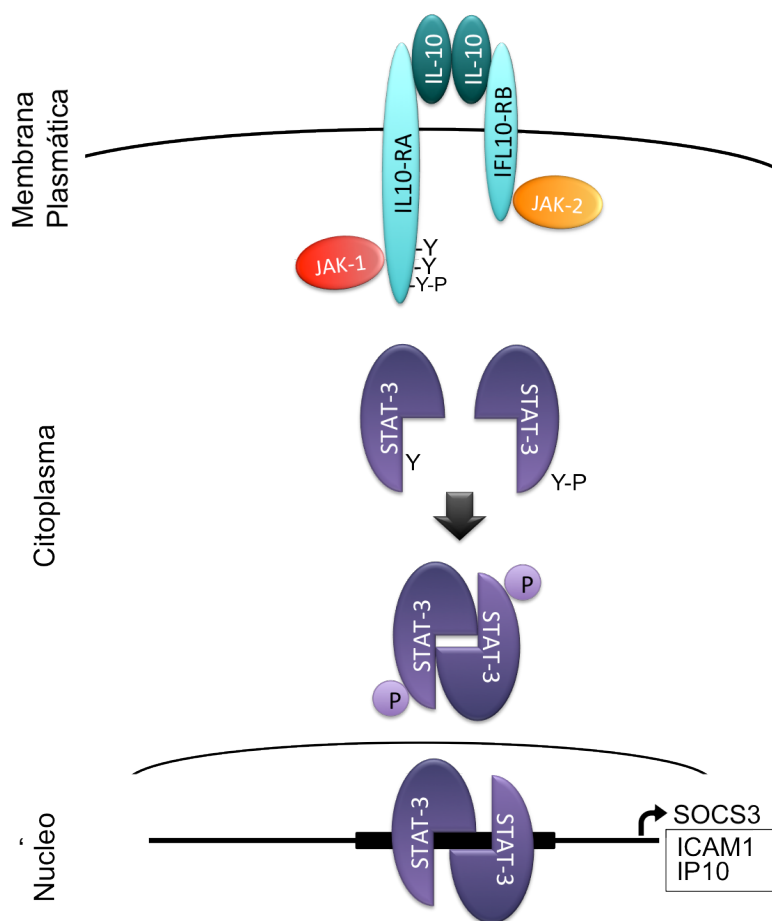


Figura 1. Sinalização da citocina IL-10 pela via JAK/STAT. A citocina IL-10 se liga ao receptor *IL10R1* dando início à cascata de eventos de transdução de sinal que inclui a fosforilação de JAK-1 e consequente fosforilação dos resíduos de tirosina (Y) no receptor *IL10R1* que servem como sítios de ancoragem para o STAT-3 que torna-se ativada e se dissocia do receptor *IL10R1* ligando-se a outra molécula STAT-3. Os dímeros STAT-3 migram para o núcleo da célula e se ligam às sequências de DNA nas regiões promotoras de genes responsivos a IL-10, e ativam a transcrição desse gene; que neste exemplo é o SOCS3, gene que inibe a expressão de *ICAM1* e *IP10* (figura baseada no artigo de DONNELLY, DICKENSHEETS e FINBLOOM (1999)).

Dois genes cuja expressão são inibidas pela IL-10 são os genes das proteínas Molécula de Adesão Intercelular 1 (*ICAM1*) e Proteína 10 Induzida por Interferon Gamma (*IP10* ou *CXCL10*), pois estes genes, induzidos pelos interferons α e γ , utilizam a STAT-1 como molécula transdutora de sinal ao núcleo. Como a IL-10 atua na supressão da fosforilação da STAT-1 e esta fosforilação seria necessária para ativar a indução dos genes das proteínas citadas, podemos então supor que a IL-10 inibe a expressão destes genes (HILTON et al., 1998; ITO et al., 1999). IP-10 e

ICAM-1 são proteínas cuja expressão é aumentada em resposta à citocinas pró-inflamatórias (SLIGH et al, 1993; ABBAS; LICHTMAN; POBER, 2005)

O ICAM-1 é uma proteína presente na superfície de células que apresentam um papel importante na migração transendotelial de leucócitos através da sua expressão em tecido vascular endotelial e da sua ligação com integrinas. A forma solúvel de ICAM-1 já foi relacionada na literatura com o desenvolvimento de DM e suas complicações (WANG et al., 2013).

DM2 e a Expressão Gênica

Com relação à expressão gênica e DM2, apesar de exaustiva pesquisa bibliográfica, informação muito limitada foi encontrada enfocando-se genes relacionados ao sistema imune (principalmente da via da *IL10*).

Um estudo mostrou uma possível relação entre a tolerância à glicose e concentrações plasmáticas elevadas de HLA-G (human leukocyte antigen-G), ressaltando também a relação entre IL-6 e HLA-G. O HLA-G já foi associada com diferentes doenças auto-imunes e, apesar de DM2 e obesidade não serem exemplos desse tipo de doença, também foram associados com o antígeno em questão (SOLINI et al., 2010).

Ao analisar o gene *IL10*, um estudo também mostrou que há uma correlação entre pacientes com síndrome metabólica, DM2 e aterosclerose e genes pró-inflamatórios e anti-inflamatórios. A expressão dos genes *IL10*, *IL1RA* (interleucina 1 receptor antagonista) e *IL1 β* (interleucina 1 β) encontrava-se aumentada no tecido adiposo epicárdico destes pacientes (SACKS et al., 2011).

Até o momento não foi encontrada na literatura nenhuma pesquisa investigando expressão diferencial dos genes *IL10*, seus receptores e outros genes de sinalização intracelular dessa via, em indivíduos com DM2 compensados e descompensados metabolicamente. Desta forma, este trabalho poderá contribuir para o melhor entendimento de como essa patologia pode influenciar a expressão de importantes genes do sistema imune no contexto da compensação/descompensação metabólica.

Portanto, o objetivo do presente estudo é avaliar o efeito da descompensação do Diabetes Mellitus tipo 2 sobre a expressão de genes relacionados ao sistema imune (*IL10*, *IL10RA*, *IL10RB*, *JAK1*, *STAT3*, *SOCS3*, *IP10* e *ICAM1*) em pacientes que apresentam Diabetes Mellitus tipo 2 compensados e descompensados metabolicamente.

Desenvolvimento

Descrição da amostra

Cada paciente incluído neste presente estudo foi envolvido em outros estudos desenvolvidos previamente pelo presente grupo de pesquisa (Processos FAPESP 2007/08362-8; 2009/16233-9 e 2010/10882-2), que contaram com a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da FOAr-UNESP (nº 50/06).

Após esclarecimento da natureza e objetivos da pesquisa, os pacientes que aceitaram participar do estudo assinaram o termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Nos estudos anteriores foi realizado o exame clínico periodontal e as coletas de sangue para as devidas análises. Foi realizado um cálculo amostral tomando por base dados de experimentos anteriores do presente grupo de pesquisa, em que uma vez observando a detecção de uma diferença de 3 unidades na concentração de uma determinada citocina inflamatória no plasma e utilizando um desvio padrão de 2.4 unidades entre os grupos, foi possível verificar que com 30 pacientes em cada grupo seria possível obter 80% de poder com 5% de significância para as análises.

Para o presente estudo, com enfoque na avaliação da expressão gênica, o tamanho amostral de cada grupo já formado foi compatível, ou até supera o observado na literatura (GOMES et al., 2006; DUATE et al., 2007; O'CONNELL et al., 2008; DUARTE et al., 2012; GARCIA-HERNANDEZ et al., 2012).

Grupos

Os pacientes foram selecionados dentre os que buscaram atendimento odontológico na Faculdade de Odontologia de Araraquara (FOAr) e os que foram

encaminhados pelas Unidades Básicas de Saúde. Os pacientes portadores de Diabetes, quando necessário, foram encaminhados a um endocrinologista para acompanhamento e eventual tratamento da condição metabólica.

Critérios de Inclusão

- Ambos os sexos
- Idade de 35 a 60 anos

Critérios de Exclusão

- Gestação e lactação
- Uso de anticoncepcional ou qualquer outra forma de hormônio
- Tabagismo
- Presença de anemia

Para os indivíduos de ambos os grupos (portadores de diabetes), foi realizado exame laboratorial para avaliação da HbA_{1c} e, a partir deste resultado, o paciente foi alocado no grupo 1 (compensado metabolicamente) ou no grupo 2 (descompensado metabolicamente).

O critério de HbA_{1c} $\geq$ 8,0%, no grupo de pacientes metabolicamente descompensados, foi escolhido para evitar a inclusão de pacientes com descompensação metabólica transitória e foi baseado em estudos prospectivos e randomizados (OKUDA; MURAKAMI, 1998) que definem o limite de 7% da HbA_{1c} como controle metabólico aceitável. Assim, a inclusão de pacientes com 1% acima do limite superior elimina a interferência de possíveis alterações metabólicas transitórias.

Sendo assim, amostra foi composta por 60 indivíduos, divididos em dois grupos:

- **Grupo 1 (n=30)** – Indivíduos portadores de diabetes mellitus tipo 2, compensados metabolicamente ($HbA1c < 8,0\%$).
- **Grupo 2 (n=30)** – Indivíduos portadores de diabetes mellitus tipo 2, descompensados metabolicamente ($HbA1c \geq 8,0\%$).

Procedimentos Clínicos

Anamnese

Todos os pacientes foram submetidos à anamnese completa e foram avaliados quanto à história pregressa da doença por meio de ficha elaborada especialmente para a Clínica de Pacientes Portadores de Diabetes.

Exame Físico

Os pacientes foram submetidos a um exame físico no qual foram avaliados: circunferência abdominal, proporção cintura/quadril e peso e altura para obtenção do índice de massa corporal (IMC) de cada indivíduo.

Procedimentos Laboratoriais

Análise laboratorial do controle metabólico

Os pacientes foram encaminhados a um Laboratório de Análises Clínicas para coleta do sangue por punção venosa. Foi utilizado o equipamento COBAS MIRA

plus para realização dos exames: Hemograma (ABX Micros 60), Insulina (método quimioluminescência), Glicemia de Jejum (método Bondar e Mead modificado) (Kit Labtest), HbA1c (método de imunoensaio de inibição turbidimétrica) (Kit Roche) e Proteína C-reativa ultrasensível (método nefelometria).

Coleta das amostras de plasma sanguíneo

Foi coletado de cada paciente no mesmo Laboratório de Análises Clínicas, por meio de punção venosa, sangue em tubo Vacutainer contendo EDTA para posterior análise da expressão gênica.

Separação de leucócitos para análise da expressão gênica

Os tubos Vacutainer contendo o sangue dos pacientes selecionados para os 2 grupos foram mantidos em gelo e os leucócitos do sangue foram separados imediatamente por meio de centrifugações com Ficoll Paque Plus (GE Healthcare) e consecutivas lavagens com Salina (NaCl 0,9%). Uma vez que os pellets de leucócitos foram obtidos, foi realizada sua ressuspensão em TRIzol® (Invitrogen, Carlsbad, CA), e estes então foram armazenados a -80°C para posterior extração do RNA.

Análise da Expressão Gênica

Extração e quantificação de RNA

A extração do RNA total de todas as amostras foi realizada por meio do TRIzol® (Invitrogen, Carlsbad, CA) segundo o protocolo recomendado pelo

fabricante. A purificação das amostras foi realizada pelo kit RNeasy Protection Mini Kit (Qiagen). A concentração do RNA extraído de cada amostra foi mensurada por densidade óptica por espectroscopia (NanoVue Spectrophotometer, GE Healthcare Life Sciences, Oslo, Noruega) e a qualidade do RNA foi checada por eletroforese em gel de agarose a 1%. Foram utilizadas amostras de RNA com razão 260/280 e 260/230 entre 1,8 a 2,2. Todas as amostras de RNA extraídos foram armazenadas a -80°C.

Reações de Transcrição Reversa

Foi sintetizado o DNA complementar (cDNA) de todas as seqüências gênicas expressas por meio do RT-PCR utilizando o Oligo dT₍₂₀₎ com o kit SuperScript III First-Strand Synthesis Super Mix (Invitrogen), de acordo com as instruções do fabricante. Em um microtubo de 0,2 ml o volume de RNA correspondente a concentração de cerca de 460 ng foi acrescido de 1 µl de Oligo dT, 1 µl de Annealing Buffer e água-DEPC ate o volume final de 8 µl. A reação foi incubada a 65°C por 5 minutos. Em seguida, o microtubo foi mantido em gelo por 1 minuto, onde foi acrescentado 10 µl do Mix da Reacao First-Strand e 2 µl do Mix das enzimas SuperScript III/ RNaseOUT. A reação foi incubada a 50°C por 50 minutos, seguido por 85°C por 5 minutos. Assim foi obtido um volume final de 20 µl de cDNA que foi armazenado em freezer -80°C ate sua utilização para as reações de amplificação por PCR (reação em cadeia da polimerase).

Reações de PCR quantitativo em Tempo Real (qRT-PCR)

A expressão quantitativa dos genes foi analisada por meio de reações de PCR em Tempo Real, utilizando-se o sistema SYBR® Green (Applied Biosystems, Foster City). Esse sistema realiza as reações de amplificação e detecção e quantifica as amostras através da fluorescência do SYBR Green que é emitida quando este está ligado à fita dupla do DNA. O DNA complementar sintetizado a partir do RNA mensageiro foi utilizado juntamente com o SYBR Green Mix, como determinado pelo fabricante. Para controle endógeno da reação foi escolhido β -actina para normalizar a expressão dos genes de interesse nas diferentes amostras. Os genes de interesse analisados neste estudo foram: *IL10*, *IL10RA*, *IL10RB*, *JAK1*, *STAT1*, *STAT3*, *SOCS3*, *ICAM1*, *IP10* (Tabela 1). Foi realizada a validação do sistema gene de interesse/controle endógeno, a fim de verificar se as eficiências de amplificação de ambos os genes são semelhantes e próximas a 100% (Figura 2).

Tabela 1. Primers específicos para cada gene (Via de sinalização do gene *IL10*)

Genes	Número de Acesso	Primer		Produto	Tm (°C)
		Tipo	Sequência	Comprimento do Amplicon	
<i>β-Actina</i>	NM_001101.3	F	5' AAGCCACCCCACTTCTCTCTAA 3'	88	58
		R	5' AATTACACGAAAGCAATGCTATCA 3'		
<i>IL10</i>	NM_000572	F	5' GCCAGGGCACCCAGTCT 3'	74	58
		R	5' TCGGAGA TCTCGA AGCA TGTT 3'		
<i>IL10RA</i>	NM_001558	F	5' CGCTCCTGAGGTATGGAATAGAG 3'	115	58
		R	5' GCCCGGT AGCCA TTGCT 3'		
<i>IL10RB</i>	NM_000628	F	5' AA TGGAGTGAGCCTGTCTGTGA 3'	90	58
		R	5' TGAAGACCGAGGCCA TGAG 3'		
<i>JAK1</i>	NM_002227	F	5' GTCACAACCTCTTTGCCCTGTAT 3'	91	58

<i>STAT3</i>	NM_139276	R	5' CGGAGGGACA TCTTGTCA TCA 3'	91	58
		F	5' TGCTGAAATCATCATGGGCTATA 3'		
		R	5' TCCTTGGGAATGTCAGGATAGAG 3'	90	58
<i>SOCS3</i>	NM_003955	F	5' TCCCCCAGAAGAGCCTATT 3'	90	58
		R	5' GTCTTCCGACAGAGA TGCTGAA 3'		
<i>IP10</i>	NM_001504	F	5' ACTGCCCTTCTCA TTTGGAAAC	100	58
		R	5' CCTGGGCTGTGGCTTCA T 3'		
<i>ICAM1</i>	NM_000201	F	5' GAAAA TTCCAGCAGACTCCAA 3'	94	59
		R	5' CGA TGGGCAGTGGGAAAGT 3'		

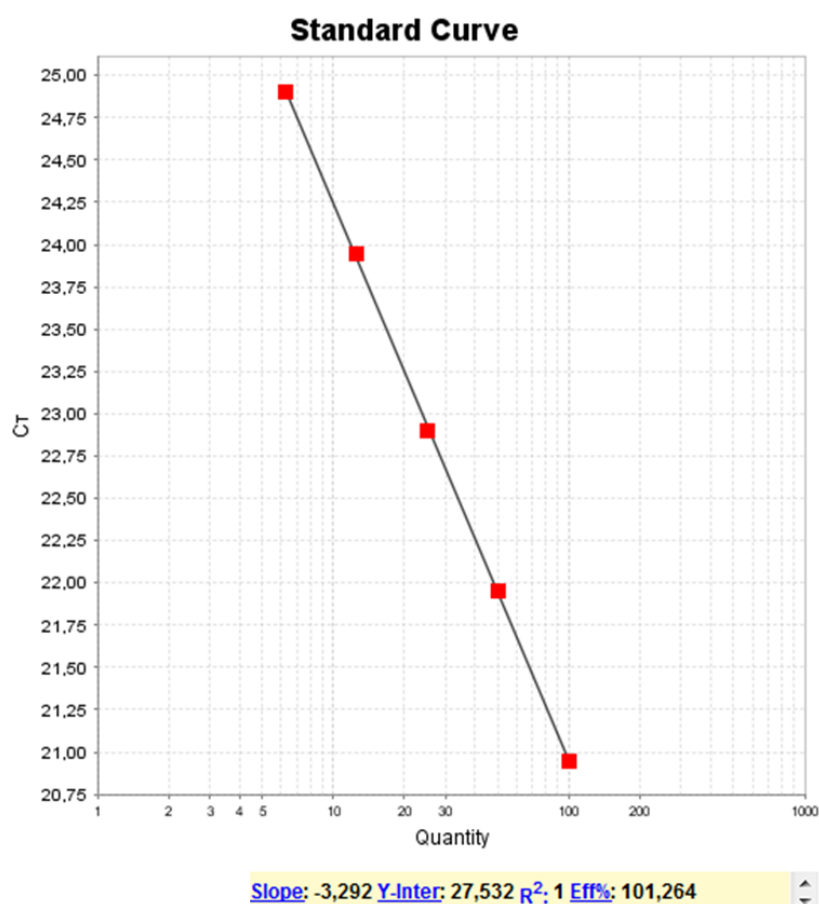


Figura 2. Curva padrão para o gene *IL10* para verificação da eficiência de amplificação por PCR em Tempo Real. A eficiência de amplificação é determinada pela função: $Efic = 10^{(-1/\text{slope})} - 1$.

Para a quantificação relativa do gene selecionado, as reações de RT-qPCR foram realizadas em duplicata a partir de: 12,5µL de SYBR® Green Universal PCR Master Mix 2x, 5,0µL da solução de primers (500nM cada), 2,5µL de água Milli-Q e

5 μ L de cDNA (3ng). As condições de ciclagem utilizadas foram: 50°C por 2 minutos, 95°C por 10 minutos e 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto (Figura 3). Um ciclo final com temperatura crescente de 60 a 95°C (2°C/min), sendo a fluorescência medida a cada 15 segundos, foi empregado para a obtenção de uma curva de dissociação dos produtos da reação, utilizada para a análise da especificidade de amplificação (Figura 4). Os valores da expressão gênica relativa foram obtidos de todas as placas pela análise dos resultados no programa 7500 System SDS Software (Applied Biosystems®, Foster City) e Expression Suite (Applied Biosystems®, Foster City). Os softwares utilizam o método comparativo C_t e possibilitou quantificar com precisão a expressão gênica relativa dos genes analisados. Após normalização pela expressão do gene controle endógeno, foram obtidos os valores de expressão para cada gene alvo (ΔC_t). A média dos valores de ΔC_t de cada gene de interesse (alvo) referente a cada comparação entre os grupos foram comparados entre si.

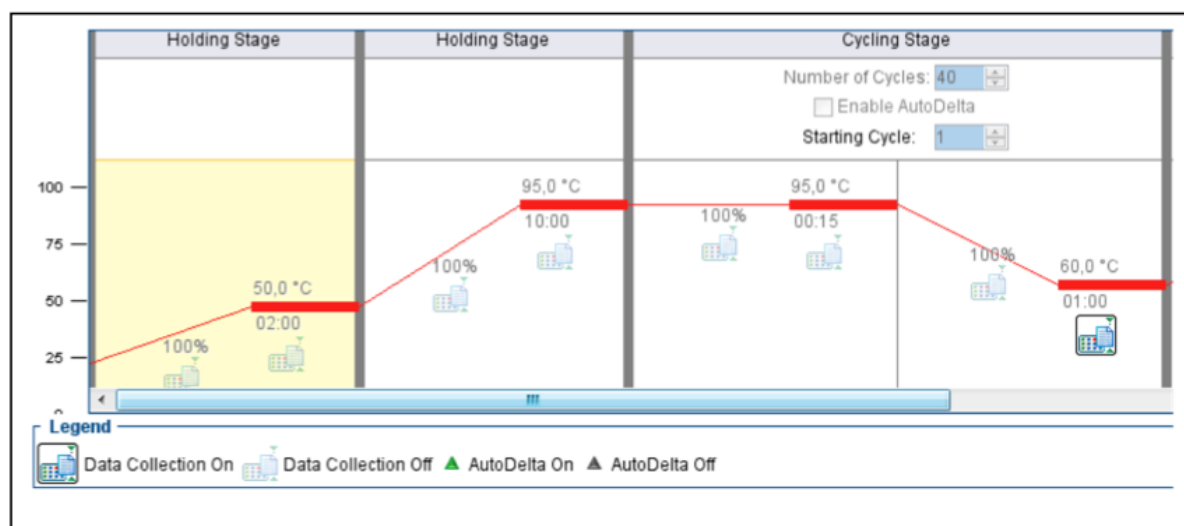


Figura 3. Ciclo térmico da reação de qPCR à qual as amostras foram submetidas.

Análise estatística

Os dados obtidos foram tabulados e a análise estatística foi realizada utilizando o programa GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Inc., USA). A normalidade dos dados foi verificada por meio do teste D'Agostino-Pearson e, então, aplicados os testes paramétricos (teste t-student) ou não paramétricos (Mann-Whitney), para a comparação das médias obtidas entre os dois grupos. O nível de significância estabelecido foi 5%. A hipótese de nulidade foi rejeitada se $p \leq 0.05$.

Resultados

a) Características demográficas e dados relacionados ao Diabetes Mellitus tipo 2

As características demográficas da amostra selecionada estão descritas na Tabela 2, sendo constatado que os dois grupos encontram-se pareados para gênero e idade.

Tabela 2. Características Demográficas

	GRUPO 1 (DM Comp) n=30	GRUPO 2 (DM Descomp) n=30
Gênero (F / M) *	20 / 10	18 / 12
Idade * (Média ± DP)	50.3 (± 6.7)	48.0 (± 7.6)
Etnia		
(branca/parda/negra)	15 / 11 / 4	13 / 10 / 7

* ns-diferença não significativa (Teste Mann-Whitney; $\alpha=5\%$)

Na avaliação dos dados relativos ao diabetes, podemos observar na Tabela 3 que não há diferença entre os grupos quanto ao tempo de diagnóstico e ao número de internações devido à doença. No entanto, o grupo DM descompensado (Grupo 2) apresentou maior número de complicações relacionadas ao diabetes em relação ao grupo DM compensado (Grupo 1), sendo a retinopatia a mais prevalente, seguida pela nefropatia. Em ambos os grupos, os hipoglicemiantes foram os medicamentos mais utilizados para controle do diabetes.

Tabela 3. Dados relativos ao Diabetes

	GRUPO 1 n=30	GRUPO 2 n=30
Tempo de diagnóstico (anos) (Média±DP)	5.2 (± 6.6)	6.2 (± 4.2)
Presença de Complicação associada ao DM	12	19**
Presença de uma complicação	09	09
Presença de mais de uma complicação	03	10
Número de internações	4	6
Medicamentos para controle:		
Hipoglicemiante	15	20
Insulina	1	1
Hipoglicemiante/ Insulina	5	8
Nenhum	9	1

**p< 0.01 (Teste Mann Whitney; $\alpha=5\%$); DP = desvio-padrão

b) Características físicas e laboratoriais (bioquímicas)

As características físicas e laboratoriais dos pacientes estão descritas nas Tabelas 4 e 5. Quanto aos dados do exame físico, todos os parâmetros avaliados (peso (Kg); altura (m); IMC (m/kg²); proporção cintura/quadril (cm) e circunferência abdominal (cm)) não apresentaram diferença significativa entre o grupo 1 (DM compensado) e o grupo 2 (DM descompensado) (Tabela 4).

Tabela 4. Média ($\pm$ Desvio-Padrão) dos dados relativos ao Exame Físico

	GRUPO 1 n=30	GRUPO 2 n=30
Peso (kg)	83.2 ($\pm$ 12.3)	79.8 ($\pm$ 16.2)
Altura (m)	1.6 ($\pm$ 0.1)	1.6 ($\pm$ 0.1)
IMC (m/kg²)	31.4 ($\pm$ 4.1)	30.5 ($\pm$ 5.2)
Proporção Cintura/ Quadril (cm)	1.0 ($\pm$ 0.1)	1.0 ($\pm$ 0.1)
C i r c u n f e r ê n c i a Abdominal (cm)	109.3 ($\pm$ 10.8)	104.3 ($\pm$ 14.6)

(Teste Mann-Whitney; $\alpha=5\%$); DP = desvio-padrão

Os resultados dos parâmetros laboratoriais são descritos na Tabela 5. Em relação à Glicemia de jejum e à Hemoglobina glicada pode-se observar diferença estatisticamente significativa entre os grupos DM compensado (Grupo 1) e DM descompensado (Grupo 2). A avaliação da Insulina e da proteína C-reativa Ultra Sensível não demonstraram resultados estatisticamente diferentes para os grupos avaliados quando da sua comparação (Tabela 5).

Tabela 5. Média ($\pm$ Desvio-Padrão) para Parâmetros Laboratoriais

	GRUPO 1 n=30	GRUPO 2 n=30
Glicemia de Jejum	137.5 ($\pm$ 41.4)	226.6 ($\pm$ 74.2) ^a
HbA_{1c}	6.6 ($\pm$ 0.9)	10.4 ($\pm$ 1.9) ^b
Insulina	21.1 ($\pm$ 21.5)	19.7 ($\pm$ 20.9)
Proteína C-Reativa US	0.7 ($\pm$ 0.6)	0.5 ($\pm$ 0.5)

^a $p < 0.01$ em relação ao grupo 1; ^b $p < 0.0001$ em relação aos grupos 1; (Teste de Mann-Whitney; $\alpha=5\%$); DP = desvio-padrão

c) Avaliação da Expressão Gênica

Pode-se observar por meio da Figura 4, que mostra um único pico na curva de Melting (ou dissociação), que todos os primers empregados neste estudo promoveram a amplificação específica do gene alvo. Após a análise estatística da expressão gênica dos genes de interesse normalizados para a β -Actina, os resultados foram organizados em gráficos de coluna.

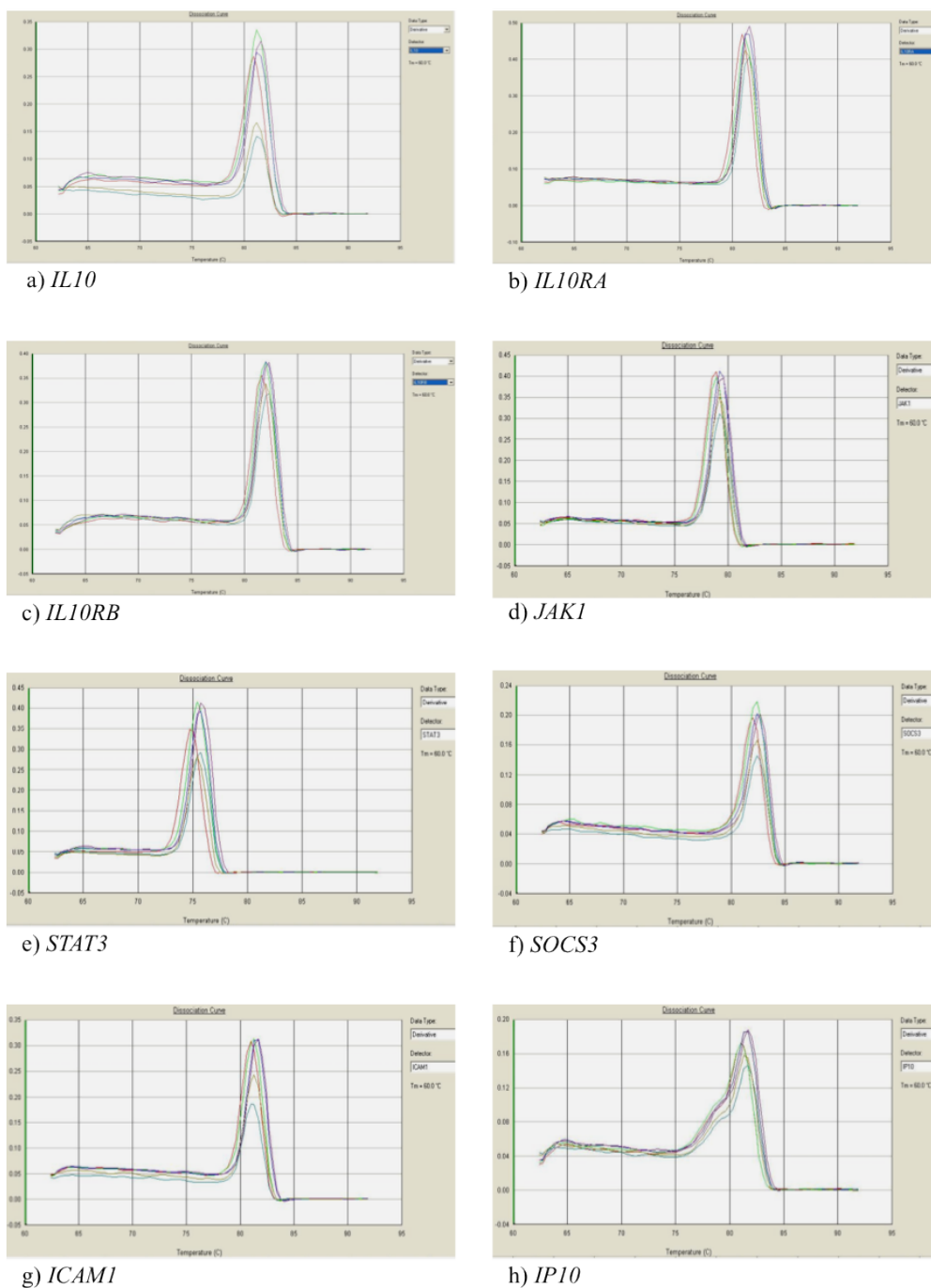


Figura 4. Curvas de dissociação dos genes alvo mostrando um único pico referente ao Tm (temperatura de melting) do respectivo amplicon, o que comprova a especificidade de cada par de primers (via de sinalização do gene *IL10*).

Os genes que apresentaram diferença significativa de expressão gênica entre os grupos DM compensado (Grupo 1) e DM descompensado (Grupo 2) foram

IL10RA, *JAK1*, *STAT3*, *SOCS3* e *ICAM1*. Todos os genes mencionados acima se mostraram mais expressos no grupo DM descompensado (Grupo 2) em comparação ao outro grupo de interesse. Os demais genes (*IL10RB*, *IL10* e *IP10*) não apresentaram diferença significativa em suas expressões na comparação entre os grupos (Figura 5).

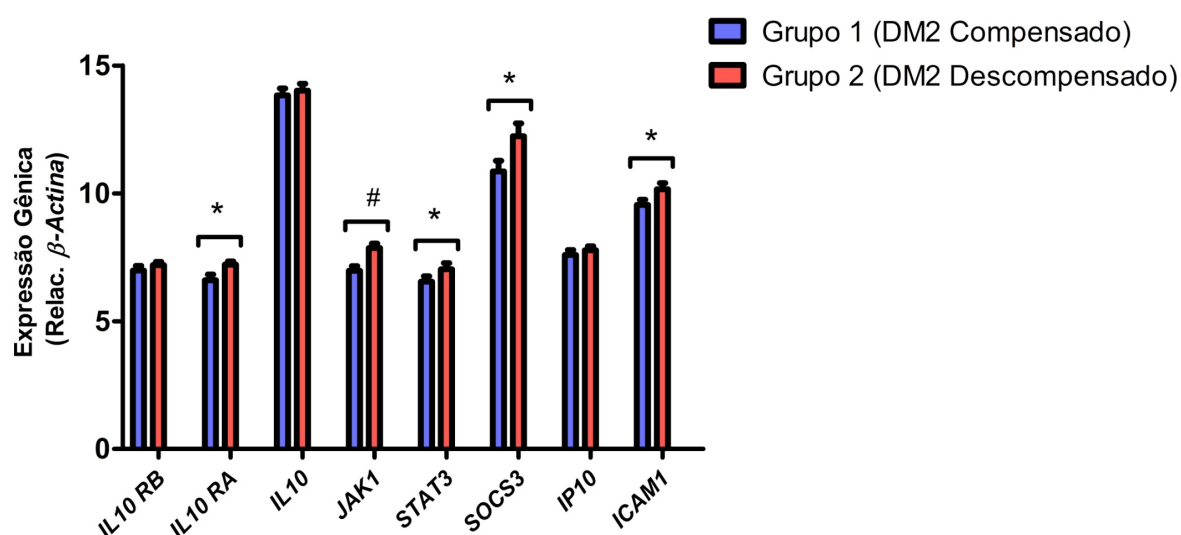


Figura 5. Expressão dos genes *IL10RB*, *IL10RA*, *IL10*, *JAK1*, *STAT3*, *SOCS3*, *IP10* e *ICAM1* nos Grupos 1 e 2. Todos os valores foram normalizados para β -Actina. Dados representam a média $\pm$ DP. * $p \leq 0.05$ em relação ao grupo 1; # $p < 0.0001$ em relação ao grupo 1; (Teste Mann Whitney; $\alpha = 5\%$).

Discussão

Como já mencionado, esse é um estudo inédito investigando a expressão de genes da via *IL10* em pacientes com DM2 compensados e pacientes descompensados metabolicamente. O intuito é compreender melhor as diferenças na expressão genética que possam ocorrer pelo estado de descompensação, servindo futuramente como possíveis alvos para intervenção farmacológica.

Apesar de poucos dados estarem presentes na literatura para possibilitar a discussão dos resultados obtidos neste estudo, as informações mais interessantes prospectadas da literatura que têm relação com nosso trabalho são apresentadas a seguir. Nossos resultados mostraram um aumento na expressão de *SOCS3* em pacientes com DM2 descompensado quando comparado à pacientes com DM2 compensado metabolicamente. Dentre os efeitos da descompensação citados acima, o aumento da produção hepática de glicose pode ser influenciado pela ausência ou resistência à leptina (SCHWARTZ; PORTE, 2005), a qual está associada com o aumento da expressão de *SOCS3* (BJORBAEK et al., 1998). A leptina está relacionada com o controle da ingestão de alimentos por meio de sua atuação no sistema nervoso central (ROMERO; ZANESCO, 2006). Um estudo mostrou que a resistência à insulina em camundongos lipodistróficos pode ser superada pela infusão contínua e sistemática de baixas doses de leptina (SHIMOMURA et al., 1999). Defeitos em apenas uma via de sinalização bioquímica (como por exemplo nas vias *IRS-PI3K* ou *SOCS3*) pode causar resistência às ações neuronais centrais de insulina e leptina levando à hiperfagia, aumento de peso, resistência hepática à insulina e intolerância à glicose (SCHWARTZ; PORTE, 2005). Um estudo mostrou que a administração de leptina em camundongos ob/ob

(obesos) resultou em uma rápida indução da expressão de SOCS3 no hipotálamo. Além disso, a indução da expressão de SOCS3 bloqueou a transdução do sinal mediado por receptores em linhas celulares de mamíferos (BJORBAEK et al., 1998). Camundongos com deficiência de expressão de SOCS3 se mostraram resistentes ao aumento de peso mediado por uma dieta rica em gordura e a sensibilidade à insulina permaneceu (MORI et al., 2004). Outro estudo mostrou que camundongos com deficiência de expressão de SOCS3 apresentavam melhor sensibilidade à insulina e apresentavam melhor homeostase de glicose (KIEVIT et al., 2006).

Considerando a via de sinalização da *IL10*, ativa-se a via JAK-STAT (e consequentemente é induzida a expressão de SOCS3) de duas formas: por meio do receptor *IL10RA* ou *IL10RB*. O receptor *IL10RA* está associado à JAK-1 e o receptor *IL10RB* à JAK-2 (DONNELLY; DICKENSHEETS; FINBLOOMB, 1999). A sugestão de que o SOCS3 faça parte de um *loop* de *feedback* negativo intracelular (BJORBAEK et al., 1998) indicaria uma diminuição na expressão de *JAK1* e/ou *JAK2* e consequentemente *STAT3*. No entanto, existem evidência de que o SOCS3 apresente certa especificidade para *JAK2* (BJORBAEK et al., 1998) inibindo portanto, somente esta parte da via de sinalização. Nossos resultados mostram um aumento na expressão de *IL10RA*, *JAK1* e *STAT3* mas não de *IL10RB*, sendo portanto, coerente com esta teoria.

Uma possibilidade de ação de SOCS-3 é a de inibir a sinalização de receptores de insulina (SCHWARTZ; PORTE, 2005) como o IRS-1 (substrato do receptor de insulina 1), o IRS-2 (substrato do receptor de insulina 2) (UEKI; KONDO; KAHN, 2004) e o IGF-1 (fator de crescimento semelhante à insulina 1) (KREBS; HILTON, 2003), sendo fator adicional para explicar a relação entre resistência à

insulina e à leptina. A via JAK-STAT também está relacionada ao receptor de leptina em que o SOCS-3 se liga à JAK-2, inibindo-a (PAZ-FILHO et al., 2012).

Nossos resultados mostraram também um aumento na expressão de *ICAM1* no grupo dos indivíduos com DM2 descompensado metabolicamente. O *ICAM1* é um gene cuja inibição está relacionada com a expressão de SOCS3 (DONNELLY; DICKENSHEETS; FINBLOOMB, 1999), a qual neste estudo também encontra-se elevada. Uma possível explicação para este achado é que altas concentrações de leptina levem à um aumento na expressão de *ICAM1* (MANUEL-APOLINAR et al., 2013) o qual foi associado, em ação conjunta com B7-1 (grupamento de diferenciação 80), com a destruição de células β do pâncreas e ao desenvolvimento de DM (CAMACHO et al., 2001). No entanto, MANUEL-APOLINAR (2013) sugere que este aumento na expressão de *ICAM1* seja devido à ativação de receptores de leptina. Caso haja resistência à leptina, essa ativação não poderia ocorrer pelos receptores de leptina diretamente.

Todavia, a hiperglicemia foi associada com a indução da expressão de *ICAM1* sendo possível que esta seja uma consequência da dislipidemia (PARK et al., 2000). Quando comparamos hiperglicemia constante ou periódica, um estudo mostrou que uma alta concentração de glicose periodicamente leva à aumentos maiores na expressão de *ICAM1* em células endoteliais de artérias coronárias humanas (LIU et al., 2013). O ICAM-1 também está associado com um dos efeitos da descompensação, a retinopatia diabética, uma complicação que acomete cerca de 60% dos pacientes com DM2 (ESTEVES et al., 2008). Dois estudos mostraram uma relação positiva entre *ICAM1* e a complicação do DM2 (LIU et al, 2006; KAMIUCHI et al, 2002). O aumento de ICAM-1 solúvel se torna importante uma vez que a

adesão de monócitos circulantes é necessária para o início do processo de lesões ateroscleróticas precoces (LIU et al., 2013).

Constatamos que até o presente momento não há nenhum estudo que investigou a expressão dos genes *IL10*, seus receptores e outros genes de sinalização intracelular dessa via em indivíduos com DM2 descompensados e compensados metabolicamente. Assim, mais estudos são necessários para buscar reproduzir os resultados aqui apresentados. Consideramos a avaliação dos níveis de leptina e da expressão gênica de *JAK-2*, bem como a verificações dos níveis de expressão gênica dos genes de uma via de uma citocina pró-inflamatória, essenciais para ajudar a avaliar as sugestões apresentadas.

Em continuidade a este estudo, pretende-se verificar se há correlação entre os níveis de expressão gênica observados com as características físicas e laboratoriais dos pacientes. Idealmente, seria interessante avaliar maior número de pacientes e inclusive de outras etnias, apresentando diferentes complicações advindas do DM2, para tentar melhorar o entendimento de como essa patologia pode influenciar a expressão de importantes genes do sistema imune no contexto da compensação/descompensação metabólica. Esse conhecimento pode abrir portas para a identificação de possíveis novos alvos farmacêuticos para o controle do DM2 ou diminuição dos seus efeitos danosos no organismo.

Conclusão

De acordo com o objetivo proposto e os resultados encontrados foram obtidas as seguintes conclusões:

- Os genes *IL10RA*, *JAK1*, *STAT3*, *SOCS3* e *ICAM1* apresentaram uma maior expressão gênica no grupo de indivíduos com DM2 descompensado metabolicamente;
- Os genes *IL10RB*, *IL10* e *IP10* não apresentaram uma diferença de expressão significativa entre pacientes com DM2 compensado e descompensado metabolicamente.

Referências Bibliográficas

ABBAS, A.; LICHTMAN, A.; POBER, J. **Mecanismos das respostas imunes**. 5º ed.

Rio de Janeiro: Elsevier, 2005.

ALBERTI, K. G. Z., P. Z. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation. **Diabetic Medicine**, v. 15, n. 7, p. 539-53, jul 1998.

BATES, S. H.; MYERS, M. G. The role of leptin-->STAT3 signaling in neuroendocrine function: an integrative perspective. **Journal of Molecular Medicine (Berl)**, v. 82, n. 1, p. 12-20, jan 2004.

BJORBAEK, C. et al. Identification of SOCS-3 as a potential mediator of central leptin resistance. **Molecular Cell**, v. 1, n. 4, p. 619-25, mar 1998.

BROWNLEE, M. Glycation and diabetic complications. **Journal of the Pakistan Medical Association**, v. 43, p. 1835–1843, 1991.

CAMACHO, S. A. et al. A key role for ICAM-1 in generating effector cells mediating inflammatory responses. **Nature Immunology**, v. 2, n. 6, p. 523-9, jun 2001.

DONNELLY, R. P.; DICKENSHEETS, H.; FINBLOOM, D. S. The interleukin-10 signal transduction pathway and regulation of gene expression in mononuclear phagocytes. **Journal of Interferon & Cytokine Research**, v. 19, n. 6, p. 563-73, jun 1999.

DUARTE, P. M. et al. Expression of immune-inflammatory markers in sites of chronic periodontitis in patients with type 2 diabetes. **Journal of Periodontology**, v. 83, n. 4, p. 426-34, abr 2012.

DUARTE, P. M. et al. Diabetes modulates gene expression in the gingival tissues of patients with chronic periodontitis. **Oral Diseases**, v. 13, n. 6, p. 594-9, nov 2007.

ESTEVEZ, J. et al. Fatores de risco para retinopatia diabética. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 52, p. 431-441, 2008.

FAROOQI, I. S. et al. Beneficial effects of leptin on obesity, T cell hyporesponsiveness, and neuroendocrine/metabolic dysfunction of human congenital leptin deficiency. **Journal of Clinical Investigation**, v. 110, n. 8, p. 1093-103, Oct 2002.

FOSS-FREITAS, M. F. M. Cetoacidose diabética e estado hiperglicêmico hipersmolar. **Medicina, Ribeirão Preto**, v. 36, p. 389-393, 2003.

FUJIHASHI, K. et al. Cytokines and periodontal disease: immunopathological role of interleukins for B cell responses in chronic inflamed gingival tissues. **Journal of Periodontology**, v. 64, n. 5 Suppl, p. 400-6, maio 1993.

GACKA, M. et al. Proinflammatory and atherogenic activity of monocytes in type 2 diabetes. **Journal of Diabetes and its Complications**, v. 24, n. 1, p. 1-8, jan-fev 2010.

GARCIA-HERNANDEZ, A. et al. High glucose concentrations alter the biomineralization process in human osteoblastic cells. **Bone**, v. 50, n. 1, p. 276-88, jan 2012.

GOLUB, L. M. N., G. A.; IACONO, V. J.; RAMAMURTHY, N. S. In vivo crevicular leukocyte response to a chemotactic challenge: inhibition by experimental diabetes. **Infection and Immunity**, v. 37, n. 3, p. 1013-20, set 1982.

GOMES, M. A. et al. Levels of immunoglobulin A1 and messenger RNA for interferon gamma and tumor necrosis factor alpha in total saliva from patients with diabetes mellitus type 2 with chronic periodontal disease. **Journal of Periodontal Research**, v. 41, n. 3, p. 177-83, jun 2006.

GROSS, J. L. et al. Diabetes Melito: Diagnóstico, Classificação e Avaliação do Controle Glicêmico. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 46, p. 16-26, 2002.

HAIYAN, L. E., LINDHOLM; PETER, ALMGREN; ÅSA, GUSTAFSSON; CAROL, FORSBLOM; LEIF, GROOP; TIINAMAIJA, TUOMI. Possible Human Leukocyte Antigen-Mediated Genetic Interaction between Type 1 and Type 2 Diabetes. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, 2001.

HILTON, D. J. et al. Twenty proteins containing a C-terminal SOCS box form five structural classes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 95, n. 1, p. 114-9, jan 6 1998.

IACOPINO, A. M. Diabetic periodontitis: possible lipid-induced defect in tissue repair through alteration of macrophage phenotype and function. **Oral Diseases**, v. 1, n. 4, p. 214-29, dez 1995.

ITO, S. et al. Interleukin-10 inhibits expression of both interferon alpha- and interferon gamma- induced genes by suppressing tyrosine phosphorylation of STAT1. **Blood**, v. 93, n. 5, p. 1456-63, mar 1 1999.

JIN, T.; LIU, L. The Wnt signaling pathway effector TCF7L2 and type 2 diabetes mellitus. **Molecular Endocrinology**, v. 22, n. 11, p. 2383-92, nov 2008.

KAMIUCHI, K. et al. Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) polymorphism is associated with diabetic retinopathy in Type 2 diabetes mellitus. **Diabetic Medicine**, v. 19, n. 5, p. 371-6, maio 2002.

KIEVIT, P. et al. Enhanced leptin sensitivity and improved glucose homeostasis in mice lacking suppressor of cytokine signaling-3 in POMC-expressing cells. **Cell Metabolism**, v. 4, n. 2, p. 123-32, ago 2006.

KING, G. L. et al. Cellular and molecular abnormalities in the vascular endothelium of diabetes mellitus. **Annual Review of Medicine**, v. 45, p. 179-88, 1994.

KREBS, D. L.; HILTON, D. J. A new role for SOCS in insulin action. Suppressor of cytokine signaling. **Science Signal Transduction Knowledge Environment**, v. 2003, n. 169, p. PE6, fev 11 2003.

LICINIO, J. et al. Phenotypic effects of leptin replacement on morbid obesity, diabetes mellitus, hypogonadism, and behavior in leptin-deficient adults. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 13, p. 4531-6, Mar 30 2004.

LIU, L. et al. Association of intercellular adhesion molecule 1 polymorphisms with retinopathy in Chinese patients with Type 2 diabetes. **Diabetic Medicine**, v. 23, n. 6, p. 643-8, jun 2006.

LIU, T. et al. Periodic vs constant high glucose in inducing pro-inflammatory cytokine expression in human coronary artery endothelial cells. **Inflammation Research**, v. 62, n. 7, p. 697-701, jul 2013.

MAGEE, M. F.; BHATT, B. A. Management of decompensated diabetes. Diabetic ketoacidosis and hyperglycemic hyperosmolar syndrome. **Critical Care Clinics**, v. 17, n. 1, p. 75-106, jan 2001.

MAHMOODZADEH SAGHEB, M. et al. The effects of Leptin and Adiponectin on Pdx1, Foxm1, and PPARgamma Transcription in Rat Islets of Langerhans. **Hepatitis Monthly**, v. 13, n. 6, p. e9055, 2013.

MANTZOROS, C. S.; FLIER, J. S. Editorial: leptin as a therapeutic agent--trials and tribulations. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 85, n. 11, p. 4000-2, Nov 2000.

MANUEL-APOLINAR, L. et al. Leptin mediated ObRb receptor increases expression of adhesion intercellular molecules and cyclooxygenase 2 on murine aorta tissue inducing endothelial dysfunction. **International Journal of Clinical and Experimental Medicine**, v. 6, n. 3, p. 192-6, 2013.

MORI, H. et al. Socs3 deficiency in the brain elevates leptin sensitivity and confers resistance to diet-induced obesity. **Nature Medicine**, v. 10, n. 7, p. 739-43, jul 2004.

MUOIO, D. M.; NEWGARD, C. B. Mechanisms of disease: molecular and metabolic mechanisms of insulin resistance and beta-cell failure in type 2 diabetes. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 9, n. 3, p. 193-205, mar 2008.

O'CONNELL, P. A. et al. Effects of periodontal therapy on glycemic control and inflammatory markers. **Journal of Periodontology**, v. 79, n. 5, p. 774-83, maio 2008.

OKADA, H.; MURAKAMI, S. Cytokine expression in periodontal health and disease. **Critical Reviews in Oral Biology & Medicine**, v. 9, n. 3, p. 248-66, 1998.

ORTIZ, M. C.; ZANETTI, M. L. [Diabetes mellitus: risk factors an a teaching institution in the health area]. **Revista Latino-Americana de Enfermagem**, v. 8, n. 6, p. 128-32, dez 2000.

PARK, C. W. et al. High glucose-induced intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression through an osmotic effect in rat mesangial cells is PKC-NF-kappa B-dependent. **Diabetologia**, v. 43, n. 12, p. 1544-53, dez 2000.

PAZ-FILHO, G. et al. Leptin: molecular mechanisms, systemic pro-inflammatory effects, and clinical implications. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 56, p. 597-607, 2012.

REAVEN, G. M. Banting lecture 1988. Role of insulin resistance in human disease. **Diabetes**, v. 37, n. 12, p. 1595-607, dez 1988.

REBOUL, J. et al. Comparative genomic analysis of the interferon/interleukin-10 receptor gene cluster. **Genome Research**, v. 9, n. 3, p. 242-50, mar 1999.

REIS, A.; VELHO, G. Bases Genéticas do Diabetes Mellitus Tipo 2. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 46, n. 4, p. 426-432, 2002.

ROMERO, C. E. M.; ZANESCO, A. O papel dos hormônios leptina e grelina na gênese da obesidade. **Revista de Nutrição**, v. 19, p. 85-91, 2006.

SACKS, H. S. et al. Inflammatory genes in epicardial fat contiguous with coronary atherosclerosis in the metabolic syndrome and type 2 diabetes: changes associated with pioglitazone. **Diabetes Care**, v. 34, n. 3, p. 730-3, mar 2011.

SAÏ, P. G. E. Spontaneous animal models for insulin-dependent diabetes (type 1 diabetes). **Veterinary Research**, v. 28, n. 3, p. 223-229, 1997.

SALVI, G. E. Y., B.; COLLINS, J. G.; JONES, B. H.; SMITH, F. W.; ARNOLD, R. R.; OFFENBACHER, S. Inflammatory mediator response as a potential risk marker for periodontal diseases in insulin-dependent diabetes mellitus patients. **Journal of Periodontology**, v. 68, n. 2, p. 127-35, fev 1997.

SARTORELLI, D. S.; FRANCO, L. J.; CARDOSO, M. A. Intervenção nutricional e prevenção primária do diabetes mellitus tipo 2: uma revisão sistemática. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 22, p. 7-18, 2006.

SAXENA, R. et al. Genome-wide association analysis identifies loci for type 2 diabetes and triglyceride levels. **Science**, v. 316, n. 5829, p. 1331-6, jun 1 2007.

SCHWARTZ, M. W.; PORTE, D. Diabetes, Obesity, and the Brain. **Science**, v. 307, n. 5708, p. 375-379, January 21, 2005.

SHIMOMURA, I. et al. Leptin reverses insulin resistance and diabetes mellitus in mice with congenital lipodystrophy. **Nature**, v. 401, n. 6748, p. 73-6, set 2 1999.

SLIGH, J. E., JR. et al. Inflammatory and immune responses are impaired in mice deficient in intercellular adhesion molecule 1. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 90, n. 18, p. 8529-33, set 15 1993.

SOLINI, A. et al. Soluble human leukocyte antigen-g expression and glucose tolerance in subjects with different degrees of adiposity. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 95, n. 7, p. 3342-6, jul 2010.

UEKI, K.; KONDO, T.; KAHN, C. R. Suppressor of cytokine signaling 1 (SOCS-1) and SOCS-3 cause insulin resistance through inhibition of tyrosine phosphorylation of insulin receptor substrate proteins by discrete mechanisms. **Molecular and Cellular Biology**, v. 24, n. 12, p. 5434-46, jun 2004.

UETA, E. O., T.; YONEDA, K.; YAMAMOTO, T. Prevalence of diabetes mellitus in odontogenic infections and oral candidiasis: an analysis of neutrophil suppression. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v. 22, n. 4, p. 168-74, abr 1993.

WANG, J. S. et al. Influence of high blood glucose fluctuation on endothelial function of type 2 diabetes mellitus rats and effects of Panax Quinquefolius Saponin of stem and leaf. **Chinese Journal of Integrative Medicine**, v. 19, n. 3, p. 217-22, mar 2013.

WINBLAD, B. Piracetam: a review of pharmacological properties and clinical uses. **CNS Drug Reviews**, v. 11, n. 2, p. 169-82, 2005.

WONG, P. K. et al. SOCS-3 negatively regulates innate and adaptive immune mechanisms in acute IL-1-dependent inflammatory arthritis. **Journal of Clinical Investigation**, v. 116, n. 6, p. 1571-81, jun 2006.

YAGHINI, N. et al. Serum levels of interleukin 10 (IL-10) in patients with type 2 diabetes. **Iranian Red Crescent Medical Journal**, v. 13, n. 10, p. 752, out 2011.

YAMAMOTO, M. et al. Molecular and cellular mechanisms for periodontal diseases: role of Th1 and Th2 type cytokines in induction of mucosal inflammation. **Journal of Periodontal Research**, v. 32, n. 1 Pt 2, p. 115-9, Jan 1997.

YAN, S. D. et al. Enhanced cellular oxidant stress by the interaction of advanced glycation end products with their receptors/binding proteins. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 269, n. 13, p. 9889-97, abr 1 1994.

Anexo

Certificado de aprovação deste estudo pelo CEP.



Dados Finais

De acordo,

A handwritten signature in black ink, reading "Raquel Mantuaneli Scarel Caminaga", is displayed on a light gray rectangular background.

Profa. Dra. Raquel Mantuaneli Scarel Caminaga

Bárbara Scoralick Villela