



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCIÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA APLICADA À SAÚDE

ANNA PAULA DE OLIVEIRA SOUZA

**AVALIAÇÃO DO PERFIL DE EXPRESSÃO DE GENES DA VIA MODULATÓRIA
DO FOXP3 EM DIABETES MELLITUS TIPO II**

Recife

2018

ANNA PAULA DE OLIVEIRA SOUZA

**AVALIAÇÃO DO PERFIL DE EXPRESSÃO DE GENES DA VIA MODULATÓRIA
DO FOXP3 EM DIABETES MELLITUS TIPO II**

Recife

2018

ANNA PAULA DE OLIVEIRA SOUZA

**AVALIAÇÃO DO PERFIL DE EXPRESSÃO DE GENES DA VIA MODULATÓRIA
DO FOXP3 EM DIABETES MELLITUS TIPO II**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Aplicada à Saúde do Centro de Biociências da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos parciais para a obtenção do título de Mestre em Biologia Aplicada à Saúde.

Área de concentração: Ciências Biológicas I

Orientador: Prof. Dr. Rafael Lima Guimarães

Co-orientadoras: Prof^a. Dr^a. Jaqueline de Azevêdo Silva

Dr^a Camilla Albertina Dantas de Lima

Recife

2018

Catálogo na fonte:
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia - CRB-4/1788

Souza, Anna Paula de Oliveira

Avaliação do perfil de expressão de genes da via modulatória do FOXP3 em diabetes mellitus tipo II / Anna Paula de Oliveira Souza. – 2018.

69 f. : il.

Orientador: Prof. Dr. Rafael Lima Guimarães.

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Jaqueline de Azevêdo Silva.

Coorientadora: Dr^a Camilla Albertina Dantas de Lima.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-graduação em Biologia Aplicada à Saúde, Recife, 2018.

Inclui referências.

1. Diabetes. 2. Glândulas endócrinas - Doenças. 3. I. Guimarães, Rafael Lima (Orientador). II. Silva, Jaqueline de Azevêdo (Coorientadora). III. Lima, Camilla Albertina de (Coorientadora). IV. Título.

616.462

CDD (22.ed.)

UFPE/CB – 2018 - 493

ANNA PAULA DE OLIVEIRA SOUZA

**AVALIAÇÃO DO PERFIL DE EXPRESSÃO DE GENES DA VIA MODULATÓRIA
DO FOXP3 EM DIABETES MELLITUS TIPO II**

Dissertação apresentada a Universidade
Federal de Pernambuco, para obtenção do
título de Mestre em Biologia Aplicada à saúde.

Aprovada em: 14/03/2018

BANCA EXAMINADORA

Prof.^ª. Dr.^ª. Jaqueline Azevêdo Silva

Instituição: Universidade Federal de Pernambuco

Assinatura: _____

Prof.Dr. Luydson Richardson Silva Vasconcelos

Instituição: Universidade Federal de Pernambuco

Assinatura: _____

Prof.^ª. Dr.^ª. Paula Sandrin Garcia

Instituição: Universidade Federal de Pernambuco

Assinatura: _____

AGRADECIMENTOS

A Deus por ser uma eterna fonte de força e amor;

À minha mãe, Sueli, pela compreensão, incentivo, paciência e amor;

Ao meu pai, Paulo, pelo carinho;

Ao meu irmão, Pedro, pela alegria, companheirismo, amizade e torcida;

A minha irmã, Luciana, pela colaboração e apoio;

Aos meus avós, Severino (*in memoriam*), Maria Luiza e Miguel pelo amor, assistência e dedicação;

Ao meu noivo e amigo, Anderson, pelo apoio, paciência e amor. Obrigada por ser um grande companheiro, por entender e colaborar durante toda esta caminhada;

Às minhas queridas amigas, Elaine e Sâmara, pela torcida e carinho; vocês foram essenciais;

A minha co-orientadora, Camilla Lima, pela essencial contribuição científica no desenvolvimento deste trabalho. Por todos os ensinamentos, paciência, colaboração, carinho e disponibilidade. Obrigada por todo cuidado e dedicação no desenvolvimento deste trabalho e da minha formação acadêmica;

A minha amiga, Aparecida Seabra, pela atenção e incentivo;

Aos meus amigos e companheiros do mestrado, Aline, Luiz, Geilza, Mirella, Priscilla e Wilson, pela companhia e amizade durante esta fase;

A minha co-orientadora, Jaqueline Azevêdo, pela contribuição no desenvolvimento e finalização deste projeto;

A meu orientador, Rafael Guimarães, pela parceria;

A todo o grupo de autoimunidade pela parceria de sempre;

Aos meus companheiros da pesquisa em osteoporose, Francilene, Werbson e Maria Luiza pelo apoio e companheirismo;

Aos todos os colaboradores do grupo Patgen, em especial, Leandro, Jéssica, Wlisses e Eduardo pelo companheirismo, disponibilidade e respeito;

À Camilla Rodrigues pela parceria indispensável a realização desta pesquisa;

Aos pacientes e colaboradores que aceitaram participar desta pesquisa;

Ao secretário do PPGBAS, Fábio, pela dedicação e assistência;

Aos todos os colaboradores do LIKA, em especial, Edson e Vera, pela atenção;

As agências de fomento que permitiram a realização deste estudo;

Por fim agradeço a todos que contribuíram de forma direta ou indireta para o desenvolvimento deste trabalho.

RESUMO

O Diabetes Mellitus Tipo 2 (DM2) é um distúrbio crônico do metabolismo da glicose caracterizado por hiperglicemia. O descontrole nos níveis glicêmicos presentes em indivíduos acometidos por esta doença é decorrente à resistência insulínica muitas vezes associada à deficiência na produção e liberação deste hormônio. O envolvimento do sistema imune no processo patológico do DM2 é evidenciado pela participação de mediadores inflamatórios na desregulação metabólica e pela inflamação sistêmica crônica presentes na doença. O gene FOXP3 codifica o fator de transcrição Foxp3, envolvido na regulação de respostas imunes, que, em níveis alterados, está relacionado a lesões inflamatórias sistêmicas mediadas pelo sistema imune devido escassez de células T regulatórias (Treg). Considerando o papel determinante do Foxp3 na regulação do sistema imune e a participação deste na patogênese do DM2; neste trabalho, avaliamos os níveis de expressão do mRNA dos genes STAT3, FOXP3 e do receptor da interleucina 6 (IL6R) em amostras de sangue total periférico e cultura de células mononucleares do sangue periférico (PBMC) em indivíduos diabéticos e grupo controle. A quantificação do mRNA de todas as amostras foi realizada através da técnica de RT-qPCR. Adicionalmente foi realizada a seleção dos melhores genes de referência para normalização dos dados avaliados no estudo. Nossos resultados mostraram associação estatística entre o aumento dos níveis de mRNA (77.21, 26.40 e 6.83 fold change) para os genes IL6R, STAT3 e FOXP3, respectivamente, em amostras de sangue total de indivíduos diabéticos quando comparados a controles saudáveis (p-value <0.0001). Observou-se também elevação na expressão destes genes na análise *in vitro* em amostras de indivíduos com DM2 não estimuladas e estimuladas com altas concentrações de D-glucose. Assim, podemos concluir que pacientes com DM2 apresentam alterações nos níveis de expressão gênica de moléculas da via do FoxP3, sendo observada também associação entre níveis altos de glicose e o aumento da expressão de genes desta via.

Palavras-chave: *FOXP3*. *STAT*. *IL6R*. DM2.

ABSTRACT

Type 2 Diabetes mellitus (T2D) is a chronic disorder of glucose metabolism characterized by hyperglycemia. The lack of control in the glycemic levels present in T2D individuals is due to the insulin resistance often associated of production and release deficient this hormone. The involvement of the immune system in the pathological process of T2D is recognized due inflammatory mediators participation in metabolic dysregulation and by chronic systemic inflammation presented in T2D. The Foxp3 protein is a transcriptional regulator coding for FOXP3 gene involved in the immune responses regulation, alteration in Foxp3 levels related to systemic inflammatory lesion due regulatory T cells paucity. Considering the Foxp3 decisive role in immune system regulation and involvement of the immune system in the T2D pathogenesis, this study evaluated the Signal transducer and activator of transcription 3 (*STAT3*), *FOXP3* and interleukin 6 receptor (*IL6R*) mRNA levels in whole blood samples and peripheral blood mononuclear cells (PBMC) culture from T2D individuals and control group. Quantification of mRNA was performed using the RT-qPCR technique. In addition, the selection of the best reference genes for the normalization of the data evaluated was performed. Our results showed a statistical association between increased mRNA levels (77.21, 26.40 and 6.2 fold change) for the *IL6R*, *STAT3* and *FOXP3* genes, respectively, in diabetic subjects in whole blood samples when compared to healthy controls ($p < 0.0001$). Elevation in the expression of these genes was also observed in *in vitro* analysis on unstimulated and stimulated samples with high concentrations of D-glucose. Thus, we can conclude that T2D patients present alterations in the gene expression levels of FoxP3 pathway molecules, being also observed correlation between the high levels of glucose and the increase of the expression of the evaluated genes in this way.

Keywords: *FOXP3*. *STAT3*. *IL6R*. T2D.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1-	Porcentagens de indivíduos afetados pelo DM em diferentes faixas etárias.....	19
Figura 2-	Incidência de diabetes mellitus nas diferentes regiões do Brasil.....	20
Figura 3-	Ranking dos países com maior número de indivíduos diabéticos com idades entre 20 e 79 anos, em 2015 e projeção para 2040.....	21
Figura 4-	Proporção de complicações relacionadas ao DM em 2013.....	22
Figura 5-	Relação entre a resistência insulínica e ativação de células do sistema imunológico.....	29
Figura 6-	Perfil quantitativo e qualitativo das células do sistema imune em indivíduos de peso corporal normal e obesos, e relação entre o perfil lipídico e imunológico envolvido no processo de resistência insulínica...	32
Figura 7-	Perfis dos linfócitos T CD4+ envolvidos na inflamação resultante no diabetes mellitus tipo 2.....	34
Figura 8-	Ação da via da interleucina 6 (IL-6) sob receptor de insulina (IRS-1).....	35
Figura 9-	Formação do complexo IL-6/IL-6R/gp130 e diferenciação das células T naíve.....	37
Figura 10-	Inibição da transcrição do gene FOXP3 em resposta ao predomínio da Stat3 em resposta a ligação da interleucina 6 (IL-6) a seu receptor (IL-6R).....	38
Figura 11-	Transição de células T regulatórias (Treg) para células exFOXP3 e relação de retroalimentação positiva entre exFOXP3 e a autoimunidade....	40
Figura 12-	Diferenciação de linfócitos T naíve em linfócitos Th17 ou T regulatórios de acordo com a presença ou ausência do Stat3, em resposta a liberação de citocinas.....	41

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1-	Expressão gênica representando os níveis de mRNA em Fold Change em indivíduos com DM2 e controles saudáveis em amostra de sangue total periférico.....	51
Gráfico 2-	Expressão gênica representando os níveis de mRNA em Fold Change em indivíduos com DM2 e controles saudáveis em cultivo de PBMC de pacientes com DM2 e indivíduos saudáveis.....	52
Gráfico 3-	Expressão gênica representando os níveis de mRNA em Fold Change em indivíduos com DM2 e controles saudáveis em cultivo de PBMC's estimuladas com D-glucose.....	53
Gráfico 4-	Comparação intragrupo dos níveis de expressão gênica representando os níveis de mRNA em Fold Change em indivíduos com DM2 e controles saudáveis em cultivo de PBMC's sem estímulos.....	54
Gráfico 5-	FC dos níveis de expressão gênica intragrupo em PBMC's de controles saudáveis e indivíduos com DM2.....	55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Gene avaliado, sequência do primer e código da sonda.....	45
Tabela 2-	Tabela 1: Gene e molécula codificada.....	46
Tabela 3-	Sequência dos primers e identificação das sondas de PCR e eficiência dos genes candidatos e gene alvo.....	47
Tabela 4-	Valor de M para todos os potenciais genes de referência.	51

LISTA DE SIGLAS

18S rRNA	Gene 18S ribossomal RNA
AAEC	Do inglês: <i>American Association of Clinical Endocrinologists</i> (Associação Americana de Endocrinologistas Clínicos)
ACTB	Do inglês: Actin beta (Beta actina)
ADA	Do inglês: American Diabetes Association (Associação americana de diabetes)
AGE	Do inglês: Advanced Glycation End Products (Produtos finais da glicação avançada)
B2M	Do inglês: Beta-2-microglobulin (Beta-2-globulina)
CD	Do inglês: Cluster differentiation (Cluster de diferenciação)
cDNA	DNA complementar
Ct	Do inglês: Cycle threshold (Limiar do ciclo)
DAMPS	Do inglês: Damage-associated molecular patterns (Padrões moleculares associados ao dano)
DM	Diabetes Mellitus
DM1	Diabetes Mellitus Tipo 1
DM2	Diabetes Mellitus Tipo 2
ExFOXP3 Cell	Células exFOXP3
FOXP3	Gene Forkhead box P3
foxP3	Proteína Forkhead box P3
G6PD	Glicose-6-fosfato desidrogenase
GAPDH	Do inglês: Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase)

gp130	Glicoproteína 130
GUSB	Glucuronidase beta
HAS	Hipertensão Arterial Sistêmica
HDL	Do inglês: High-density lipoprotein (Lipoproteína de alta densidade)
HPRT1	Do inglês: Hypoxanthine Phosphoribosyltransferase 1 (Hipoxantina fosfotransferase 1)
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IDF	Do inglês: International Diabetes Federation (Federação Internacional de Diabetes)
IL	Interleucina
IL-1B	Gene codificante da interleucina 1 beta
IL-23R	Gene codificante do receptor da interleucina 23
<i>IL6</i>	Gene codificante da interleucina 6
<i>IL6R</i>	Gene do receptor da interleucina 6
INF- γ	Interferon-gamma
iNKT cell	Célula natural killer invariante
JAK1	Janus Kinase 1
JNK	c-Jan N-terminal Protein Kinase
LES	Lúpus Eritematoso Sistêmico
MBE	Medicina Baseada em Evidência
mRNA	Ácido Ribonucléico mensageiro
NF	Do inglês: Normalization Factor (Fator de Normalização)
OMS	Organização Mundial da Saúde

PBMC	Do inglês: Peripheral Blood Mononuclear Cells (Células mononucleares do sangue periférico)
PCR	Proteína C reativa
PKC	Proteína Kinase C
SBD	Sociedade Brasileira de Diabetes
STAT	Do inglês: Signal Transducers and Activators of Transcription (Sinal tradutor e ativador de transcrição)
T1D	Do inglês: Type 1 Diabetes Mellitus (Diabetes Mellitus Tipo 1)
T2D	Do inglês: Type 2 Diabetes Mellitus (Diabetes Mellitus Tipo 2)
Th	T helper
TNF- α	Do inglês: Tumor Necrosis Factor alfa (Fator de Necrose Tumoral alfa)
Treg	Linfócito T regulatório

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	17
1.1	OBJETIVOS.....	18
1.1.1	Objetivo geral.....	18
1.1.2	Objetivos específicos.....	18
1.2	JUSTIFICATIVA.....	18
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	20
2.1	EPIDEMIOLOGIA DO DIABETES MELLITUS TIPO 2 NO BRASIL E NO MUNDO.....	20
2.2	CLASSIFICAÇÃO DIABETES MELLITUS TIPO 2.....	23
2.3	DIAGNÓSTICO E TERAPIA DO DIABETES MELLITUS TIPO 2.....	24
2.4	COMORBIDADES RELACIONADAS AO DIABETES MELLITUS TIPO 2.....	25
2.5	FATORES DE RISCO PARA O DESENVOLVIMENTO DIABETES MELLITUS TIPO 2.....	27
2.5.1	Resposta imune e Diabetes Mellitus Tipo 2.....	31
2.5.2	IL-6 e mecanismos fisiopatológicos do Diabetes Mellitus Tipo 2.....	35
2.5.3	STAT3 e mecanismos fisiopatológicos do Diabetes Mellitus Tipo 2.....	37
2.5.4	FoxP3 e mecanismos fisiopatológicos do Diabetes Mellitus Tipo 2.....	40
3	METODOLOGIA.....	44
3.1	TIPO DE ESTUDO.....	44
3.2	POPULAÇÃO DE ESTUDO.....	44
3.2.1	Indivíduos com Diabetes Mellitus Tipo 2.....	44
3.2.2	Voluntários saudáveis.....	45
3.3	COLETA DE SANGUE TOTAL PERIFÉRICO E ISOLAMENTO DE PBMC.....	45
3.4	EXTRAÇÃO DE mRNA E SÍNTESE DE cDNA.....	45
3.5	REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE EM TEMPO REAL.....	46
3.6	SELEÇÃO DOS GENES DE REFERÊNCIA.....	47
3.6.1	qRT-PCR e Desenho dos primers.....	48
3.6.2	Eficiência de amplificação.....	48
3.6.3	Análise de estabilidade de expressão.....	49
3.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	49

4	RESULTADOS.....	50
4.1	GENES DE REFERÊNCIAS SELECIONADOS.....	50
4.2	NÍVEIS DE EXPRESSÃO DO mRNA DE <i>IL6R</i> , <i>STAT3</i> E <i>FOXP3</i> EM INDIVÍDUOS COM DM2 E CONTROLES SAUDÁVEIS – AVALIAÇÃO EM SANGUE TOTAL PERIFÉRICO.....	52
4.3	NÍVEIS DE EXPRESSÃO DO mRNA DE <i>IL6R</i> , <i>STAT3</i> E <i>FOXP3</i> EM INDIVÍDUOS COM DM2 E CONTROLES SAUDÁVEIS – ENSAIO EM PBMC.....	53
4.3.1	Expressão em PBMC's não estimuladas.....	53
4.3.2	Expressão em PBMC's estimuladas com D-glucose.....	54
5	DISCUSSÃO.....	58
6	CONCLUSÕES.....	61
	REFERÊNCIAS.....	62

1. INTRODUÇÃO

O Diabetes Mellitus tipo 2 (DM2) é um distúrbio crônico do metabolismo da glicose caracterizado pela hiperglicemia decorrente principalmente da resistência insulínica porém, frequentemente associada a deficiência na secreção deste hormônio devido a falência das células β pancreáticas. O DM2 representa cerca de 90-95% dos casos de Diabetes Mellitus (DM) e apesar de se manifestar em diferentes faixas etárias, costuma surgir na população adulta, especialmente em indivíduos a partir da quarta década de vida.

A prevalência do DM2 aumenta mundialmente, conferindo características de epidemia a esta doença que provoca limitações e mortes prematuras aos portadores, além de impactos socioeconômicos em diversos países. Os custos estimados para o DM2 são de caráter direto e indireto representando impacto significativo na parcela de investimentos direcionada à saúde. Sua fisiopatologia é complexa e envolve tanto fatores genéticos como ambientais, com taxas de hereditariedade estimadas entre 20 e 80% com risco de desenvolvimento do DM2 de 40% para indivíduos com um dos genitores acometidos pela doença e 80% quando ambos os genitores apresentarem DM2. Fatores biológicos, ambientais e socioeconômicos como obesidade, tabagismo e práticas relacionadas ao estilo de vida moderno influenciam no aumento da incidência do DM2, assim como o perfil genético inflamatório, com células e moléculas do sistema imunológico participando do estabelecimento e progressão da doença.

A participação do sistema imunológico nesse processo envolve proteína do tipo citocina, bem como diferentes tipos celulares com presença de perfil autoimune, apesar de estudos prévios terem descartado essa possibilidade. O desequilíbrio do sistema imunológico pode influenciar não apenas no surgimento da patologia, através da promoção da resistência insulínica e consequente desenvolvimento do DM2, mas também no desenvolvimento das complicações associadas, como as doenças renais e cardiovasculares.

Distúrbios na ação do sistema imunológico no indivíduo com DM2 podem ser provenientes do perfil genético mais favorável ao estabelecimento da doença encontrado nesses indivíduos. Diferentes genes, incluindo responsáveis por codificar moléculas envolvidas nas respostas imunes, apresentam associação com o DM2 devido sua interferência na coordenação das respostas imunológicas a sinais patológicos e também devido ao correto reconhecimento de moléculas próprias. A alteração na expressão de genes como o do receptor de interleucina 6 (IL6R), do sinal transdutor e ativador de transcrição 3 (STAT3) e do fator de transcrição *forkhead box P3* (FoxP3) está associada à modificações no perfil de células

linfóides. Essas mudanças podem promover quebra da homeostase e resposta inflamatória descontrolada. Alterações nos níveis de expressão gênica do *FOXP3* apresentam associação com doenças autoimunes como Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES) e Diabetes Mellitus Tipo 1 (DM1), podendo apresentar relação também com o perfil inflamatório sistêmico e autoimune envolvido na fisiopatologia do DM2. As alterações na expressão de *FOXP3* estão relacionadas à quebra da homeostase do sistema imune e sofrem influência de outras moléculas envolvidas na sua via como o Stat3 e o IL-6R.

Devido ao envolvimento da via do FoxP3 no estabelecimento de distúrbios inflamatórios e autoimunes, sua relação com a regulação do sistema imune e a participação de respostas imunes desreguladas no desenvolvimento de DM2; este trabalho investigou a participação de genes da via do FOXP3 no DM2.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

Avaliar a expressão gênica dos genes IL6, STAT3 e FOXP3 em pacientes com Diabetes Mellitus Tipo 2 (DM2).

1.1.2 Objetivos específicos

- Avaliar a relação entre os níveis de expressão dos genes IL6R, STAT3 e FOXP3 e a susceptibilidade ao DM2;
- Avaliar *in vitro* o efeito da glicose na modulação da expressão dos genes IL6R, STAT3 e FOXP3 em pacientes com DM2 e indivíduos saudáveis.

1.2 JUSTIFICATIVA

O Diabetes Mellitus Tipo 2 (DM2) é considerado um problema de saúde pública podendo tornar-se uma pandemia em poucas décadas; apresenta elevadas taxas de incidência, e prevalência crescente. Esta doença apresenta grande impacto na morbimortalidade dos indivíduos acometidos que apresentam comorbidades debilitantes e dispendiosas para a receita dos sistemas de saúde. Afeta primordialmente indivíduos a partir dos 40 anos de idade, e demonstra incidência crescente devido ao envelhecimento populacional, a mudanças no estilo de vida e a dieta ocidental hipercalórica.

Os mecanismos fisiopatogênicos do DM2 são complexos e apenas parcialmente compreendidos. Caracteriza-se pelo aumento dos níveis séricos de glicose, provocado por resistência insulínica, e está frequentemente associada a danos cardiovasculares, renais, neuropáticos e oftalmológicos. A participação do sistema imune na fisiopatologia da doença é evidenciada pela detecção de um processo inflamatório de baixo grau, com indícios de envolvimento autoimune. O perfil imune participante do DM2 apresenta relação com o perfil genético, com alguns genes associados ao maior risco de desenvolvimento do DM2.

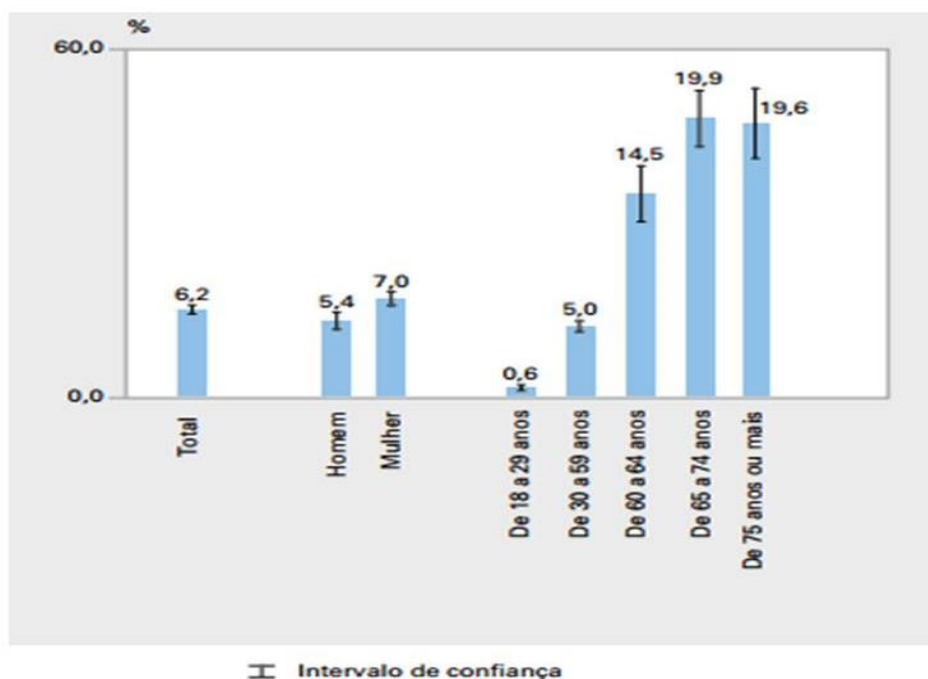
Sendo o Foxp3 um fator de transcrição essencial para a manutenção da autotolerância de modo que alterações nos seus níveis de expressão estão relacionadas a diversos processos autoimunes, a análise da expressão de seu gene assim como dos genes de moléculas interferentes na sua via, apresenta grande importância para o desenvolvimento de potenciais novos alvos terapêuticos assim como de possíveis biomarcadores para o estudo do Diabetes Mellitus Tipo 2.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 EPIDEMIOLOGIA DO DIABETES MELLITUS TIPO 2 NO BRASIL E NO MUNDO

O Diabetes Mellitus (DM) é considerado uma emergência de saúde pública, afetando 8,3% da população mundial adulta (HAMEED et al, 2015) e está incluso entre as doenças não transmissíveis mais frequentes da atualidade, correspondendo a 12% dos gastos totais em saúde (IDF, 2015; HAMEED et al, 2015). Segundo a Pesquisa Nacional de Saúde, realizada pelo IBGE e Ministério da Saúde em 2014, aproximadamente 9 milhões de indivíduos possuem algum tipo de DM no Brasil, apresentando maior incidência para o sexo feminino e aumento da prevalência com a progressão da idade (IBGE, 2014). A taxa de prevalência é 1,6% maior para o sexo feminino em comparação ao sexo masculino e a proporção do número de casos aumenta 32,67 vezes entre indivíduos idosos a partir dos 75 anos quando comparados a jovens entre 18-29 anos, para população brasileira (Figura 1).

Figura 1: Porcentagens de indivíduos afetados pelo DM em diferentes faixas etárias.

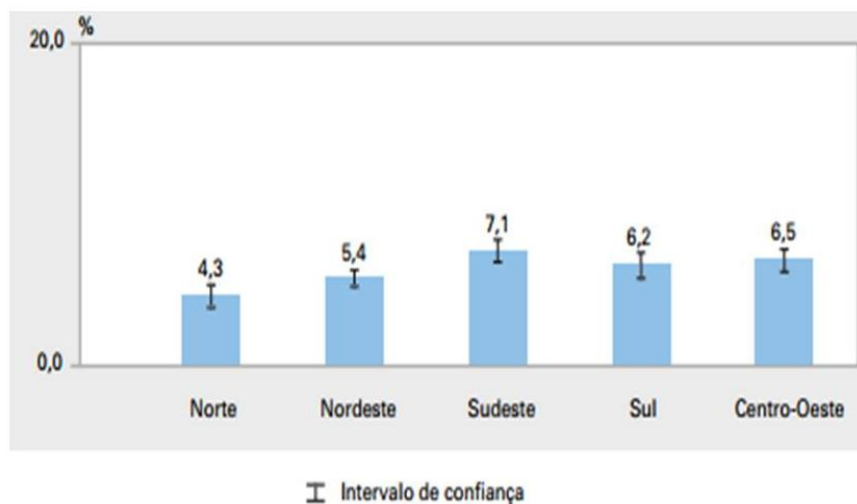


Fonte: <https://biblioteca.ibge.gov.br/livros/liv91110.pdf>. IC de 95%. Adaptado de IBGE PNS, 2013. Percepção do estado de saúde, estilos de vida e doenças crônicas.

As taxas de incidência de DM oscilam de acordo com as diferentes regiões do país (Figura 2). As regiões Norte e Nordeste apresentarem os menores números de indivíduos afetados pelo DM com a maior parte destes localizados na região urbana, no entanto o DM é

um amplo problema de saúde, mostrando impacto irrestrito às grandes cidades como demonstrado por estudo de LYRA e colaboradores, 2010. O estudo relata taxas significantes de DM na população de baixa renda e baixo nível de escolaridade de Triunfo, uma cidade do Sertão Pernambucano; assim expandindo as noções socioeconômicas e regionais relacionadas à doença, evidenciando a necessidade de estudo do DM em populações de diferentes esferas sociais, econômicas, regionais e culturais. A prevalência do DM foi significativa com 13,6% dos indivíduos incluídos na pesquisa apresentando diabetes, apesar do município de Triunfo ser localizado na região Nordeste que ocupa apenas a quarta posição em relação às taxas de incidência da doença no país (LYRA et al., 2010; IBGE, 2013). Corroborando com estudos em grandes cidades, o sexo feminino apresentou maior número de casos com 65,6% do total de diabéticos (LYRA et al., 2010).

Figura 2: Incidência de diabetes mellitus nas diferentes regiões do Brasil.



Fonte: Adaptado de IBGE Pesquisa Nacional de Saúde, 2013 Percepção do estado de saúde, estilos de vida e doenças crônicas. <https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/livros/liv91110.pdf>

Dos 471 milhões de indivíduos afetados por DM estimados para 2040 em todo o mundo a maior parcela é afetada pelo subtipo 2 da doença (DM2), este é o subtipo de maior prevalência e comporta cerca de 90-95% dos casos da doença (Figura 3) (SBD, 2015; WELTER et al., 2015; ADA, 2010). Apesar da alta prevalência, dados exatos sobre a taxa de incidência do DM2 em grandes populações são indisponíveis devido à necessidade de acompanhamento prolongado com aferições periódicas da glicemia nos indivíduos em estágios pré-clínicos da doença (SBD, 2015). As taxas de DM2 são obtidas de estudos de rastreamento que visam identificar indivíduos com DM2 ou assintomáticos em condição de pré-diabetes que direcionam ações de diagnóstico para manter uma boa razão

custo/efetividade (SBD, 2017). Este rastreamento é preconizado a populações de alto risco selecionadas de acordo com escores obtidos em questionários validados da Associação Americana de Diabetes (ADA) ou com os escores da pontuação finlandesa de risco para diabetes (FINDRISC) (SBD, 2017). Outros fatores que indiquem a possível presença do DM2 devem ser correlacionados quando os questionários não forem aplicados, como obesidade, idade superior a 45 anos, infecções virais crônicas e comorbidades relacionadas ao diabetes (SBD, 2017).

Apesar dos desafios no diagnóstico do DM2 é relatado o aumento de 6,4 vezes na incidência da doença; com taxas de crescimento de 2,7% e 17,4% para as faixas etárias de 30 a 59 anos e 60 a 69 anos, respectivamente; em estudo multicêntrico da população brasileira adulta (SBD, 2015). O padrão de prevalência do DM2 varia entre diferentes grupos étnicos, países (Figura 3) e grupos regionais (Figura 2), apresentando estreita relação com o modo de vida ocidental, padrão genético e os altos índices de obesidade (CHOBY, 2017; FOROUHI; WAREHAM, 2014).

Figura 3: Ranking dos países com maior número de indivíduos diabéticos com idades entre 20 e 79 anos, em 2015 e projeção para 2040. Intervalo de confiança=95%

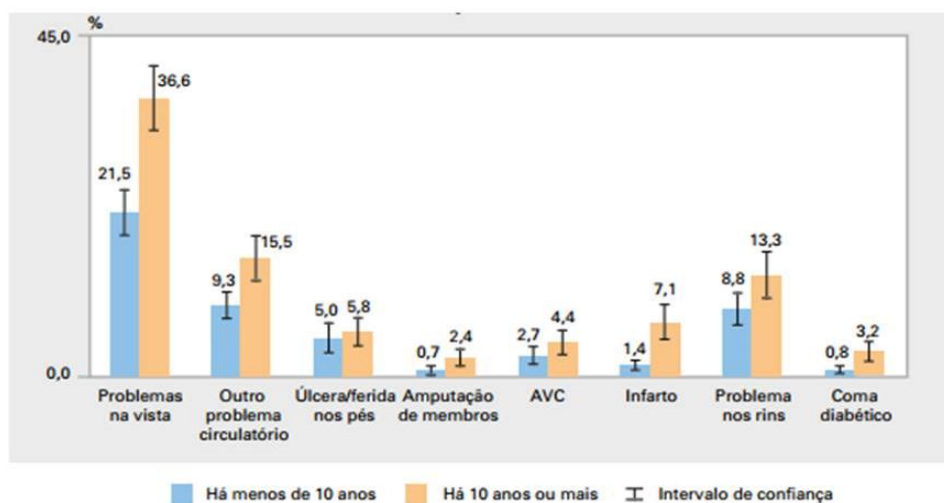
Posição	País	2015 Número de pessoas com diabetes	Posição	País	2040 Número de pessoas com diabetes
1	China	109,6 milhões (99,6 a 133,4)	1	China	150,7 milhões (138,0 a 179,4)
2	Índia	69,2 milhões (56,2 a 84,8)	2	Índia	123,5 milhões (99,1 a 150,3)
3	Estados Unidos da América	29,3 milhões (27,6 a 30,9)	3	Estados Unidos da América	35,1 milhões (33,0 a 37,2)
4	Brasil	14,3 milhões (12,9 a 15,8)	4	Brasil	23,3 milhões (21,0 a 25,9)
5	Federação Russa	12,1 milhões (6,2 a 13,7)	5	México	20,6 milhões (11,4 a 24,7)
6	México	11,5 milhões (6,2 a 13,7)	6	Indonésia	16,2 milhões (14,3 a 17,7)
7	Indonésia	10,0 milhões (8,7 a 10,9)	7	Egito	15,1 milhões (7,3 a 17,3)
8	Egito	7,8 milhões (3,8 a 9,0)	8	Paquistão	14,4 milhões (10,6 a 20,4)
9	Japão	7,2 milhões (6,1 a 9,6)	9	Bangladesh	13,6 milhões (10,7 a 24,6)
10	Bangladesh	7,1 milhões (5,3 a 12,0)	10	Federação Russa	12,4 milhões (6,4 a 17,1)

Fonte: <https://www.idf.org/e-library/epidemiology-research/diabetes-atlas/13-diabetes-atlas-seventh-edition.html>.

Esta doença apresenta estreita relação com os hábitos de vida modernos como sedentarismo e distúrbios frequentes na população como obesidade, dislipidemia e hipertensão arterial sistêmica; fatores que juntos contribuem para o surgimento do DM2, suas

comorbidades e outras doenças crônicas. As doenças cardiovasculares são as principais causas de óbito em indivíduos diabéticos que, quando indevidamente tratados, desenvolvem complicações microangiopáticas graves como retinopatia diabética, frequente nestes pacientes, podendo levar a cegueira, nefropatia e neuropatia diabéticas (ADA, 2010). Outros eventos também frequentemente associados à doença em indivíduos com descontrole metabólico contribuem para morbidade dos diabéticos como úlcera de membros e amputações decorrentes a estas (Figura 4) (SBD, 2015).

Figura 4: Proporção de complicações relacionadas ao DM em 2013.



Fonte: <https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/livros/liv91110.pdf>. Intervalo de confiança de 95%. IBGE Pesquisa Nacional de Saúde, 2013 Percepção do estado de saúde, estilos de vida e doenças crônicas.

Apesar das limitações no acompanhamento de números exatos de pacientes com DM2, para manutenção da custo/efetividade, é sabido que a prevalência da doença aumentou de modo alarmante na última década (MCCULLOCH; ROBERTSON, 2017). Os gastos diretos e indiretos relacionados à assistência aos indivíduos afetados e a retirada destes indivíduos em fase economicamente ativa, respectivamente, causam prejuízos não apenas aos afetados, mas também à economia do país (ZANETTI et al., 2007).

2.2 CLASSIFICAÇÃO DIABETES MELLITUS TIPO 2

Diabetes Mellitus Tipo 2 (DM2) é a classificação conferida pela Organização Mundial de Saúde (OMS) e Associação Americana de Diabetes (ADA) ao subtipo de Diabetes Mellitus (DM) que apresenta como etiologia a resistência insulínica e deficiência insulínica relativa (SBD, 2015). A doença é caracterizada pela hiperglicemia, inicialmente decorrente da resistência à ação da insulina e frequente comprometimento na secreção deste hormônio. O

DM2 apresenta maior prevalência na fase adulta, afetando geralmente indivíduos a partir dos 40 anos de idade, porém pode surgir durante a infância e adolescência (SBD, 2015; WELTER et al., 2015).

Este subtipo de diabetes demonstra ocorrência de agregação familiar maior que os outros subtipos e incidência marcante em populações geneticamente susceptíveis demonstrando também uma possível associação com o aumento da incidência do subtipo 1 (GROSS et al., 2002). Maraschin e colaboradores (2010) recomendam uma subdivisão do DM2 de acordo com a presença ou ausência de anticorpos dirigidos ao pâncreas para melhor entendimento da patogênese da doença e consequente melhor tratamento desta (MARASCHIN et al., 2010).

2.3 DIAGNÓSTICO E TERAPIA DO DIABETES MELLITUS TIPO 2

O diagnóstico do DM2 é baseado na avaliação da glicemia podendo ser realizado a partir da análise do desequilíbrio metabólico por três diferentes testes de glicemia: glicemia de jejum, teste de sobrecarga de glicose e glicemia ao acaso (ADA, 2010). A glicemia de jejum alterada, ou tolerância à glicose diminuída são estágios pré-clínicos da doença e devem ser devidamente identificadas e tratadas. Segundo recomendações da OMS, ADA e Sociedade Brasileira de Diabetes (SBD), o DM2 é identificado quando: glicemia casual ≥ 200 mg/dL somada a poliúria, polidipsia e perda de peso; ou glicemia de jejum ≥ 126 mg/dL ou a glicemia de 2h pós sobrecarga de 75g de glicose ≥ 200 mg/dL.

Anteriormente denominado “insulino independente” este subtipo não apresenta necessidade expressa da administração de insulina exógena como garantia de sobrevivência para seus portadores, sendo necessária insulinização apenas para adequação ao controle metabólico no tratamento de pacientes que apresentam avançado comprometimento na função das células β pancreáticas (SBD, 2015; ADA, 2010).

Segundo estabelecido pelas ADA (*American Diabetes Association*), AAEC (*American Association of Clinical Endocrinologists*) e SBD, a escolha do tratamento do paciente diabético deve ser individualizada, baseada em modificações no estilo de vida com adequações dos teores nutricionais da dieta, atividade física e educação em saúde, somadas a administração de drogas hipoglicemiantes. A escolha da terapia precisa ser de acordo com os princípios da Medicina Baseada em Evidências (MBE) onde a preferência do paciente e a prática médica são consideradas na escolha da conduta terapêutica e deve abranger as múltiplas anormalidades metabólicas envolvidas (SBD, 2015). O tratamento eficaz do DM2 é

multidisciplinar, especializado e envolve diferentes profissionais da saúde (ARSA et al., 2009).

Apesar do envolvimento de componentes do sistema imunológico na fisiopatologia do DM2 o tratamento medicamentoso e não medicamentoso é baseado apenas no controle sintomatológico e metabólico. Desta forma, a atual estratégia terapêutica visa contornar a hiperglicemia e comorbidades associadas à doença, sem considerar o perfil autoimune relacionado do DM2 (GUIDONI et al., 2009). Este processo é paliativo e não curativo não tratando a causa base da doença apenas promovendo retardo do surgimento das complicações associadas ao DM2, mas incapaz de reverter o seu quadro.

A prevenção do DM2 deve ser iniciada em indivíduos na fase pré-clínica da doença (prevenção primária) e também em indivíduos diabéticos (prevenção secundária); procurando evitar o seu estabelecimento e complicações agudas ou crônicas, responsáveis por cerca de 6% de todas as mortes no mundo no ano 2000 (CADE, 2008). A prevenção do DM2 e suas complicações contribuem para qualidade de vida dos diabéticos, reduz os riscos de comorbidades e consequentemente, reduz e retarda a necessidade de atenção à saúde especializada, mais onerosa ao paciente e ao governo (SBD, 2015).

2.4 COMORBIDADES RELACIONADAS AO DIABETES MELLITUS TIPO 2

Geralmente associado à obesidade e sobrepeso, o DM2 apresenta-se intrinsecamente relacionado a complicações micro e macrovasculares, e a óbitos decorrentes destas (CHAWLA; CHAWLA; JAGGI, 2016). A maior causa de morte associada ao DM2 como doença de base são as complicações cardiovasculares, no entanto o DM2 serve de base também para distúrbios renais e neuronais, como a nefropatia e neuropatia diabética (JAISWAL et al., 2017; LAAKSO, 2010; PANTALONE et al., 2015). O processo paulatino relacionado ao desenvolvimento do DM2 e a ausência de perturbação metabólica aguda contribuem negativamente para o estado de saúde em que os pacientes são diagnosticados, muitos apresentando comorbidades associadas à doença já no momento do diagnóstico (IDF, 2015).

Entre as principais comorbidades associadas ao DM, estão a nefropatia diabética, as doenças oftalmológicas e a síndrome do pé diabético (SBD, 2018). A nefropatia diabética afeta aproximadamente 40% dos indivíduos diabéticos e é uma importante complicação tardia da doença (PEZZOLESI, 2013). O processo patológico da nefropatia no Diabetes Mellitus do Tipo 1 (DM1) envolve alterações na sensibilidade das células Treg à apoptose e perda da atividade imunossupressora devido a perda da expressão de Foxp3 e progressão do DM1

devido ao desencadeamento de uma resposta autoimune (DOUSDAMPANIS, 2016). A nefropatia diabética é o desfecho final de 20-40% dos indivíduos com DM2 com longo tempo de doença que apresentam microalbuminúria e não recebem tratamento, 20% destes doentes chegam a desenvolver doença renal crônica com falência renal irreversível (ALDUKAHAYEL, 2017).

A progressão da nefropatia diabética no DM2 está associada ao aumento de citocinas pró-inflamatórias como a Interleucina 6 (IL-6) apresentada em níveis elevados no plasma de indivíduos com DM2 que manifestam nefropatia diabética (NAVARRO-GONZÁLEZ, 2008). A IL-6 é sintetizada pelas células renais dos indivíduos com DM2, possui efeitos autócrinos e parácrinos, provocando aumento da permeabilidade endotelial, proliferação de células mesangiais, aumento da expressão de fibronectina e consequente injúria renal (NAVARRO-GONZÁLEZ, 2008; DONATE-CORREA et al, 2015).

A retinopatia diabética está presente em aproximadamente 12% dos indivíduos recém-diagnosticados com DM2 devido ao longo tempo de convivência com a doença antes da apresentação de sintomas, de forma que as lesões diabéticas são complicações oftalmológicas frequentes nestes indivíduos (MARTINELL, 2016). De acordo com a teoria inflamatória, o sistema imune apresenta estreita relação com o desenvolvimento de retinopatia diabética com citocinas pró-inflamatórias contribuindo para a patogênese desta comorbidade (HERNÁNDEZ-DA MOTA, 2015). A IL-6 é uma das citocinas pró-inflamatórias que apresenta relato de aumento nos níveis de mRNA e da proteína em pacientes com DM2 e retinopatia diabética que possuem os polimorfismos -174 e 572 G/C (LU, 2017). A concentração no líquido vítreo desta citocina está aumentada em indivíduos com DM2 devido à síntese local da citocina que promove alteração na barreira sangue-retina promovendo inflamação ocular (MOCAN, 2006).

A síndrome do pé diabético é a principal complicação do DM2, ocorre em 25% dos indivíduos e pode provocar amputações pouco tempo depois do diagnóstico (RISSE, 2007). Esta comorbidade é a principal causa de internamento por DM2, apresenta como base a neuropatia diabética e é caracterizada pela presença de ulcerações nos membros inferiores de indivíduos com DM (VOLMER-THOLE, 2016). Indivíduos com DM2 e neuropatia diabética apresentam aumento nos níveis séricos de IL-6 que provocaria inflamação e dano neural promovendo a neuropatia diabética (JOSHI, 2008; TUTTOLOMONDO, 2010). A IL-6 também apresenta envolvimento na dor neuropática presente em indivíduos diabéticos devido à lesão e disfunção no sistema nervoso (ZHOU et al, 2016).

Distúrbios associados ao DM2, como a hipertensão arterial sistêmica (HAS), dislipidemia, disfunção endotelial e, em casos mais avançados, comprometimento cerebrovascular, cardiovascular e renal conferem complicações extras ao tratamento do DM2 devido ao desenvolvimento de comorbidades (SBD, 2015). Estas variáveis devem ser consideradas na escolha da terapia adotada para sua maior eficiência, assim como a compreensão de seus processos patológicos podem colaborar para melhor entendimento do DM2 e suas comorbidades, contribuindo para o desenvolvimento de potenciais novos alvos terapêuticos (SBD, 2015; ARSA et al., 2009).

2.5 FATORES DE RISCO PARA O DESENVOLVIMENTO DIABETES MELLITUS TIPO 2

A epidemia de DM demonstra expansão do número de casos especialmente nos países em desenvolvimento e está associada tanto ao modo de vida do mundo moderno como também ao envelhecimento e aumento populacional, somados a maior taxa de sobrevivência dos pacientes afetados (SBD, 2015).

A urbanização crescente, o envelhecimento populacional e a alteração no perfil dietético dos indivíduos somados a intolerância à glicose, contribuem significativamente para o crescimento do número de afetados pela doença (IDF, 2015; FOROUHI; WAREHAM, 2014). Além dos fatores acima citados, outro que contribui com o desenvolvimento de DM2 é possuir progenitora portadora de diabetes gestacional ou, no caso de mulheres, desenvolvimento deste tipo de DM quando gestantes (IDF, 2015; FOROUHI; WAREHAM, 2014).

O sedentarismo apresenta associação com aumento da incidência de obesos no mundo e contribui também para o crescente número de casos de DM2 (HU, 2003). O sedentarismo colabora para o surgimento de DM2 e aumento da incidência de complicações como aterosclerose e doenças cardiovasculares. Além disso, impede que o paciente receba os benefícios da atividade física como redução dos níveis glicêmicos, também associados à obesidade e ao maior risco de hipertensão e hipercolesterolemia (BARNES, 2012; HU, 2003; WARREN et al., 2010; FORD; CASPERSEN, 2012).

A obesidade é considerada o principal fator de risco crítico para o desenvolvimento de DM2 devido ao papel secretor do tecido adiposo, servindo como fonte de células inflamatórias e moléculas interferentes na sensibilização à insulina, como IFN- γ , IL-1 β , adipocinas e IL-6 produzidas neste tecido (JUNG; CHOI, 2014; MATHIS, 2013; OUCHI et al., 2011). O excesso de ácidos graxos livres e a liberação de adipocinas, presentes no

organismo obeso, provocam falha na sinalização correta da insulina contribuindo para o estabelecimento do DM2 (JUNG; CHOI, 2014). O distúrbio da ação da insulina no tecido adiposo contribui também para anormalidades metabólicas associadas ao DM2, como hipertrigliceridemia e aterosclerose devido a defeitos no armazenamento de triglicerídeos nos adipócitos e ao aumento de ácidos graxos livres circulantes em vasos sanguíneos (KAHN; FLIER, 2000). Desta forma, a resistência insulínica é associada a diferentes distúrbios metabólicos do DM2 e juntos contribuem progressivamente para o agravamento do estado de saúde dos diabéticos (ARSA et al, 2009).

Além da obesidade, o aumento da incidência de DM2 em indivíduos jovens é decorrente também da parada precoce da amamentação e inserção do leite de vaca e outros alimentos processados (GUNDERSON et al., 2014; NOLAN; DAMM; PRENTKI, 2011; PEREIRA; ALFENAS; ARAÚJO, 2014). Por fim, alterações rápidas no estilo de vida também podem promover um aumento brusco nas taxas de incidência da doença devido a interações entre o ambiente e o perfil genético da população sujeita a esta modificação (GUNDERSON, 2014; GOUVERI et al., 2011; PEREIRA; ALFENAS; ARAÚJO, 2014).

O aumento na incidência de DM2 tende a progredir caso não sejam tomadas medidas preventivas como inserção de hábitos alimentares saudáveis, prática regular de exercícios e atenção aos indivíduos da classe de risco (SBD, 2015). A incidência crescente é observada também em indivíduos mais jovens especialmente devido aos fatores ambientais e ao aumento da obesidade, principalmente em indivíduos de grupos étnicos susceptíveis a doença e a mudança no perfil dietético com aumento do consumo de bebidas açucaradas (SBD, 2015; FOROUHI; WAREHAM, 2014; OLOKOBA; OBATERU; OLOKOBA, 2012).

2.6 FISIOPATOLOGIA DO DIABETES MELLITUS TIPO 2

A patogênese do DM2 é complexa e envolve tanto fatores genéticos quanto ambientais que juntos colaboram para o desequilíbrio metabólico e imunológico do indivíduo diabético, refletindo no surgimento da patologia e suas comorbidades (ALI, 2013). O DM2 apresenta forte componente hereditário, com taxas estimadas entre 20-80% (ALI, 2013). No entanto a participação dos diferentes genes na patogênese do DM2 varia de acordo com a população estudada de modo que o perfil genético do DM2 pode variar entre os grupos populacionais de diferentes países (ALI, 2013).

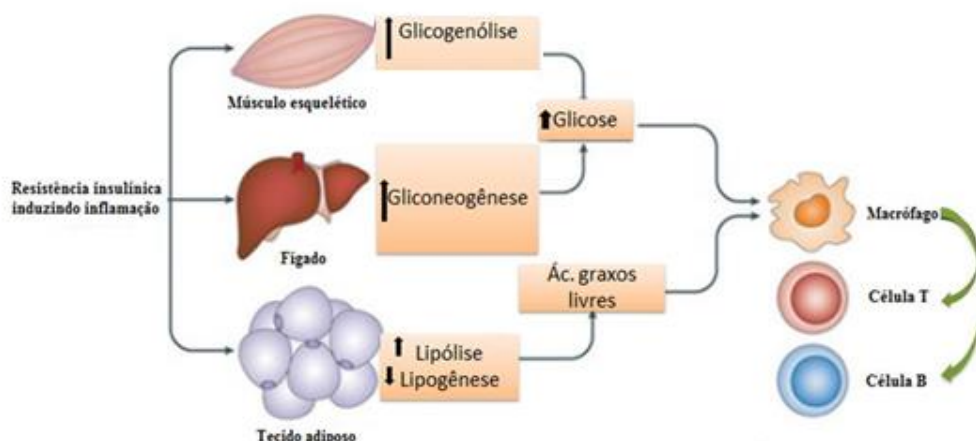
Entre os genes com participação no DM2, relatados na literatura, estão os codificantes dos receptores da insulina (*IRS1* e *IRS2*), *CAPN10* que codifica uma calpaína-10 envolvida em vastas funções celulares, *TCF7L2* responsável por codificar uma proteína envolvida na

homeostase da glicose e genes associados a resposta imune (ALI, 2013; GARAND et al, 2002; OH et al, 2012). A participação de alterações em genes codificantes de citocinas evidencia o desenvolvimento de modificações genéticas no sistema imune e desenvolvimento do DM2; entre estas estão diferentes polimorfismos no gene da Interleucina 10 (IL-10) presentes em grupos populacionais e étnicos específicos; polimorfismos no gene codificante do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) também apresentam associação com o DM2 em diferentes grupos populacionais (BENERJEE, 2014). Alterações nos níveis de expressão do *IL6* são relacionadas à resistência insulínica e apresentam forte correlação com o risco de desenvolvimento do DM2, agindo de modo direto e indireto na regulação da glicemia (PRADHAM et al, 2001; BENERJEE, 2014).

Os fatores ambientais são parte da teoria patobiológica do DM2 que implica uma interação entre estes fatores e os defeitos na secreção e sinalização da insulina. Entre os fatores relatados estão dieta ocidental, obesidade, sedentarismo e exposição a poluentes (MUREA et al, 2012). Estes fatores ambientais e comportamentais podem modular o risco genético associado ao DM2 com intervenções no estilo de vida e adesão de medicamentos hipoglicemiantes afetando a apresentação fenotípica da doença que pode diferir em magnitude em diferentes contextos do ambiente (MUREA et al, 2012; GRUPO DE PESQUISA DO PROGRAMA DE PREVENÇÃO DO DIABETES, 2006).

O DM2, como já explanado anteriormente, é resultado da resistência insulínica e deficiência relativa da secreção de insulina (CHOBY, 2017; MCCULLOCH; ROBERTSON, 2017). O estado inflamatório crônico de baixo grau e a ativação do sistema imune inato são descritos como fatores relacionados ao surgimento do DM2. Células e moléculas do sistema imunológico atuam contribuindo para a resistência insulínica sendo também impulsionadas por esta, participando, consequentemente, do desenvolvimento e progressão do DM2 (LUCA; OLEFSKY, 2008; HAMEED et al, 2015) (Figura 5).

Figura 5: Relação entre a resistência insulínica e ativação de células do sistema imunológico.



Fonte: Adaptado de: Nature Review Immunology, 2011 (A Chawla, 2011, Nature reviews immunology). A resistência insulínica aumenta a gliconeogênese no fígado, e promove a glicogenólise no músculo esquelético. O aumento da glicose, devido estes dois processos, alimenta a ativação de células imunes inatas e adaptativas. Enquanto que no tecido adiposo, a resistência insulínica provoca aumento da lipólise e diminuição da lipogênese liberando ácidos graxos responsáveis pelo suporte da demanda energética de diferentes tipos celulares. As células imunes produzem citocinas inflamatórias que prejudicam a sinalização da insulina no tecido muscular, hepático e adiposo.

A resistência insulínica nos tecidos alvo promove a elevação dos níveis de glicose sérica, característica marcante do DM2, assim como também alterações no metabolismo de outras biomoléculas (CEFALU, 2009). O aumento na liberação de ácidos graxos livres decorre do processo de falha na sinalização insulínica que provoca redução na supressão da lipólise e acaba por induzir a produção de triglicerídeo hepático, expansão do tecido adiposo visceral e aumento da liberação de citocinas pró-inflamatórias (ABEL, 2010).

Os mecanismos envolvidos no estabelecimento da resistência insulínica envolvem a lipotoxicidade, decorrente ao acúmulo de triglicerídeos e produtos intermediários como ceramida e diacilglicerol (DAG) impedindo a correta sinalização da insulina, ao aumento da ativação da via da hexosamina e alterações mitocondriais (CEFALU, 2009; ABEL, 2010; PAGEL-LANGENICKEL et al., 2010). Este impedimento da sinalização é decorrente ao acúmulo ectópico de lipídios ou a presença intracelular de espécies lipídicas bioativas que ativam a proteína C reativa (PCR) e inibem da fosforilação da tirosina (HARDY; CZECH; CORVERA, 2012). Independente do mecanismo envolvido, o excesso de gordura impede a sinalização entre a insulina e seu receptor (WANG; ECKEL, 2009).

Além dos fatores metabólicos envolvidos no processo de resistência insulínica têm-se também as alterações imunológicas com o aumento da ativação das cascatas de sinalização mediadas por inflamação (ABEL, 2010). Estas alterações nas respostas imunológicas envolvem os receptores Toll-like (TLR) 1 e TLR6 em heterodímero com TLR2 e o

homodímero do TLR2 em resposta a padrões moleculares associados ao dano (DAMPs) assim como também vias de sinalização das quinases c-Jun N-terminal (JNK) (SEPEHRI et al., 2016; VIJAYVARGIA et al., 2010).

Em estágio avançado os indivíduos com DM2 manifestam deficiência das células β pancreáticas decorrente à tentativa de compensação a resistência insulínica (HAMEED et al., 2015; CERF, 2013; QUAN; JO; LEE, 2013; WEIR; BONNER-WEIR, 2013). Este processo de adaptação das células β pancreáticas juntamente com a agressão a estas células seja devido apoptose por estresse do retículo endoplasmático, ativação da via JNK ou por lipoapoptose desencadeia a deficiência insulínica relativa muitas vezes já presente no diagnosticado do DM2 (QUAN; JO; LEE, 2013).

A hiperglicemia é o resultado final da resistência e deficiência insulínica e provoca agravamento do desequilíbrio imunometabólico promovendo a evolução da doença com manifestação de comorbidades associadas. Diferentes processos como a formação de produto final de glicação avançada (AGE), a elevação do fluxo da via de poliol; ativação das isoformas da proteína quinase C (PKC) e o aumento do fluxo da via da hexosamina podem provocar o avanço dos danos relacionados ao DM2 (BROWNLEE, 2001).

O estresse metabólico aflige todos os órgãos e está relacionado à ativação da resposta inflamatória por diferentes mecanismos como ativação de inflamassoma e via receptores do tipo Toll (Toll-Like Receptor - TLR). O DM2 é descrito como um distúrbio inflamatório mediado por alterações no sistema metabólico e este desequilíbrio metabólico é ampliado quando os altos níveis de glicose circulante promovem danos às células β pancreáticas promovendo defeitos na secreção da insulina exacerbando o desequilíbrio glicêmico (DONATH, 2011).

2.5.1 Resposta imune e Diabetes Mellitus Tipo 2

O imunometabolismo compreende a relação entre as vias bioenergéticas e as funções específicas das células do sistema imunológico (SHI; EUGENIN; SUBBIAN, 2016). Demonstra importante papel no desencadeamento da fisiopatologia do DM2 através da interação entre o sistema imune e o metabolismo celular por intermédio da atividade imunomoduladora das citocinas (ANTUNES et al., 2017; HAMEED et al., 2015).

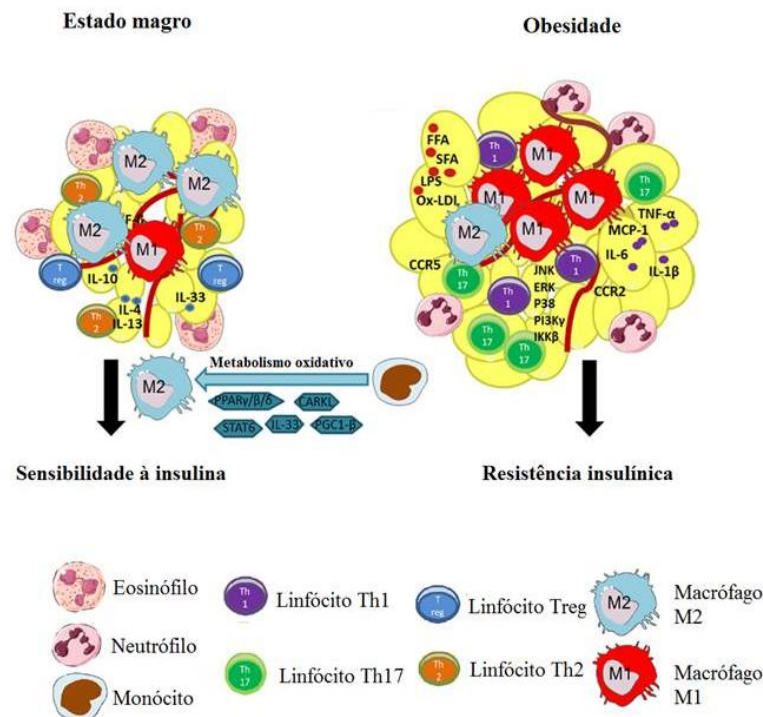
O envolvimento dos distúrbios metabólicos presentes no DM2 e o sistema imunológico é dado através da interação entre mecanismos de detecção de patógenos, em comum com mecanismos que reconhecem nutrientes, de modo que integra o metabolismo à imunidade inata (HAMEED et al., 2015). Esta interação é dada através do reconhecimento de

macromoléculas por receptores de vias de reconhecimento de patógenos, que ativam células do sistema imune inato e promovem a liberação de citocinas e essas, por sua vez, podem ativar a resposta imune adaptativa (HAMEED et al., 2015; RAFIQ et al., 2007).

O DM2 apresenta perfil inflamatório crônico de baixo grau com envolvimento autoimune, apresentando níveis elevados de citocinas pró-inflamatórias como interleucina 6 (IL-6) e TNF- α (HEMMINKI et al., 2015; RAFIQ et al., 2007). A patogênese do DM2 envolve diversos tipos celulares do sistema imune com ampla participação tanto de células do sistema imune inato quando adquirido, onde as proporções entre tipos celulares de perfis antagônicos, assim como seus produtos, são responsáveis pelo estabelecimento e complicações associadas à doença (XIA; RAO; ZHONG, 2017).

A participação do sistema imune inato na patogênese do DM2 é observada pelo envolvimento dos macrófagos que promovem inflamação local e sistêmica através da liberação de citocinas pró-inflamatórias como IL-1 β e IL-6. Em decorrência a elevação da quantidade de macrófago M1, subtipo pró-inflamatório, ativado pela via clássica, frente ao subtipo M2 (anti-inflamatório) (LUMENG et al., 2007). Os macrófagos estão presentes nos tecidos consumidores de glicose e nas ilhotas pancreáticas dos indivíduos com DM2 participando da patogênese do DM2 devido ao desencadeamento da resistência insulínica e disfunção de células β pancreáticas (EGUCHI; MANABE, 2013). Os macrófagos são recrutados e ativados devido ao meio diabetogênico presentes nas ilhotas, com presença elevada de glicose, e promovem alterações nas ilhotas provocando morte das células β (EGUCHI; MANABE, 2013). A ação dos macrófagos no estabelecimento e progressão do DM2 é decorrente a ativação do receptore Toll 4 (TLR4), secreção do polipeptídeo amilóide de ilhotas, em resposta a hiperglicemia, do NLRP3 e da liberação de espécies reativas de oxigênio (MASTERS et al., 2010; ZHOU et al., 2010). Juntos provocam o aumento da liberação de IL-1 β que se liga ao seu receptor presente nas células β , ativando NF- κ β e promovendo a regulação positiva do Fas com a fragmentação do DNA culminando na morte das células β (EGUCHI; MANABE, 2013). A presença de macrófagos é marcante no tecido adiposo e o excesso deste tecido, reflete em aumento do número de macrófagos especialmente o subtipo M1 (CASTOLDI et al., 2016). Desta forma indivíduos com obesidade, comorbidade frequente entre diabéticos, podem apresentar aumento de aproximadamente dez vezes na concentração de macrófagos no tecido adiposo contribuindo para liberação de adipocinas e inflamação, culminando em resistência insulínica (CASTOLDI et al., 2016; GUTIERREZ; PUGLISI; HASTY, 2009) (Figura 6).

Figura 6: Perfil quantitativo e qualitativo das células do sistema imune em indivíduos de peso corporal normal e obesos, e relação entre o perfil lipídico e imunológico envolvido no processo de resistência insulínica.



Fonte: Adaptado de: [www.frontiersin.org https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00637](https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00637), 2016. IL: interleucina; Treg: Linfócito T regulatório; Th: linfócito T helper. O tecido magro é rico em células que secretam citocinas anti-inflamatórias como eosinófilos, macrófagos M2, linfócitos Th2 e T regulatório participantes no controle da sensibilidade à insulina. Enquanto que no tecido obeso há predominância de células secretoras de citocinas pró-inflamatórias como macrófagos M1, monócitos, neutrófilos, linfócitos Th1 e Th17 que ativam vias de inibição do receptor de insulina levando à resistência insulínica.

Apesar do sistema imune inato demonstrar marcante atividade na patogênese do DM2, é sabido o papel regulador do sistema imune adaptativo neste processo com diferentes tipos de células T contribuindo para o estabelecimento de uma inflamação de baixo grau (XIA; RAO; ZHONG, 2017). As respostas imunes inata e adaptativa relacionam-se no DM2, com a resposta imune adaptativa podendo exacerbar a inata através da ativação de macrófagos em resposta a citocinas liberadas pelos linfócitos Th1 (XIA; RAO; ZHONG, 2017).

No DM2 é observado um desbalanço entre diferentes células do sistema imunológico com redução das taxas de células Treg, domínio do perfil Th1 frente a Th2 e papel duplo dos linfócitos Th17 (ZENG et al., 2012; XIA; RAO; ZHONG, 2017; DENG, et al, 2013). A resposta Th1 apresenta-se elevada em sangue total e tecido adiposo de pacientes DM2 e indivíduos pré-diabéticos e está relacionada à promoção da imunidade inata através da liberação de INF- γ e consequente polarização M1 nos macrófagos devido a uma resposta inflamatória (FEUERER et al., 2009). Além do distúrbio na resposta Th1 nos diabéticos, o desequilíbrio nos linfócitos T CD4⁺ é observado também entre os subtipos Th2 e Treg, como

relatado por ZENG et al. A resposta de perfil Th2 é considerada anti-inflamatória de modo que contribui para a polarização M2 nos macrófagos e liberação de citocinas anti-inflamatórias como a IL-10, no entanto esta resposta é deficiente e tardia nos diabéticos (CASTOLDI et al., 2016).

Os linfócitos T CD4⁺ de perfil Th17 são células responsáveis pela liberação de IL-17, citocina de caráter pró-inflamatório com níveis aumentados em diabéticos tipo 2; relacionada a resistência insulínica e obesidade devido sua capacidade de estimular a produção de TNF- α , podendo estar associada a distúrbios no metabolismo lipídico (MOCELLIN et al., 2004, GARIDOU et al., 2015; XIA; RAO; ZHONG, 2017). A resposta Th17 também está associada à nefropatia diabética com níveis aumentados deste subtipo em relação as células Treg evidenciando a prevalência do perfil pró-inflamatório nestes indivíduos (ABOUZEID; SHERIF, 2015). A resposta pró-inflamatória associada ao subtipo Th17 também é observada pela ação da IL-22 secretada, que age em fagócitos no tecido adiposo promovendo inflamação; no entanto, o perfil Th17 age de modo contrário por ação desta mesma interleucina ao diminuir os níveis de IL-6 e IL-23 (DALMAS et al., 2014).

A inflamação no DM2 é decorrente não somente da exacerbação dos subtipos celulares envolvidos na resposta inflamatória, mas também é devido à redução da resposta imune anti-inflamatória; esta redução é observada nos níveis de linfócitos T regulatórios (Treg) (JAGANNATHAN-BOGDAN et al., 2011). Este subtipo de célula T CD4⁺ apesar de representar uma pequena porcentagem dos linfócitos CD4⁺ é responsável por prevenir respostas inflamatórias exacerbadas através da alteração da expressão de receptores de superfície por modificação do microambiente em resposta a secreção de citocinas (GUZMAN-FLORES; PORTALES-PEREZ, 2013). O reduzido número de linfócitos Treg em indivíduos com DM2 somado à deficiência na expressão de CD39, molécula envolvida na estabilidade da função supressora das Treg Foxp3⁺ prejudica a capacidade destas células regularem as respostas Th1, Th2 e Th17.

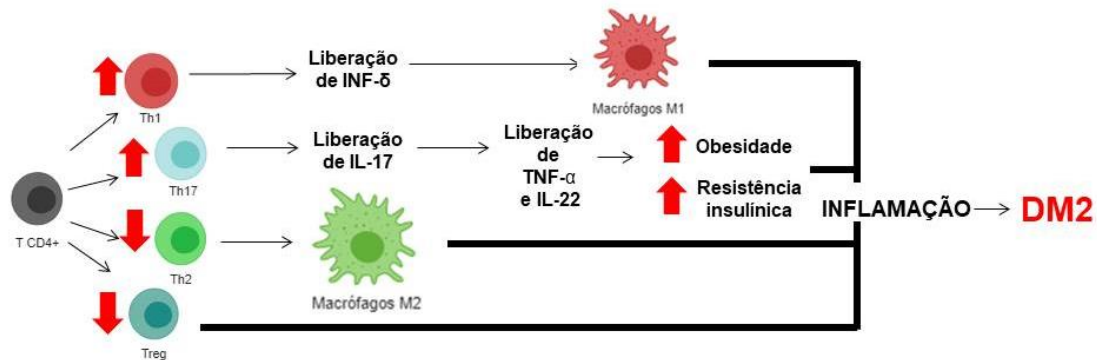
A redução na capacidade de regulação por este grupo celular compromete a manutenção da homeostase do sistema imunológico e provoca dano inflamatório nestes indivíduos (XIA; RAO; ZHONG, 2017; GU et al, 2017). Esta redução, de acordo com alguns autores, pode estar associada à redução da lipoproteína de alta densidade (*high density lipoprotein*-HDL), promovendo o prevalecimento dos subtipos Th1 e Th17 frente ao subtipo Treg (RUEDA et al, 2017; TINIAKOU et al., 2015; ZENG et al, 2012).

Os linfócitos T CD8⁺ apesar de não apresentarem relação direta com o DM2 apresentam-se em maior concentração em alguns tecidos de indivíduos obesos, interferindo na

resposta à insulina e desta forma colaborando indiretamente através de citocinas liberadas no desenvolvimento do DM2 (O'CONNELL et al., 2017). Já os linfócitos T natural Killer (iNKT) demonstram papel contrário combatendo a inflamação no tecido adiposo de cobaias e possivelmente protegendo contra distúrbios metabólicos decorrentes através da polarização M2 dos macrófagos e melhora na resposta à insulina (HUH et al., 2014).

Deste modo tanto a imunidade inata quanto a adquirida apresentam relação com a patogênese do DM2 com envolvimento de diferentes células e moléculas que podem contribuir ou dificultar a instalação da doença, com sua ação em diferentes tecidos podendo desencadear além do DM2, comorbidades associadas (Figura 7).

Figura 7: Perfis dos linfócitos T CD4+ envolvidos na inflamação resultante no diabetes mellitus tipo 2. Aumento do número de linfócitos dos perfis T helper (Th) 1 e Th17 e redução dos linfócitos Th2 e T regulatório, provocando polarização em macrófagos pró-inflamatórios (M1) e liberação de citocinas pró-inflamatórias



Fonte: O autor.

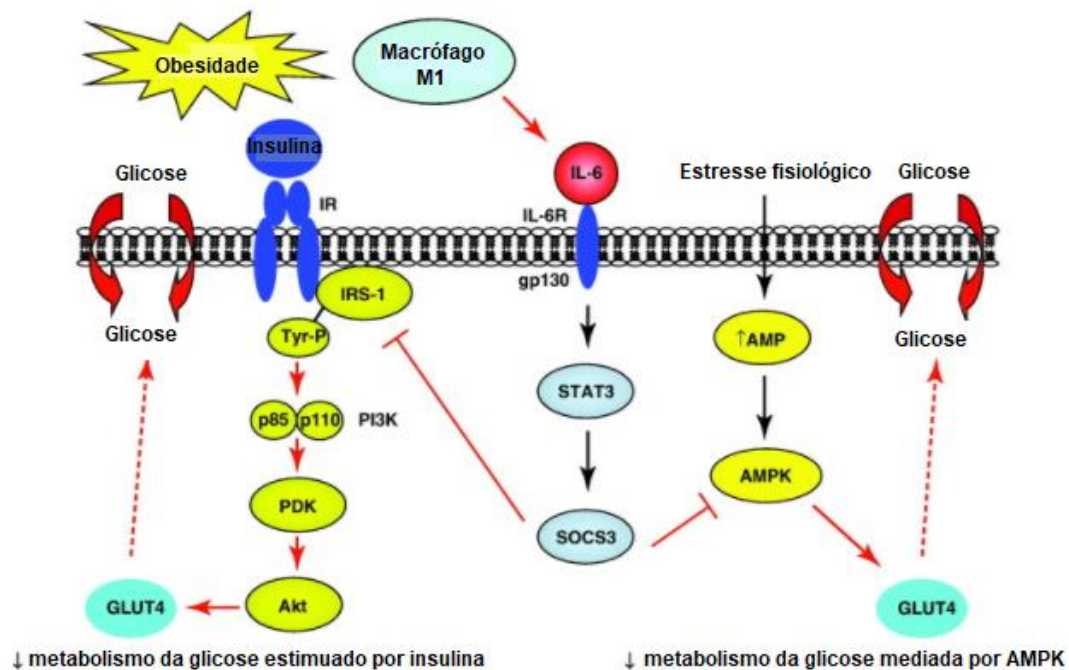
2.5.2 IL-6 e mecanismos fisiopatológicos do Diabetes Mellitus Tipo 2

A interleucina 6 (IL-6) é uma citocina multifuncional de perfil pró- e anti-inflamatório, produzida por diferentes tipos celulares incluindo adipócitos e linfócitos (SCHELLER et al, 2011; FISCHER, 2006; HAMID et al, 2004). Esta citocina é codificada pelo gene IL6 localizado no cromossomo 7p21; sua proteína correspondente possui 212 aminoácidos, com 21-26 kDa após glicosilação e apresenta um peptídeo sinal de 128 aminoácidos (TANAKA; NARAZAKI; KISHIMOTO, 2014).

A síntese e liberação desregulada da IL-6 estão associadas à inflamação crônica e a autoimunidade e uma superprodução é refletida em níveis séricos elevados cronicamente em indivíduos diabéticos tipo 2 (TANAKA; NARAZAKI; KISHIMOTO, 2014; HARDER-LAURIDSEN, 2014; ABDEL GALIL; EZZELDIN; EL-BOSHY, 2015; QI; RIFAI; HU, 2007; BRUUN et al, 2003). Além da relação direta entre os altos níveis de IL-6 e o DM2, esta interleucina também apresenta aumento decorrente à obesidade, patologia comum em indivíduos diabéticos tipo 2 (HARDER-LAURIDSEN et al, 2014; VISSER et al, 1999).

A participação da IL-6 na fisiopatogênese do DM2 é elucidada em modelos animais através do processo de imunometabolismo relacionado à ativação de vias comuns entre a IL-6 e a regulação negativa dos receptores de insulina (KORNETE; MASON; PICCIRILLO, 2013). Este processo é dado através da inibição da fosforilação do substrato 1 do receptor de insulina (IRS1) (Figura 8) (ARKAN et al., 2005; SABIO; DAVIS, 2010). Assim a resistência insulínica, um dos processos iniciais para patogênese do DM2, é positivamente correlacionada com os altos níveis de IL-6. Os efeitos dessa citocina ocorrem após a formação do complexo IL6R/gp130/IL6 ou subsequente ligação direta entre a citocina e seu receptor transmembranar (IL-6R) (figura 8) (KADO; NAGASE; NAGATA, 1999).

Figura 8: Ação da via da interleucina 6 (IL-6) sob receptor de insulina (IRS-1). Impedimento da fosforilação da insulina prejudicando a sinalização e consequente entrada de glicose via receptor de glicose 4 (GLUT-4).



Fonte: doi: 10.1016/j.tem.2011.05.001. Adaptado de: New insights into insulin resistance in the diabetic heart. S. Gray, J.K. Kim, 2011, Trends Endocrinol Metab. 2011 Oct;22(10):394-403. doi: 10.1016/j.tem.2011.05.001.

Essa citocina participa inicialmente da resposta imune inata, mas forma um elo com respostas mais específicas ao promover a ativação e diferenciação de linhagens linfocíticas, ativando deste modo a resposta imune adquirida (ABDEL GALIL; EZZELDIN; EL-BOSHY, 2015). A IL-6 contribui para o avanço da imunidade celular ao promover a diferenciação de linfócitos T citotóxicos (TANAKA; NARAZAKI; KISHIMOTO, 2014).

A perda da homeostase metabólica e imunológica pode afetar o indivíduo genética e epigeneticamente predisposto ao DM2, com a inflamação sistêmica e a mudança de perfil de

resposta T promovendo o DM2 e também suas comorbidades associadas (NOLAN; DAMM; PRENTKI, 2011; MOON et al., 2012). O desenvolvimento de nefropatia diabética comorbidade frequentemente associada ao DM2 não tratado ou com hiperglicemia não controlada pode estar relacionado ao desequilíbrio imune e a infiltração de linfócitos T nos tecidos renais (MOON et al., 2012).

O papel da IL-6 como mediador inflamatório e indutor de uma variedade de respostas biológicas em diferentes tipos celulares com participação tanto da resposta imune inata quanto adaptativa é permitido somente após ligação ao seu receptor (CHOY; ROSE-JONH, 2017). O receptor da interleucina-6 é expresso nas formas transmembranar ou solúvel (sIL-6R); a ligação da IL-6 a um destes tipos de receptor pode desencadear uma série de respostas celulares, incluindo inflamação (HADDICK, 2017). O receptor do tipo transmembranar (IL-6R) pode ser convertido a sIL-6R após sofrer clivagem por proteólise limitada ou devido spllicing alternativo com perda de região do mRNA correspondente a estrutura do domínio transmembranar do receptor, provocando redução da expressão do IL-6R (SPOOREN et al, 2011; FLYNN et al, 2015; SCHUMACHER et al, 2015). O sIL-6R ao se ligar a gp130, presente na membrana celular de uma ampla variedade de tipos celulares, forma um complexo que induz transsinalização (SPOOREN et al, 2011; FLYNN et al, 2015; SCHUMACHER et al, 2015).

Enquanto o sIL-6R é expresso em uma ampla variedade de tipos celulares o receptor transmembranar de IL-6 (IL-6R) é expresso em hepatócitos e células do sistema imune como subconjuntos de linfócitos T, macrófagos e neutrófilos (FLYNN et al, 2015). O aumento nos níveis de IL-6R e do seu mRNA em células hepáticas e em PBMCs está relacionado a doenças crônicas com inflamação sistêmica como a cirrose; doenças autoimunes como Artrite Reumatóide, Doença de Crohn e DM1 que também mostram aumento nos níveis de expressão de IL-6 por ligação ao IL-6R (DIRCHWOLF; RUF, 2015; HAMID et al, 2004; CHEN et al, 2017). A inflamação ocorre após ligação da citocina e seu receptor, desencadeando respostas celulares através da via das Janus quinase que culmina na produção de citocinas inflamatórias por linfócitos T e B, maturação de linfócitos B e produção de outras citocinas inflamatórias como TNF- α e IL-1 β (CERI; DICKINSON; TAAMS, 2015).

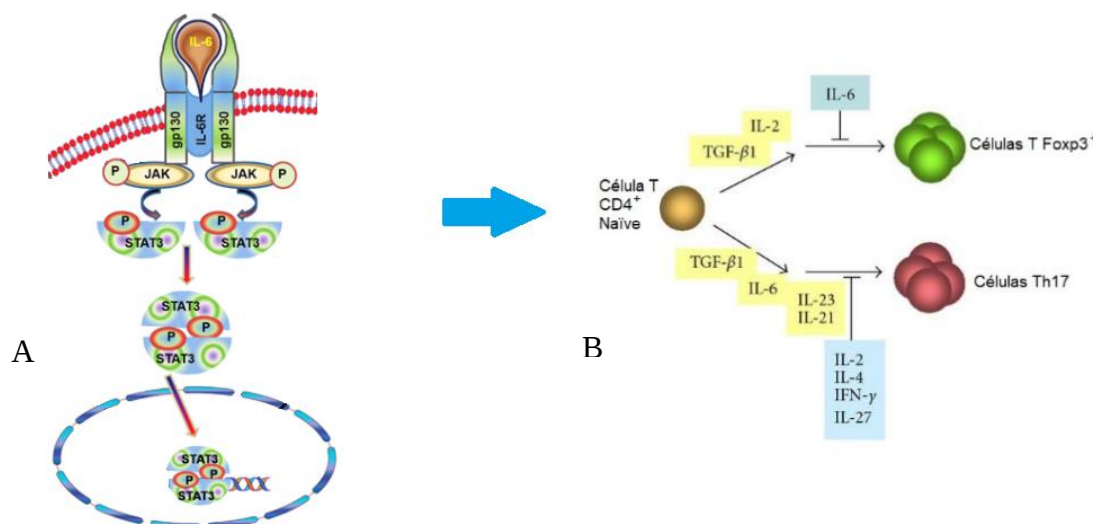
2.5.3 STAT3 e mecanismos fisiopatológicos do Diabetes Mellitus Tipo 2

O STAT3 é um fator de transcrição que possui um domínio de ligação ao DNA ativado fisiologicamente pela presença de IL-6 (HODGE; HURT; FARRAR, 2005). O complexo STAT3/IL6 atua na defesa contra microrganismos, culminando no aumentando da

liberação da Proteína C reativa (PCR) (FISCHER, 2006). Participa da família de proteínas STAT, um conjunto de proteínas que são fosforiladas quando ativadas e respondem a um conjunto de estímulos incluindo citocinas (ZHANG et al., 2013).

A IL-6 age sobre o transdutor de sinal e ativador de transcrição 3 (STAT3) através da via JAK1, induzindo a fosforilação e translocação nuclear deste fator de transcrição e influenciando na diferenciação dos linfócitos T (HODGE; HURT; FARRAR, 2005; NIEMAND et al., 2003) (Figura 9).

Figura 9: Formação do complexo IL-6/IL-6R/gp130 e diferenciação das células T naíve. A: formação do complexo IL-6/IL-6R/gp130 promove fosforilação da proteína Janus Kinase (JAK), fosforilação da STAT3 por ação da JAK, dimerização da STAT3, translocação nuclear e ligação através do seu domínio DNA-ligante a uma molécula de DNA. B: Participação da IL-6 na diferenciação de linfócitos T CD4⁺ em Th17 e bloqueio da diferenciação dos T naíve em células T Foxp3⁺.



Fonte: Adaptado de: Oncogene. 2016 Jul 28;35(30):3965-75. doi: 10.1038/onc.2015.466. Epub 2015 Nov 30

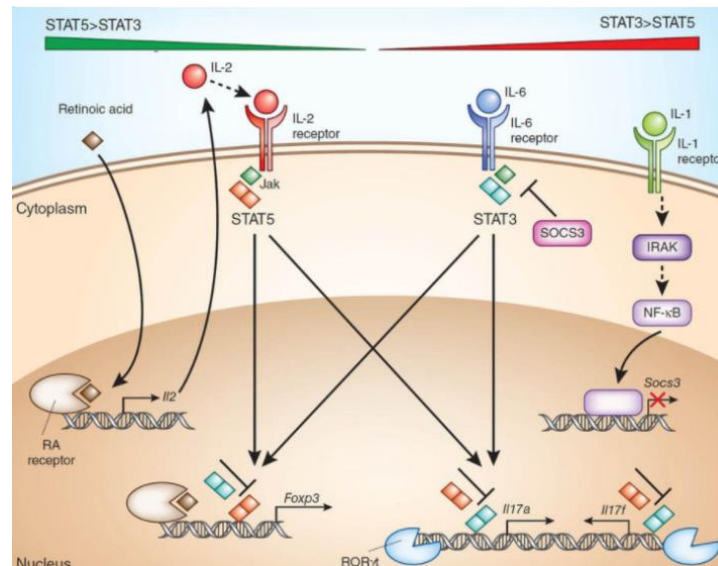
Apesar da ativação desta molécula em situações fisiológicas a sua ativação prolongada está relacionada ao desenvolvimento de doenças inflamatórias crônicas (WANG et al., 2013). A fosforilação constitutiva da STAT3 é relacionada à resistência insulínica, sendo relatada ativação sustentada de STAT3 em músculo esquelético de indivíduos diabéticos em resposta ao excesso de lipídeos, porém seu papel na patogênese do DM2 não está completamente compreendido (WHITE et al., 2015; MASHILI et al., 2013). A ativação excessiva da STAT3 ocorre em resposta à presença excessiva de ácidos graxos e também devido à presença de citocinas sendo evidenciado o aumento da sua ativação em indivíduos obesos (MASHILI et al., 2013; KIM, 2009).

O STAT3 apresenta papel duplo no processo de sinalização da insulina, respondendo de acordo com o contexto ambiental e celular, podendo apresentar tanto função fisiológica quanto patológica, esta última quando em níveis elevados. Em modelo murino a depleção do gene da STAT3 foi capaz de manter a sensibilidade à insulina, mesmo em excesso de nutrientes, funcionando como um efeito protetor ao desenvolvimento de DM2 decorrente à resistência insulínica (KIM, 2009).

Apesar do papel desta molécula em modelo animal, tanto as ações da IL-6 quanto da STAT3 variam de fisiológica a patológica a depender dos seus níveis de expressão e do contexto orgânico (INOUE et al., 2006). A IL-6 quando em níveis elevados promove a resistência insulínica, por meio de ações no receptor de insulina; porém quando em níveis fisiológicos participa da sinalização hepática de insulina por ação deste hormônio no cérebro, ambos os processos apresentam o STAT3 como fator chave (KIM, 2009).

O STAT3 também demonstra relação com o sistema imune apresentando associação com doenças autoimunes devido a seu papel de coordenação na transcrição do FOXP3, um gene associado à manutenção do perfil imune regulatório (Figura 10) (PALLANDRE et al., 2007).

Figura 10: Inibição da transcrição do gene FOXP3 em resposta ao predomínio da Stat3 em resposta a ligação da interleucina 6 (IL-6) a seu receptor (IL-6R). A maior proporção do STAT5 em relação a STAT3 mantém a transcrição do gene *FOXP3* e os níveis de linfócitos T regulatórios, enquanto que a predominância da Stat3, em resposta a ligação da IL-6 a seu receptor de membrana promove o perfil Th17. A consequente ativação de Stat3 e seu transporte ao núcleo celular bloqueia a transcrição do FoxP3 e promove a transcrição da interleucina 17, característica do perfil de resposta Th17.



Fonte: Adaptado de: Frontiers in Immunology. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00072>

2.5.4 FoxP3 e mecanismos fisiopatológicos do Diabetes Mellitus Tipo 2

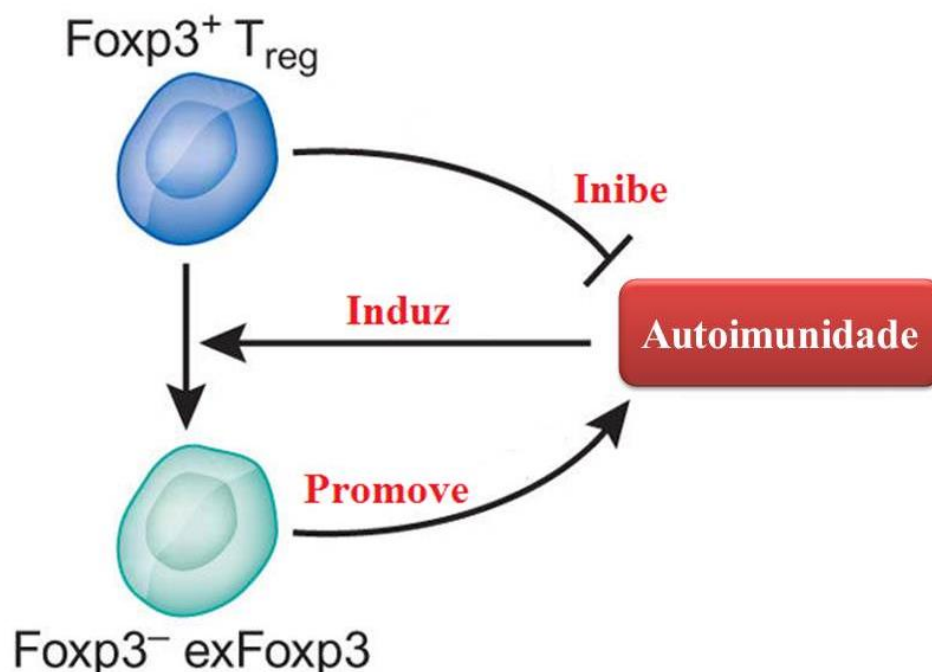
O FoxP3 um fator de transcrição importante para manutenção da homeostase imune, é expresso constitutivamente em células T regulatórias (Treg) e caracteriza este subtipo celular apresentando importante papel para a manutenção da homeostase imune (KIM, 2009; ZHOU et al., 2009; KORNETE; MASON; PICCIRILLO, 2013; FONTENOT et al., 2005). Mutações com perda de função no gene *FOXP3* promove falha no funcionamento das células T regulatórias (Treg) e estão associada a doenças autoimunes como Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES) e Diabetes Mellitus Tipo 1 (DM1) (D'HENNEZEL et al., 2011; HORI; NOMURA; SAKAGUCHI, 2003)

Os linfócitos Treg são células não totalmente diferenciadas que apresentam função de supressão de células T maduras (CORTHAY, 2009; SCHMIDT; OBERLE; KRAMMER, 2012). Exercem importante papel na manutenção de um ambiente imune homeostático, impedindo a configuração de um microambiente inflamatório com recrutamento e ativação de linfócitos, elementos necessários para o desenvolvimento de uma resposta imunológica celular efetiva (OHKURA; KITAGAWA; SAKAGUCHI 2013; KOENEN et al., 2008). O Foxp3 é um fator de transcrição essencial para manutenção e diferenciação do subgrupo de

linfócitos Treg, de modo que o controle dos seus níveis de expressão é importante para a homeostase do sistema imune e determinação do perfil de resposta imunológica (ZHOU et al, 2009; OHKURA; KITAGAWA; SAKAGUCHI, 2013; NIE et al, 2015).

A presença ou ausência do FoxP3 determina se as células Treg permanecem células de regulação e contenção do sistema imune ou se permitem a diferenciação de subtipos de linfócitos envolvidos no desencadeamento de respostas imunológicas (ZHOU et al, 2013). Além da alteração nos níveis de expressão do FoxP3 na polarização dos subtipos de linfócitos, a expressão desta molécula também se apresenta de modo transiente ou instável em algumas células, podendo transformar os linfócitos Tregfoxp3⁺ em células exFOXP3, células envolvidas no processo de autoimunidade (Figura 11). As exFOXP3 apresentam semelhança ontogênica com as Tregfoxp3⁺ porém não possuem a capacidade de distinguir entre antígenos próprios e externos tornando-as potencialmente autorreativas devido a seu extenso poder de reconhecimento a antígenos próprios porém sem a habilidade de impedir a ativação imune em resposta a estes (ZHOU et al, 2009). A instabilidade das células Tregfoxp3⁺ é sugerida em pesquisas prévias, com relatos do aumento nas proporções de exFOXP3 em diabetes mellitus tipo 1 (DM1), um outro subtipo de diabetes também de caráter autoimune com envolvimento de linfócitos Th17, células diferenciadas a partir da supressão do *FOXP3* por ação da IL-6 (ZHOU et al, 2009; KIMURA; KISHIMOTO, 2010).

Figura 11: Transição de células T regulatórias (Treg) para células exFOXP3 e relação de retroalimentação positiva entre exFOXP3 e a autoimunidade. Perda da expressão de FoxP3 em células Treg resulta na conversão do perfil T supressor para autorreativo (exFoxp3). Células convertidas perdem sua capacidade imunossupressora tornando-se efectoras ou de memória contribuindo para o estabelecimento e agravamento da autoimunidade.

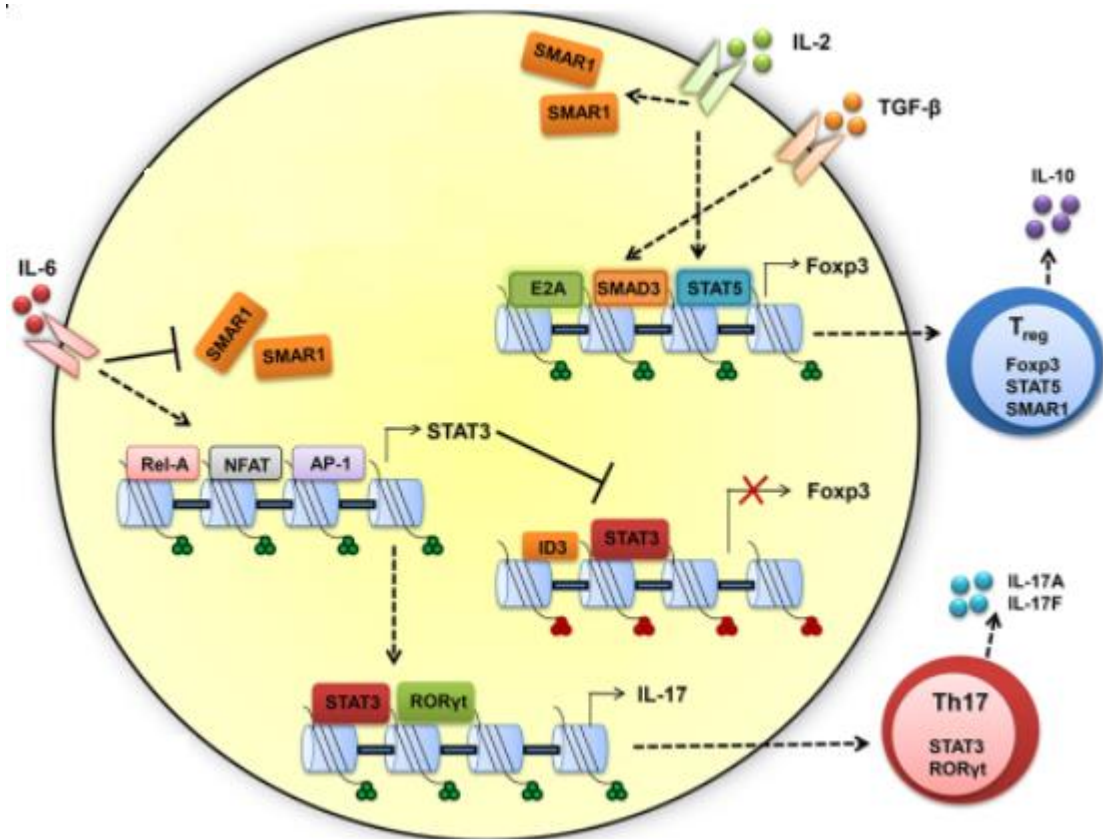


Fonte: Adaptado de Daniel Hawiger & Richard A Flavell, 2009, Nature Immunology.

O DM2 apresenta diminuição na quantidade de células T regulatórias periféricas com diminuição nas taxas de $CD4^+CD25^{hi}$ Treg/Th17 e $CD4^+CD25^{hi}$ Treg/Th1 relacionada tanto ao DM2 quanto a complicações micro e macrovasculares associadas a esta doença (ZENG et al., 2012). Estas alterações na quantidade de células Treg podem ser decorrentes da presença de diferentes citocinas, podendo assim estar relacionada ao microambiente presente nestes indivíduos (LA CAVA, 2008).

Alterações nos níveis de IL-6, uma citocina com nível sérico aumentado em indivíduos com DM2, como anteriormente descrito, podem promover uma condição inflamatória ao diminuir a expressão de FoxP3 e permitir a diferenciação de respostas inflamatórias em detrimento a manutenção do perfil Treg (SENTHILKUMAR et al., 2017). Desta forma, desequilíbrio nos níveis da IL-6 pode está associado a doenças autoimunes por gerar prejuízo na quantidade de linfócitos regulatórios através da diminuição na expressão do gene *FOXP3* (HIRANO et al, 1990; KIMURA; KISHIMOTO, 2010; KOMATSU et al, 2014 (Figura 12).

Figura 12: Diferenciação de linfócitos T naïve em linfócitos Th17 ou T regulatórios de acordo com a presença ou ausência do Stat3, em resposta a liberação de citocinas. A citocina IL-6 promove a ativação do Stat3 e consequente bloqueio na transcrição do gene *FOXP3* levando a liberação da interleucina 17 característica do perfil Th17, envolvido em processos autoimunes. Enquanto a IL-2 e o TGF- β sinalizam para a expressão de SMAR1 induzindo a expressão de *FOXP3*, promovendo a manutenção do fenótipo T participante da homeostase do sistema imunológico.



Fonte: Adaptado de: Bhalchandra Mirlekar, 2017, *Frontiers in Immunology* <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00072>.

Considerando o perfil autoimune do DM2, o papel do FoxP3 na supressão da autoimunidade e do processo inflamatório desregulado, a diminuição nas razões CD4⁺CD25^{hi}Treg/Th1 e CD4⁺CD25^{hi}Treg/Th17 e o aumento dos níveis séricos da IL-6 nos pacientes diabéticos; fica clara a necessidade de avaliação de moléculas-chave da via IL-6/FoxP3 para o melhor entendimento do caráter autoimune na fisiopatogênese do DM2. A compreensão da participação dos níveis de expressão do *IL6R*, *STAT3* e *FOXP3* pode tanto contribuir para o esclarecimento da fisiopatogênese da doença como pode também colaborar no estudo de potenciais novos alvos terapêuticos para o DM2, visto que as terapias atualmente disponíveis apenas minimizam os efeitos da glicemia e procuram retardar o surgimento de comorbidades.

3. METODOLOGIA

3.1 TIPO DE ESTUDO

O presente estudo foi desenvolvido em duas etapas, sendo a primeira um estudo observacional, do tipo caso-controle, com componente analítico, para avaliação dos níveis de expressão do mRNA dos genes IL6R, STAT3 e FOXP3 em indivíduos com diabetes mellitus tipo 2. A segunda etapa consistiu em um estudo experimental, do tipo randomizado para avaliação *in vitro* do efeito da suplementação com D-glucose na expressão do mRNA dos genes IL6R, STAT3 e FOXP3 em células de indivíduos saudáveis e com diabetes mellitus tipo 2.

3.2 POPULAÇÃO DE ESTUDO

3.2.1 Indivíduos com Diabetes Mellitus Tipo 2

Foram selecionados 18 indivíduos com Diabetes Mellitus Tipo 2, do sexo feminino, diagnosticados de acordo com o critério da Associação Americana de Diabetes (ADA), segundo os critérios de inclusão e exclusão.

Critérios de inclusão:

- Idade acima de 18 anos;
- Diagnóstico de Diabetes Mellitus Tipo 2 de acordo com os critérios do ADA
- Ausência de sinais de inflamação ou infecção;
- Aceitação da participação na pesquisa.

Critérios de exclusão:

- Menores de 18 anos;
- Presença de infecção aguda ou crônica no momento do recrutamento e coleta de amostra biológica;
- Gestantes;
- Uso de bebida alcoólica;

- Tabagismo;
- Impossibilidade de coleta de sangue periférico;
- Não consentimento em participar da pesquisa.

3.2.2 Voluntários saudáveis

O grupo controle foi formado por 18 voluntários saudáveis, do sexo feminino, escolhidos aleatoriamente. Esses indivíduos foram submetidos à entrevista com o pesquisador responsável e incluídos na pesquisa apenas se cumprissem os critérios de inclusão na pesquisa.

3.3 COLETA DE SANGUE TOTAL PERIFÉRICO E ISOLAMENTO DE PBMC

Foram coletadas amostras de sangue total periférico em tubo de 4 mL contendo o anticoagulante (EDTA- ácido etilenodiamino tetracético) para posterior obtenção de mRNA usado na avaliação da diferença de expressão dos genes estudados, em amostras de sangue total.

As células mononucleares de sangue periférico (PBMC) foram obtidas a partir de amostras de sangue total periférico obtidas por coleta de sangue à vácuo, em tubo heparinizado de 15mL, de acordo com o método de centrifugação por gradiente de densidade (GE Healthcare Biosciences, Pittsburg, PA, EUA). As PBMC's foram cultivadas na concentração de 1×10^6 células por mL em meio RPMI-1640 (Gibco, Carlsbad, CA, EUA), suplementado com 10% de soro fetal bovino e os antibióticos Penicilina na concentração de 10U/mL (Gibco, Carlsbad, CA, EUA) e estreptomicina na concentração de 10µg/mL (Gibco, Carlsbad, CA, EUA). As PBMC's foram mantidas a 37°C, sob 95% de umidade relativa e 5% de CO₂. A viabilidade das células foi checada pelo método do Trypan Blue (concentração de 1:2)

Os cultivos de PBMC's foram divididos em dois grupos, um estimulado com D-glucose na concentração final de 200µg/dL e outro não estimulado. Posteriormente cada grupo foi subdividido em dois subgrupos para avaliação da expressão do mRNA dos genes IL6R, STAT3 e FOXP3 nos períodos de 0 e 4 horas nas diferentes condições.

3.4 EXTRAÇÃO DE mRNA E SÍNTESE DE cDNA

O RNA total foi extraído pelo método de TRIzolTM (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) de acordo com o protocolo recomendado pelo fabricante. O RNA foi diluído em 20µL de

água livre de RNases (RNase free), quantificado em espectrofotômetro Nanodrop ND 1000 (Nanodrop Technologies Inc, Delaware, EUA) e avaliado quanto a sua integridade por eletroforese em gel de agarose à 1,5%. As amostras que apresentaram na quantificação absorvâncias de 1.8 e 2.0 na razão de 260/280 e integridade dos fragmentos 23S e 18S na eletroforese foram consideradas adequadas e encaminhadas para a síntese de cDNA.

A síntese de cDNA foi realizada usando a transcriptase reversa M-MuLv e random primers de acordo com a metodologia recomendada pelo fabricante (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA). Todas as amostras de cDNA apresentaram concentração final de 500ng. O cDNA foi armazenado em -20°.

3.5 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE EM TEMPO REAL

Os níveis de expressão do mRNA dos genes IL6R, STAT3, FOXP3 e GAPDH foram mensurados pelo sistema de detecção ABI 7500 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) através do método da reação em cadeia da polimerase em tempo real (qRT-PCR) utilizando cDNA, sondas fluorogênicas específicas (TaqMan 20X, Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) e MasterMix disponível comercialmente (Applied Biosystems, CA, EUA) conforme protocolo recomendado pelo fabricante.

Os genes GAPDH e RPLP0 foram utilizados como genes de referência para normalização dos dados. O ensaio de expressão do mRNA para o *RPLP0* utilizou 10µM de cada primer (R/F) (Tabela 1), 5µl de SYBR® MasterMix (1X) (Thermo Fischer Scientific; former Savant, MA, EUA), 1 µl de cDNA e água ultrapura para completar o volume final de 10µl.

O ensaio de expressão gênica foi realizado em triplicata técnica, para todos os genes avaliados e os dados obtidos pelo sistema de detecção ABI 7500 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) foram analisados no software EXCEL usando o método do fator de normalização.

Tabela 2: Gene avaliado, sequência do primer e código da sonda

Gene	Sequência do Primer
<i>Ribossomal protein P0 (RPLP0)</i>	F: GCGACCTGGAAGTCCAACTA
	R: TCTGCTTGGAGCCCACATTG

Sonda Taqman	
<i>Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)</i>	
<i>IL6R</i>	hs_01075666
<i>STAT3</i>	hs_00374280
<i>FOXP3</i>	hs_01085834

3.6 SELEÇÃO DOS GENES DE REFERÊNCIA

Cinco amostras de cDNA de indivíduos com DM2 e controles saudáveis foram utilizadas para seleção dos genes de referência. Todas as amostras utilizadas foram obtidas de indivíduos do mesmo sexo, originários da região nordeste, com idades pareadas e sem doenças inflamatórias, infecciosas ou câncer.

A extração do RNA foi realizada de acordo com o anteriormente descrito no tópico 3.3. A síntese de cDNA utilizou a enzima transcriptase reversa M-MuLv (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) e o kit de Sistema de Transcrição Reversa ImProm-II (Promega, EUA) usados de acordo com recomendações do fabricante.

Neste trabalho foram avaliados nove genes comumente usados como genes de referência em ensaios de qRT-PCR para amostras de humanos (KAR et al., 2016) (Tabela 2).

Tabela 3: Gene e molécula codificada.

Gene	Molécula
<i>G6PD</i>	Glicose-6-fosfato desidrogenase
<i>B2M</i>	Microglobulina-B2
<i>GUSB</i>	B-glucoronidase
<i>HSP90</i>	Proteína do choque térmico 90
<i>RPLP0</i>	Proteína ribossomal P0
<i>GAPDH</i>	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
<i>HPRT1</i>	Hipoxantina fosforibosiltransferase 1
<i>ACTB</i>	B-actina
<i>18S rRNA</i>	RNA Ribossomal 18S

3.6.1 qRT-PCR e Desenho dos primers

Apenas para os genes *ACTB* e *18S rRNA* foi utilizada a tecnologia TaqMan, sendo usado primers e SYBR[®] Green para todos os outros genes avaliados como possíveis genes de referência. A qRT-PCR para o gene *FOXP3*, utilizado para avaliação da performance dos genes selecionados, também foi pela metodologia TaqMan.

A sequência de todos os genes foi obtido do GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/) e o desenho dos primers foi feito através do NCBI/Primer-BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/toools/primer-blast).

A temperatura de melting para cada primer e o tamanho do amplicon foram testados para diferentes concentrações de cDNA em diluição seriada para cada gene avaliado como possível gene de referência. A determinação da temperatura e da concentração foi estabelecida após eletroforese e avaliação do gel de agarose à 1,5%.

3.6.2 Eficiência de amplificação

A eficiência da reação para *18S rRNA* e *ACTB* foi considerada 100% como assegurado pelo fabricante; para os demais possíveis genes de referência avaliados, a eficiência (E) foi

determinada através de curva padrão determinada pela diluição serial de amostras de cDNA. Eficiências entre 95-105% foram consideradas aceitáveis. Os dados e o coeficiente de correlação (R^2) foram calculados pelo ABI 7500.

3.6.3 Análise de estabilidade de expressão

A avaliação da estabilidade de expressão dos possíveis genes de referência foi realizada pelos softwares GeNorm (Versão v3.5), NormFinder (versão 20) e BestKeeper (versão 1). O GeNorm foi usado também para verificar o número mínimo de genes necessários para normalização dos dados, assim como a combinação ideal entre os genes avaliados.

Os valores relativos lineares foram avaliados pelo método ΔC_q com correção das eficiências pela equação de Spiegelaerevet e colaboradores (2015). A eficiência para *18S rRNA* e *ACTB* foi considerada igual a 2 e, para os demais primers, foi calculada de acordo com informações fornecidas pelo ABI 7500.

Após a seleção dos genes de referências mais estáveis e da melhor combinação mínima de genes de referências necessários, o gene *FOXP3* foi utilizado para avaliar a performance dos genes selecionados.

3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas dos dados obtidos foram realizadas utilizando o programa estatístico para Windows: GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA). O teste de Kolmogorov-Smirnov (KS) foi usado para verificação da normalidade das amostras. De acordo com a distribuição dos dados, foi utilizado o teste de T-student para comparar os níveis de expressão de cada gene, nas diferentes combinações avaliadas neste trabalho, em amostras com distribuição normal; enquanto que para amostras com distribuição não normal, foi aplicado o teste de Mann-Whitney *U*.

4. RESULTADOS

4.1 GENES DE REFERÊNCIAS SELECIONADOS

Os valores do coeficiente de correlação para linearidade (R^2) e eficiência (E) dos nove potenciais genes de referência avaliados variaram entre 0.999 e 1.000, e entre 95.12% - 104.79% (Tabela 3). Todos os valores estão de acordo com as instruções das diretrizes MIQE.

Tabela 4: Sequência dos primers e identificação das sondas de PCR e eficiência dos genes candidatos e gene alvo.

Nome	Sequência do Primer / Referência sonda Taqman ®	Produto size/bp	R^2	E/%
G6PD	F: CCGTGATGAGAAGGTCAAGGT R: TACTGGCCCAGGACCACATT	72	0.999	95.12
B2M	F: TGAGTGGCATGAAGAAGGTGT R: GGCAGTTCTTTGCCCTCTCT	77	0.999	104.79
GUSB	F: CACTGTGGCTGTCAACCAAGA R: TCCGCATCCTCATGCTTGTT	84	1	100.51
HSP90	F: GCCTACTTGGTGGCAGAGAA R: CAGCAGAAGACTCCCAAGCA	79	0.999	98.38
EF1A	F: GAGGCTGCTGAGATGGGAAA R: CGTTCACGCTCAGCTTTCAG	74	1	102.37
RPLP0	F: CGACCTGGAAGTCCAACATA R: TCTGCTTGGAGCCCACATTG	100	0.999	102.02
GAPDH	F: CTGATGCCCCCATGTTTCGT R: GCAGGAGGCATTGCTGATGA	80	0.999	96.81
ACTB	hs_99999903_m1	171	1	100
18S	hs_03003631_g1	187	1	100
HPRT1	F: ACAGGACTGAACGTCTTGCT R: GAGCACACAGAGGGCTACAA	74	0.99	101.43
FOXP3	hs_1085834_m1	61	1	100

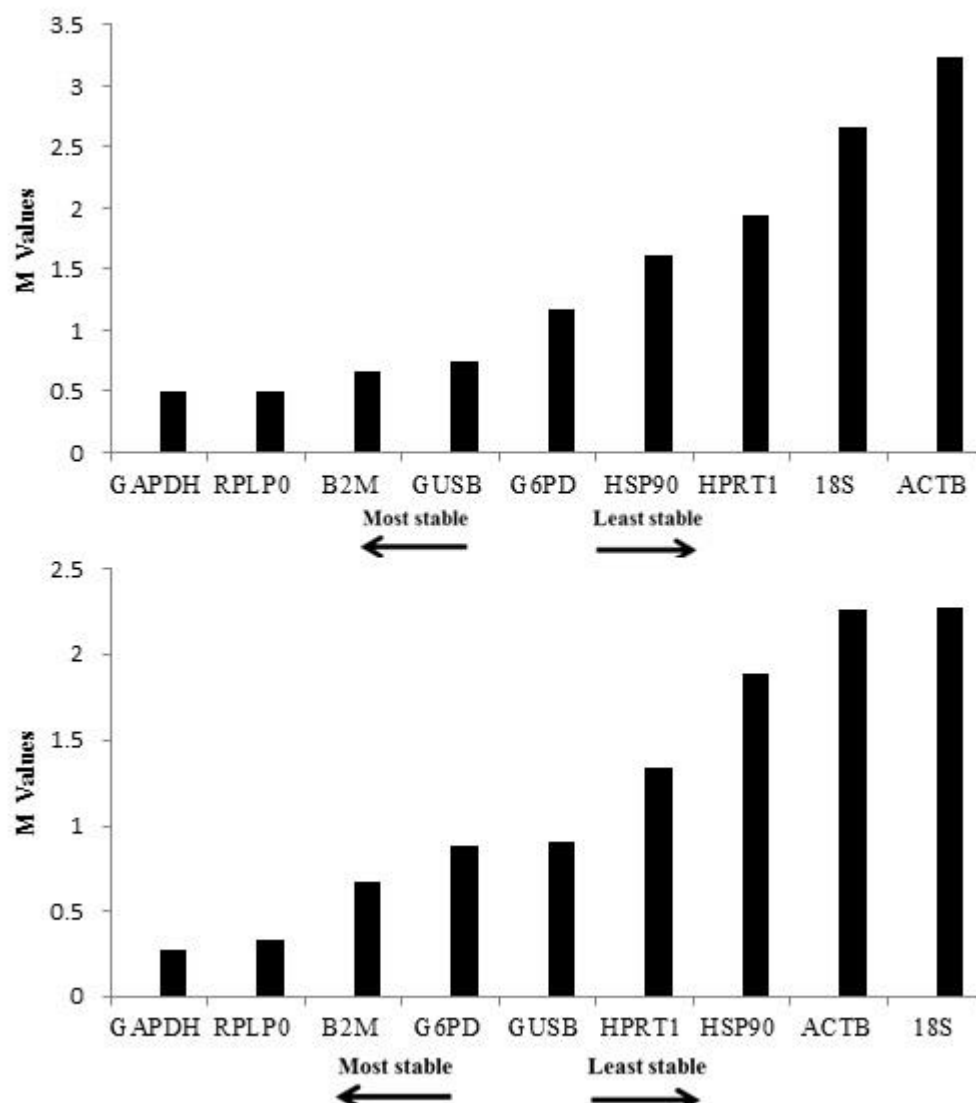
De acordo com as análises utilizando o GeNorm, são necessário, no mínimo, 2 genes de referência para normalização dos dados (V2/V3 variação de pairwise = 0.053). Os dois genes mais estáveis, segundo análises com GeNorm, Normfinder e BestKeeper, são o

GAPDH e o *RPLP0*. O programa GeNorm apresentou valor de $M=0.5022$ para o *RPLP0* e para o *GAPDH*, enquanto que o NormFinder apresentou valores de $M= 0.328$ e 0.280 para o *RPLP0* e *GAPDH*, respectivamente. O BestKeeper mostrou o valor do teste de relação de Person com $r=0.976$ tanto para *RPLP0* quanto para o *GAPDH*.

Segundo os mesmos programas citados acima, entre os possíveis genes de referência, os menos estáveis foram *ACTB* e o *18S rRNA*. O valor de M , utilizando o GeNorm, para os genes *ACTB* e *18S rRNA* foram 3.231 e 2.655 , respectivamente. O NormFinder apresentou valor M iguais a 2.269 e 2.281 para *ACTB* e *18rRNA*, respectivamente. No entanto, de acordo com os resultados exibidos pelo BestKeeper, entre os potenciais genes de referências avaliados, o *HSP90* e o *HPRT1* são os mais instáveis, com valores de r iguais a -0.248 e 0.406 .

A melhor combinação de genes de referência, de acordo com os dados fornecidos pelo GeNorm e NormFinder, é uma associação do *RPLP0* e *GAPDH* (Figura 18)

Figura 18: Valor de M para todos os potenciais genes de referência.



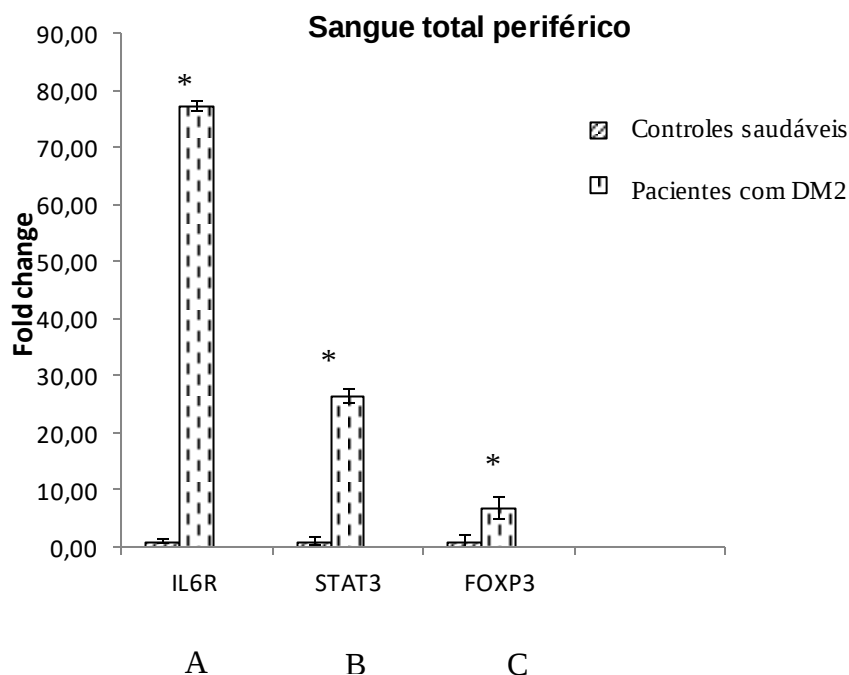
A: Valores de M para todos os genes avaliados, em ordem decrescente de estabilidade de acordo com o GeNorm.
 B: Valores de M para todos os genes avaliados, em ordem decrescente de estabilidade de acordo com o NormFinder.

4.2 NÍVEIS DE EXPRESSÃO DO mRNA DE *IL6R*, *STAT3* E *FOXP3* EM INDIVÍDUOS COM DM2 E CONTROLES SAUDÁVEIS – AVALIAÇÃO EM SANGUE TOTAL PERIFÉRICO

A análise dos níveis de expressão do mRNA para os genes *IL6R*, *STAT3* e *FOXP3* em amostras de sangue total periférico, através do método de fator de normalização, mostrou diferença estatisticamente significativa ($p\text{-value} < 0.05$) entre o grupo de indivíduos afetados pela doença, em comparação a controles saudáveis (Figura 13). Foram observados aumentos

de 77.21 para *IL6R*, 26.4 para *STAT3* e 6.83 referente à *FOXP3* para pacientes com DM2 quando comparados a indivíduos saudáveis.

Gráfico 1: Expressão gênica representando os níveis de mRNA em Fold Change em indivíduos com DM2 e controles saudáveis em amostra de sangue total periférico



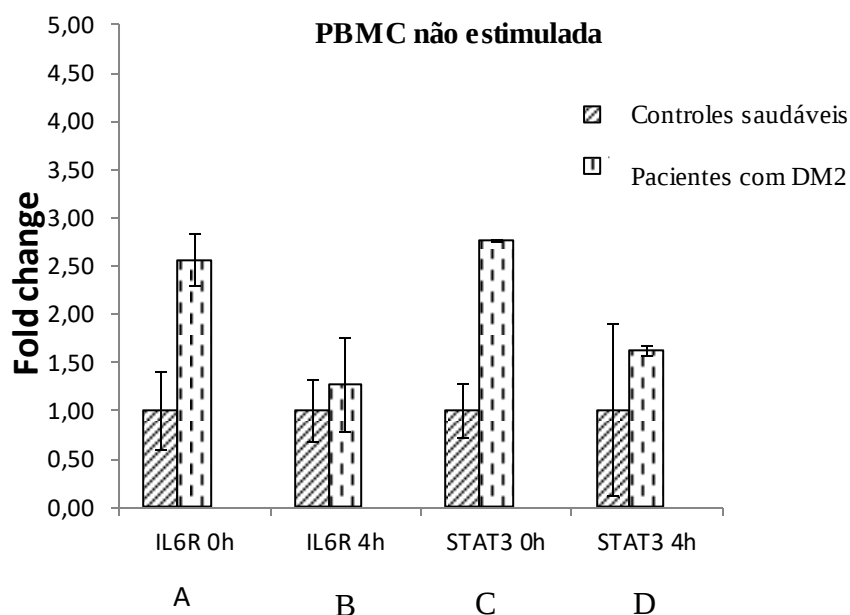
(A): Comparação dos níveis de expressão de mRNA para o gene *IL6R*, grupo de controles saudáveis *versus* grupo de pacientes com DM2. (B): Comparação dos níveis de expressão de mRNA para o gene *STAT3*, entre o grupo de controles saudáveis e o grupo de pacientes com DM2. (C): Comparação dos níveis de expressão de mRNA para o gene *FOXP3*, entre o grupo de controles saudáveis e o grupo de pacientes com DM2. O (*) representa um p-value<0.0001.

4.3 NÍVEIS DE EXPRESSÃO DO mRNA DE *IL6R*, *STAT3* E *FOXP3* EM INDIVÍDUOS COM DM2 E CONTROLES SAUDÁVEIS – ENSAIO EM PBMC

4.3.1 Expressão em PBMC's não estimuladas

A análise dos níveis de expressão do mRNA para *IL6R* e *STAT3*, em PBMC's de indivíduos diabéticos não estimuladas com D-glucose para o período de 0 hora, quando comparada a indivíduos saudáveis, apresentou Fold Change de 2.55 e 2.75, respectivamente. Após 4 horas de incubação, nas condições descritas no tópico 4.3, a FC para as PBMC's de indivíduos com DM2 foi de 1.26 e 1.61 para o mRNA de *IL6R* e *STAT3*, respectivamente, também na condição não estimulada com D-glucose (Gráfico 2).

Gráfico 2: Expressão gênica representando os níveis de mRNA em Fold Change em indivíduos com DM2 e controles saudáveis em cultivo de PBMC de pacientes com DM2 e indivíduos saudáveis

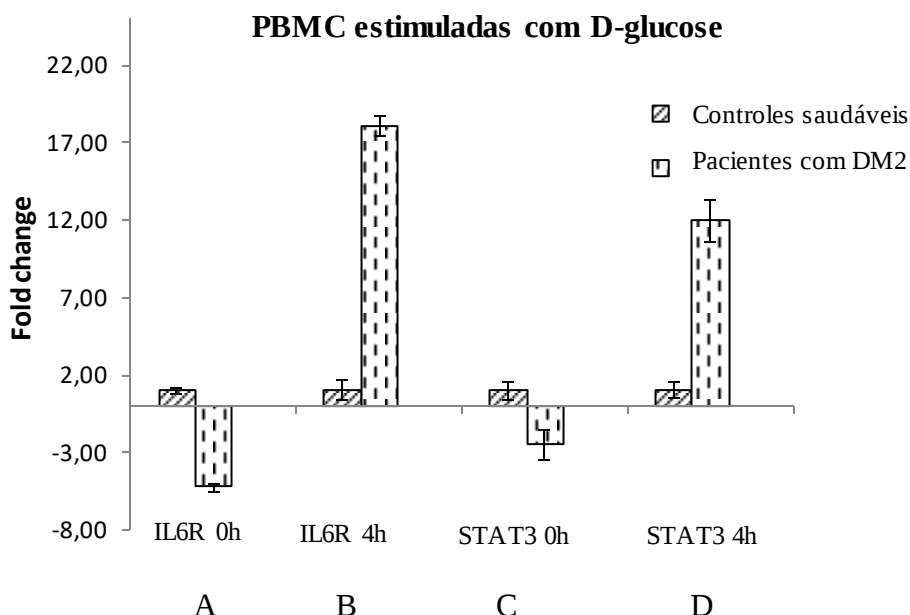


(A) Fold change em PBMC do grupo controle e do grupo de pacientes para IL6R no tempo 0 (zero). (B) Fold change em PBMC do grupo controle e do grupo de pacientes para IL6R para o tempo de 4 (quarto) horas. (C) FC em PBMC do grupo controle e do grupo de pacientes para STAT3 no 0 (zero). (D) Fold change em PBMC do grupo controle e do grupo de pacientes para STAT3 após o período de 4 (quarto) horas de incubação.

4.3.2 Expressão em PBMC's estimuladas com D-glucose

Os níveis de expressão do mRNA para *IL6R* e *STAT3* em PBMC foram avaliados em dois períodos após o estímulo com D-glucose. As PBMC's obtidas de indivíduos com DM2 estimuladas com D-glucose para o período de 0 hora apresentaram Fold Change (FC) de -5.26 e -2.5 para o mRNA de *IL6R* e *STAT3*, quando comparado a indivíduos saudáveis. Enquanto que os níveis de expressão de mRNA de *IL6R* e *STAT3* para o período de 4 horas de incubação após estímulo apresentou um FC de 18.05 e 11.95 para *IL6R* e *STAT3* (Gráfico 3).

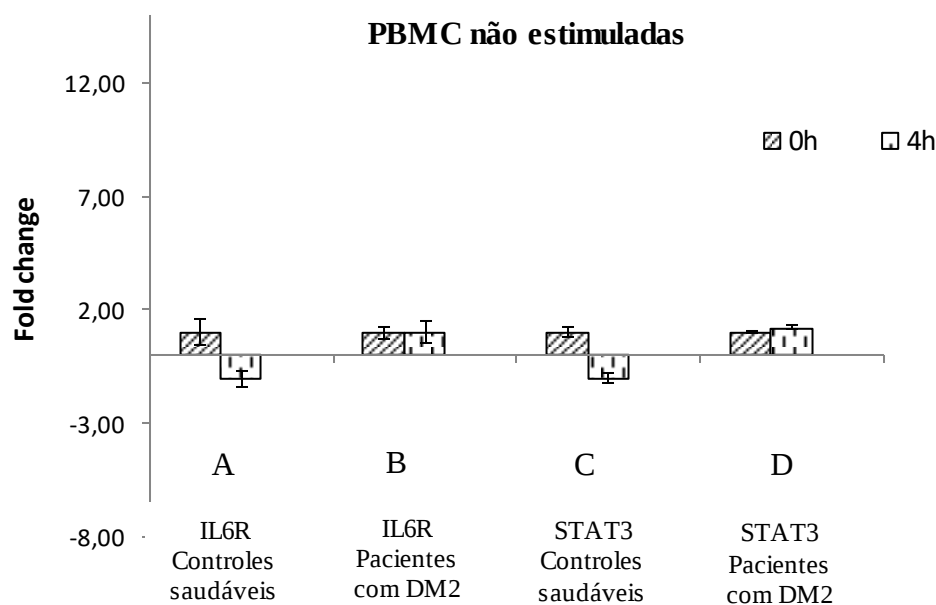
Gráfico 3: Expressão gênica representando os níveis de mRNA em Fold Change em indivíduos com DM2 e controles saudáveis em cultivo de PBMC's estimuladas com D-glucose.



(A) Fold change em PBMC do grupo controle e do grupo de pacientes para IL6R no tempo 0 (zero). (B) Fold change em PBMC do grupo controle e do grupo de pacientes para IL6R para o tempo de 4 (quatro) horas. (C) FC em PBMC do grupo controle e do grupo de pacientes para STAT3 no 0 (zero). (D) Fold change em PBMC do grupo controle e do grupo de pacientes para STAT3 após o período de 4 (quatro) horas de incubação. Foi utilização D-glucose na concentração de 200mg/dL.

Uma possível alteração nos níveis de expressão mRNA para os genes avaliados foi verificada neste trabalho através da comparação dos níveis de expressão entre amostras do mesmo grupo, sob a condição não estimulada, variando apenas o tempo de incubação. Foram observadas FC de -1.03 e -1.01 para *IL6R* e *STAT3* após 4 horas de incubação para os controles saudáveis e FC de 1.003 e 1.228 para *IL6R* e *STAT3* no grupo de amostras advindas de indivíduos com DM2 (Gráfico 4).

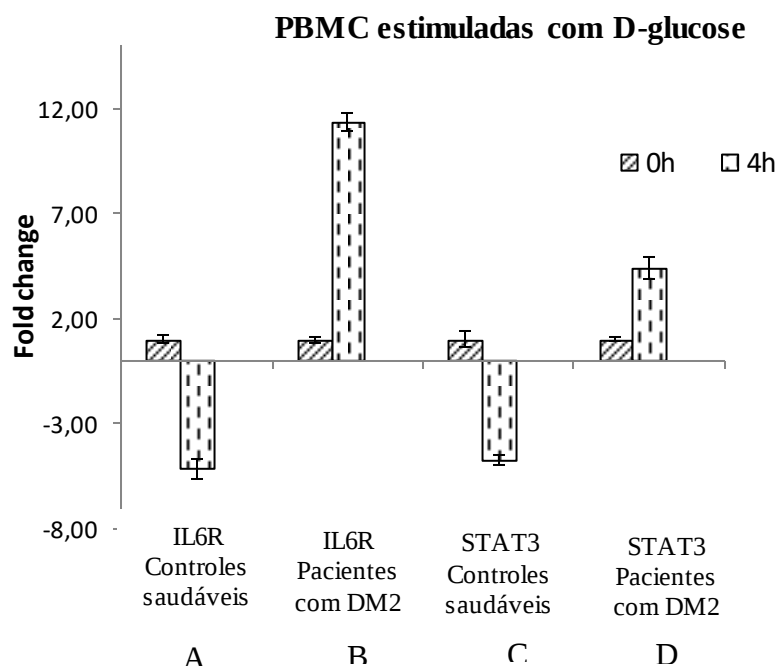
Gráfico 4: Comparação intragrupo dos níveis de expressão gênica representando os níveis de mRNA em Fold Change em indivíduos com DM2 e controles saudáveis em cultivo de PBMC's sem estímulos



(A): Fold change para *IL6R* em PBMC do grupo controle. (B): Fold change para *IL6R* em PBMC do grupo de pacientes com DM2. (C): Fold change para *STAT3* em PBMC do grupo controle. (D): Fold change para *STAT3* em PBMC do grupo de pacientes com DM2.

O presente trabalho também avaliou o efeito do estímulo com D-glucose intragrupo. FC de 11.39 e 4.38 para *IL6R* e *STAT3* para pacientes com DM2 e redução na FC em indivíduos saudáveis tanto para *IL6R* com FC de -5.139, quanto para *STAT3* com FC de -4.764 (Gráfico 5).

Gráfico 5: FC dos níveis de expressão gênica intragrupo em PBMC's de controles saudáveis e indivíduos com DM2



(A): Fold change dos níveis de expressão do mRNA do *IL6R* em PBMC do grupo controle estimuladas com D-glucose no tempo zero. (B) Fold change dos níveis de expressão do mRNA do *IL6R* em PBMC do grupo controle estimuladas com D-glucose após quatro horas de incubação (C): Fold change dos níveis de expressão do mRNA do *STAT3* em PBMC do grupo controle estimuladas com D-glucose no tempo zero. (D): Fold change dos níveis de expressão do mRNA do *STAT3* em PBMC do grupo controle estimuladas com D-glucose após quatro horas de incubação.

5 DISCUSSÃO

Sabe-se que o Diabetes Mellitus Tipo 2 (DM2) é uma patologia complexa que cursa com elevação dos níveis glicêmicos e consequente desordem metabólica crônica afetando vários mecanismos celulares, dentre eles, a transcrição de RNA de alguns genes. A identificação de genes que apresentem níveis de transcrição estáveis tanto em indivíduos com DM2 como em indivíduos não afetados pela doença, é primordial para realização de análises de expressão gênica fidedignas. Neste estudo ao avaliar nove genes comumente utilizados como genes de referência para normalização de ensaios de expressão gênica, foi observada estabilidade na expressão de apenas cinco destes, considerando todos os algoritmos utilizados.

A análise utilizando o GeNorm excluiu os genes *HPRT1*, *18S* e *ACTB*, enquanto que a análise pelo NormFinder incluiu o *HPRT1* entre os genes com valor de $M \leq 1,5$; mas excluiu o *HSP90*. Todos os algoritmos concordaram que os genes mais estáveis, e consequentemente, os recomendados para estudo de expressão gênica em PBMC's de indivíduos com DM2 são *GAPDH*, *RPLP0* e *B2M*, com *GUSB* e *G6PD*, reversando a quarta e quinta posição entre os mais estáveis, de acordo com GeNorm e NormFinder, respectivamente (Figura 18).

Apesar de cinco genes serem considerados estáveis, e com isso passíveis de utilização como genes de referência para o estudo de expressão gênica em PBMC's de indivíduos com DM2, o teste de Pairwise indicou a necessidade do uso da combinação mínima de apenas dois genes. Assim, este trabalho utilizou e recomenda o uso de *GAPDH* e *RPLP0* em associação como genes de referência para a normalização dos resultados obtidos nos ensaios de expressão gênica em PBMC's de pacientes com DM2.

As citocinas são conhecidas pela sua participação na inflamação de baixo grau envolvida na promoção da resistência insulínica e disfunção das células beta pancreáticas (EGUCHI; MANABE, 2013; LEE; LIU, 2008). Estas moléculas contribuem para o estabelecimento e progressão do DM2 agindo em diversos órgãos e provocando a liberação de proteínas de fase aguda (AL-SHUKAIL et al, 2013).

Neste trabalho foi investigada a participação dos níveis de expressão do mRNA dos genes *IL6R*, *STAT3* e *FOXP3*, responsáveis por codificar moléculas envolvidas na via do *Foxp3* que, por sua vez, é envolvida na diferenciação de linfócitos (PALLANDRE et al, 2007). Foram avaliados os níveis de mRNA destes genes *ex-vivo* em sangue total periférico e PBMC's de indivíduos com DM2 em comparação aos níveis de expressão em controles saudáveis. Esses ensaios de expressão mostraram uma Fold Change (FC) de 77.21 para

expressão de *IL6R* para amostras de sangue total de indivíduos com DM2. Este aumento pode significar uma maior ativação da via do Foxp3, provocando um perfil inflamatório sistêmico nos indivíduos com DM2, visto que a IL-6 é uma citocina pró-inflamatória relacionada à resistência insulínica e comorbidades associadas ao DM2 (FÈVE; BASTARD, 2009; HAMID et al, 2004; NAVARRO-GONZÁLEZ; MORA-FERNANDEZ, 2008). A IL-6 age após sua ligação ao IL6-R, codificado pelo gene *IL6R* e desencadeia uma cascata de reações (GOMES, 2017). Nossos dados corroboram com os achados de Shindu S. (2015), que relata aumento de 3.921 FC para expressão de *IL6R* em distúrbios metabólicos. Entretanto nosso estudo mostrou um aumento maior na expressão gênica para o *IL6R* que o relato anterior, tanto em sangue total quanto em PBMC's, estas estimuladas ou não com D-glucose.

Em PBMC's de indivíduos com DM2 não estimuladas com D-glucose foi possível observar uma FC de 2.55 para o período de 0 horas reduzindo para 1.26 após quatro horas de incubação. Este resultado indica que na ausência do estímulo, os níveis de expressão do *IL6R* estão próximos aos de indivíduos saudáveis, sugerindo uma possível associação entre o aumento dos níveis glicêmicos e um consequente aumento na expressão de IL-6R. Em PBMC's estimuladas com D-glucose, os níveis de expressão gênica após 4 horas de incubação com o estímulo apresentam aumento de 18.05 para células de indivíduos com DM2, sugerindo uma relação positiva entre os altos índices glicêmicos e os níveis de expressão do *IL6R*. Devido ao papel inflamatório da IL-6, a relação entre o aumento dos níveis glicêmicos e o aumento da expressão do *IL6R* pode sugerir um papel inflamatório associado a elevação constante da glicemia em indivíduos com DM2.

A IL-6 após ligação ao seu receptor, IL-6R, desencadeia uma cascata de sinalização com ativação de proteínas da família JAK e Stat3. Os níveis deste fator de transcrição estão negativamente associados aos níveis de Foxp3 e ao número de células Treg (PALLANDRE et al, 2007). No presente estudo, os resultados mostraram aumento dos níveis de mRNA para o *STAT3* em sangue total com FC de 26.40, e de 2.75 em PBMC's não estimuladas para o período de 0 horas; estes dados sugerem uma relação positiva entre os níveis de *STAT3* e a presença de DM2. No entanto, os níveis de expressão do mRNA de *STAT3* em PBMC's não estimuladas após 4 horas de incubação são reduzidos para 1.61, sugerindo uma relação entre os níveis de expressão e a presença de algum estímulo inflamatório existente nos indivíduos com DM2. Nas PBMC's de indivíduos com DM2 incubadas durante 4 horas com D-glucose, a expressão do mRNA para o gene *STAT3* apresentou FC de 11.95 em comparação aos níveis de expressão deste mesmo gene em controles saudáveis, estes dados sugerem uma relação entre os níveis de D-glucose e a expressão do *STAT3*. Sendo o *STAT3* o gene codificante do

Stat3 é este, um fator de transdução envolvido na diferenciação de perfis celulares pró-inflamatórios, é possível propor uma possível relação entre a elevação da glicemia e o aumento na expressão do *STAT3*. Estudos anteriores relatam associação entre o aumento da expressão de *STAT3* e condições inflamatórias, onde citocinas inflamatórias e estímulos nutricionais são responsáveis por este aumento que pode provocar proliferação celular e aumento do processo inflamatório (MASHILI et al., 2013; YANG et al., 2007).

Stat3 participa do controle da expressão do *FOXP3* e um desbalanço aumentando seus níveis pode provocar regulação negativa na expressão do *FOXP3* (DURANT, 2010). Foxp3 é responsável pela manutenção das células Treg, envolvidas na manutenção da homeostase do sistema imune, e redução nos níveis de mRNA do gene *FOXP3* pode promover a redução nos níveis da proteína FoxP3 e consequente desbalanço da resposta imune (EGWUAGU, 2009).

Neste estudo observou-se que os níveis de expressão do mRNA do *FOXP3* em sangue total periférico de indivíduos com DM2 estão mais elevados (FC de 6.38) quando comparados aos níveis de expressão em indivíduos controles. Este fato pode ser explicado, pelo anteriormente exposto por Kliviling e colaboradores (2008) que descrevem em seu estudo o aumento na expressão do *FOXP3* como uma resposta das células T na tentativa de compensar a redução na quantidade de células $CD4^{+}FOXP3^{+}$. No entanto, em PBMC's não foram observados níveis detectáveis para ambas as condições avaliadas em nosso estudo; este fato pode ser explicado pela expressão do *FOXP3* ser instável, transiente e dependente do microambiente, como descrito em estudos prévios (ZHOU et al., 2009).

O mecanismo que levaria a redução da expressão de *FOXP3* ocorre devido a presença de inflamação, onde células Treg que apresentavam foxp3 após sofrerem mudança nos níveis de expressão desta molécula se transformam em exFoxp3⁺, liberam citocinas pró-inflamatórias e assumem um perfil de células T de memória, transformando um perfil anteriormente de defesa, em perfil autoimune (ZHOU et al., 2009). Desta maneira, os níveis de expressão do *FOXP3* podem estar elevados em sangue total periférico devido a uma tentativa do sistema imune em de compensar o processo inflamatório presente nos indivíduos com DM2, e indetectável em PBMC's devido a instabilidade na expressão do *FOXP3* em resposta ao microambiente.

6. CONCLUSÕES

- Os resultados do presente estudo mostraram aumento estatisticamente significantes dos níveis de expressão do mRNA para os genes *IL6R*, *STAT3* e *FOXP3* em indivíduos diabéticos do tipo 2 do sexo feminino comparados a controles saudáveis de mesmo sexo. Estes resultados sugerem associação entre os níveis de expressão dos genes *IL6R*, *STAT3* e *FOXP3* e o desenvolvimento do DM2.
- A expressão aumentada dos níveis de mRNA para os genes *IL6R*, *STAT3* e *FOXP3* foi observada em cultivos de PBMC de pacientes com DM2 estimulados com glicose após 4 horas de incubação quando comparadas a PBMC de indivíduos saudáveis. Este achado mostra uma possível relação entre o aumento da expressão desses genes em resposta a glicose nos indivíduos DM2, sugerindo uma maior responsividade das PBMC à glicose em indivíduos metabólica e imunologicamente estressados.
- Os resultados do presente trabalho mostraram a influência do fator imunometabólico do DM2 além de características de perfil autoimune na doença.
- O estudo também evidencia a necessidade de utilização de genes de referências adequados aos ensaio realizado em PBMC's e sangue total periférico de indivíduos com DM2.

REFERÊNCIAS

- ABDEL GALIL, S.M.; EZZELDIN, N., EL-BOSHY, M.E. The role of serum IL-17 and IL-6 as biomarkers of disease activity and predictors of remission in patients with lupus nephritis. **Cytokine**, v. 76, p. 280–287, 2015.
- ABOUZEID, S.; SHERIF, N. Role of alteration in Treg/Th17 cells' balance in nephropathic patients with Type 2 diabetes mellitus. **Electronic physician**, v. 7, n. 8, p. 1613–1618, 2015.
- AL-SHUKAILI, A.; AL-GHAFRI, S.; AL-MARHOABI, S. et al Analysis of inflammatory mediators in type 2 diabetes patients. **Int J Endocrinol**, v. 2013, p. 1-7, 2013.
- ANTUNES, B. M. et al. Sleep quality and duration are associated with performance in maximal incremental test. **Physiology & Behavior**, v. 177, p. 252-256, 2017.
- ARKAN, M. C. et al. IKK- β links inflammation to obesity-induced insulin resistance. **Nature Medicine**, v. 11, n. 2, p. 191–198, 2005.
- ARSA, G. et al. Diabetes mellitus tipo 2: Aspectos fisiológicos, genéticos e formas de exercício físico para seu controle. **Revista Brasileira de Cineantropometria e Desempenho Humano**, v. 11, n.1 , p.103–111, 2009.
- BARNES, A. S. Obesity and sedentary lifestyles: risk for cardiovascular disease in women. **Texas Heart Institute journal**, v. 39, n. 2, p. 224–7, 2012.
- BRUUN, J. M. et al. Association between measures of insulin sensitivity and circulating levels of interleukin-8, interleukin-6 and tumor necrosis factor- α . Effect of weight loss in obese men. **European journal of endocrinology**, v. 148, n. 5, p. 535–542, 2003.
- CADE, W. T. Diabetes-Related Microvascular and Macrovascular Diseases in the Physical Therapy Setting. **Physical Therapy**, v. 88, n. 11, p. 1322–1335, 2008.
- CASTOLDI, A. et al. The macrophage switch in obesity development. **Frontiers in Immunology**, v. 6, n. 1, p. 1–11, 2016.
- CHAWLA, A.; CHAWLA, R.; JAGGI, S. Microvascular and macrovascular complications in diabetes mellitus: Distinct or continuum? **Indian Journal of Endocrinology and Metabolism**, v. 20, n. 4, p. 546, 2016.

CHOBY, B. Diabetes Update: Risk Factors, Screening, Diagnosis, and Prevention of Type 2 Diabetes. **FP essentials**, v. 456, p. 20–26, 2017.

CORTHAY, A. How do regulatory t cells work? **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 70, n. 4, p. 326–336, 2009.

DALMAS, E. et al. T cell+derived IL-22 amplifies IL-1 β ⁺ driven inflammation in human adipose tissue: Relevance to obesity and type 2 diabetes. **Diabetes**, v. 63, n. 6, p. 1966–1977, 2014.

DONATH, M. Y. Inflammation as a sensor of metabolic stress in obesity and type 2 diabetes. **Endocrinology**, v. 152, n. 11, p. 4005–4006, 2011.

Durant L, Watford WT, Ramos HL, et al. Diverse targets of the transcription factor STAT3 contribute to T cell pathogenicity and homeostasis. **Immunity**, v. 32, n. 5, p. 605–615, 2010 .

EGUCHI, K.; MANABE, I. Macrophages and islet inflammation in type 2 diabetes. **Diabetes, Obes. Metab.**, v. 15, n. 3, p. 152–158, 2013.

EGWUAGU, C.E. STAT3 in CD4⁺ T helper cell differentiation and inflammatory diseases. **Cytokine**, v. 43, n.3, p. 149–156, 2009.

FEUERER, M. et al. Lean, but not obese, fat is enriched for a unique population of regulatory T cells that affect metabolic parameters. **Nature Medicine**, v. 15, n. 8, p. 930–939, 2009.

FÈVE, B.; BASTARD, J. The role of interleukins in insulin resistance and type 2 diabetes mellitus. **Nat Rev Endocrinol**, v. 5, n. 6, p. 305–311, 2009.

FISCHER, C. P. Interleukin-6 in acute exercise and training: What is the biological relevance? **Exercise Immunology Review**, v. 12, n.6, p. 6-33, 2006.

FORD, E. S.; CASPERSEN, C. J. Sedentary behaviour and cardiovascular disease: A review of prospective studies. **International Journal of Epidemiology**, v. 41, n. 5, p. 1338–1353, 2012.

FOROUHI, N. G.; WAREHAM, N. J. Epidemiology of diabetes. **Medicine**, v. 42, n. 12, p. 698–702, 2014.

GARIDOU, L. et al. The Gut Microbiota Regulates Intestinal CD4 T Cells Expressing ROR γ t and Controls Metabolic Disease. **Cell Metabolism**, v. 22, n. 1, p. 100–112, 2015.

GOMES, K.B. IL-6 and type 1 diabetes mellitus: T cell responses and increase in IL-6 receptor surface expression. **Ann Transl Med**, v.5 ,n.1, p. 16–16, 2017

GOUVERI, E. et al. Breastfeeding and diabetes. **Current diabetes reviews**, v. 7, n. 2, p. 135–142, 2011.

GROSS, J. L. et al. Diabetes Melito: Diagnóstico, Classificação e Avaliação do Controle Glicêmico. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 46, n. 1, p. 16–26, 2002.

GUIDONI, C. M. et al. Assistência ao diabetes no sistema único de saúde: análise do modelo atual: [revisão] TT - Diabetes care in SUS: an analysis of the current model: [review]. **Braz. j. pharm. sci**, v. 45, n. 1, p. 37–48, 2009.

GUNDERSON, E. P. et al. History of gestational diabetes mellitus and future risk of atherosclerosis in mid-life: the Coronary Artery Risk Development in Young Adults study. **Journal of the American Heart Association**, v. 3, n. 2, p. 1-9, 2014.

GUTIERREZ, D. A.; PUGLISI, M. J.; HASTY, A. H. Impact of increased adipose tissue mass on inflammation, insulin resistance, and dyslipidemia. **Current Diabetes Reports**, v. 9, n. 1, p. 26-32, 2009.

GUZMAN-FLORES, J. M.; PORTALES-PEREZ, D. P. [Mechanisms of suppression of regulatory T-cells (Treg)]. **Gaceta medica de Mexico**, v. 149, n. 6, p. 630–638, 2013.

HAMEED, I. et al. Type 2 diabetes mellitus: From a metabolic disorder to an inflammatory condition. **World journal of diabetes**, v. 6, n. 4, p. 598–612, 2015.

HAMID, Y. H. et al. Variation in the interleukin-6 receptor gene associates with type 2 diabetes in Danish whites. **Diabetes**, v. 53, n. 12, p. 3342–3345, 2004.

HARDER-LAURIDSEN, N. M. et al. Effect of IL-6 on the insulin sensitivity in patients with type 2 diabetes. **American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism**, v. 306, n. 7, p. 769–778, 2014.

HEMMINKI, K.; LIU, X.; FORSTI, A.; SUNDQUIST, J.; SUNDQUIST, K.; JI, J. Subsequent Type 2 Diabetes in Patients with Autoimmune Disease. **Sci. Rep.**, v. 5, n. 13871, p. 1-8, 2015.

HIRANO, T. et al. Biological and clinical aspects of interleukin 6. **Immunology today**, v. 11, n. 12, p. 443–449, 1990.

HODGE, D.R.; HURT, E.M.; FARRAR, W.L. The role of IL-6 and STAT3 in inflammation and cancer. **Eur. J. Cancer**, v. 41, n. 16, p. 2502–2512, 2005.

HORI, S.; NOMURA, T.; SAKAGUCHI, S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. **Science (New York, N.Y.)**, v. 299, n. 5609, p. 1057–61, 2003.

HU, F. B. Sedentary lifestyle and risk of obesity and type 2 diabetes. **Lipids**, v.38, n. 2, p. 103-108, 2003.

HUH, J. Y. et al. Crosstalk between adipocytes and immune cells in adipose tissue inflammation and metabolic dysregulation in obesity. **Mol Cells**, v. 37, n. 5, p. 365–371, 2014.

IBGE. Pesquisa Nacional de Saúde. Rio de Janeiro, 2013.

IBGE. Pesquisa Nacional de Saúde. Rio de Janeiro, 2014.

INOUE, H. et al. Role of hepatic STAT3 in brain-insulin action on hepatic glucose production. **Cell Metabolism**, v. 3, n. 4, p. 267–275, 2006.

INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION. **IDF Diabetes Atlas**. 7. Ed., 2015.

JAGANNATHAN-BOGDAN, M. et al. Elevated Proinflammatory Cytokine Production by a Skewed T Cell Compartment Requires Monocytes and Promotes Inflammation in Type 2 Diabetes. **The Journal of Immunology**, v. 186, n. 2, p. 1162–1172, 2011.

JAISWAL, M. et al. Prevalence of and Risk Factors for Diabetic Peripheral Neuropathy in Youth With Type 1 and Type 2 Diabetes: SEARCH for Diabetes in Youth Study. **Diabetes Care**, v. 40, n.9, p. 1226-1232, 2017.

JUNG, U. J.; CHOI, M..S. Obesity and its metabolic complications: the role of adipokines and the relationship between obesity, inflammation, insulin resistance, dyslipidemia and nonalcoholic fatty liver disease. **International journal of molecular sciences**, v. 15, n. 4, p. 6184–223, 2014.

KADO, S.; NAGASE, T.; NAGATA, N. Circulating levels of interleukin-6, its soluble receptor and interleukin-6/interleukin-6 receptor complexes in patients with type 2 diabetes mellitus. **Acta Diabetol**, v. 36, n. 1-2, p. 67–72, 1999.

KAHN, B.; FLIER, J. Obesity and insulin resistance. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 106, n. 4, p. 473–481, 2000.

KAR, P.; CHAWLA, H.; SAHA, S.; TANDON, N.; GOSWAMI, R. Identification of reference housekeeping-genes for mRNA expression studies in patients with type 1 diabetes. **Mol. Cell. Biochem**, v. 417, n. 1-2, p. 49–56, 2016.

KIM, C.H. FOXP3 and its role in the immune system. **Adv. Exp. Med. Biol.**, v. 1, n.665, p. 17–29, 2009.

KIMURA, A.; KISHIMOTO, T. IL-6: Regulator of Treg/Th17 balance. **European Journal of Immunology**, v. 40, n.7, p. 1830-1835, 2010.

KIVLING, A.; NILSSON, L.; FÄLTH-MAGNUSSON, K. et al. Diverse FOXP3 expression in children with type 1 diabetes and celiac disease. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1150, n.1, p. 273–277, 2008.

KOENEN, H. J. P. M. et al. Human CD25^{high}Foxp3^{pos} regulatory T cells differentiate into IL-17-producing cells. **Blood**, v. 112, n. 6, p. 2340–52, 2008.

KOMATSU, N. et al. Pathogenic conversion of Foxp3⁺ T cells into TH17 cells in autoimmune arthritis. **Nature medicine**, v. 20, n. 1, p. 62–8, 2014.

KORNETE, M.; MASON, E. S.; PICCIRILLO, C. A. Immune regulation in T1D and T2D: prospective role of Foxp3 + Treg cells in disease pathogenesis and treatment. **Frontiers in endocrinology**, v. 4, n. 6, p. 1–8, 2013.

LA CAVA, A. Tregs are regulated by cytokines: Implications for Autoimmunity. **Autoimmunity Reviews**, v. 8, n. 1, p. 83-87, 2008.

LAAKSO, M. Cardiovascular disease in type 2 diabetes from population to man to mechanisms: The Kelly West award lecture 2008. **Diabetes Care**, v. 33, n. 2, p. 442–449, 2010.

- LEE, C.C.; LIU, S. Role of Inflammatory Cytokines in Type 2 Diabetes. **Rev Endocrinol I**, v. 79, n. 8, p. 19–21, 2008.
- LUMENG, C. N. et al. Increased inflammatory properties of adipose tissue macrophages recruited during diet-induced obesity. **Diabetes**, v. 56, n. 1, p. 16–23, 2007.
- LYRA, R. et al. Prevalência de diabetes melito e fatores associados em população urbana adulta de baixa escolaridade e renda do sertão nordestino brasileiro. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 54, n. 6, p. 560–566, 2010.
- MARASCHIN, J. DE F. et al. Classificação do diabete melito. **Arq Bras Cardiol**, v. 95, n. 2, p. 40–46, 2010.
- MASHILI, F.; CHIBALIN, A.V.; KROOK, A. ZIERATH, J.R. Constitutive STAT3 phosphorylation contributes to skeletal muscle insulin resistance in type 2 diabetes. **Diabetes**, v. 62, n. 2, p. 457–465, 2013.
- MASTERS, S. L. et al. Activation of the NLRP3 inflammasome by islet amyloid polypeptide provides a mechanism for enhanced IL-1beta in type 2 diabetes. **Nat Immunol**, v. 11, n. 10, p. 897–904, 2010.
- MATHIS, D. Immunological goings-on in visceral adipose tissue. **Cell Metabolism**, v. 17, n. 6, p. 851-859, 2013.
- MCCULLOCH, D. K.; ROBERTSON, R. P. **Pathogenesis of type 2 diabetes mellitus**, 2017.
- MOCELLIN, S. et al. The multifaceted relationship between IL-10 and adaptive immunity: Putting together the pieces of a puzzle. **Cytokine and Growth Factor Reviews**, v. 15, n.1, p. 61-76, 2004.
- MOON, J.Y. et al. Aberrant Recruitment and Activation of T Cells in Diabetic Nephropathy. **American Journal of Nephrology**, v. 35, n. 2, p. 164–174, 2012.
- NAVARRO-GONZÁLEZ, J.F.; MORA-FERNÁNDEZ, C. The role of inflammatory cytokines in diabetic nephropathy. **J Am Soc Nephrol**, v. 19, n.3, p. 433–42, 2008.
- NIE, J. et al. FOXP3+ Treg cells and gender bias in autoimmune diseases. **Frontiers in Immunology**, v. 6, n. 493, p. 1-13, 2015.

NIEMAND, C.; NIMMESGERN, A.; HAAN, S. et al. Activation of STAT3 by IL-6 and IL-10 in Primary Human Macrophages Is Differentially Modulated by Suppressor of Cytokine Signaling 3. **J Immunol**, v. 170, n. 6, p. 3263–3272, 2003.

NOLAN, C. J.; DAMM, P.; PRENTKI, M. Type 2 diabetes across generations: From pathophysiology to prevention and management. **The Lancet**, v., n. 169-181, 2011.

O'CONNELL, G.C.; TREADWAY, M.B.; PETRONE, A.B.; TENNANT, C.S.; LUCKE-WOLD, N.; CHANTLER, P.D.; BARR, T.L. Leukocyte Dynamics Influence Reference Gene Stability in Whole Blood: Data-Driven qRT-PCR Normalization Is a Robust Alternative for Measurement of Transcriptional Biomarkers. **Lab. Med.**, v. 48, n. 4, p. 346–356, 2017.

OHKURA, N.; KITAGAWA, Y.; SAKAGUCHI, S. Development and Maintenance of Regulatory T cells. **Immunity**, v. 38, n. 3, p. 414-423, 2013.

OLOKOBA, A.B.; OBATERU, O.A.; OLOKOBA, L.B. Type 2 diabetes mellitus: A review of current trends. **Oman Med.**, v. 27, n. 4, p. 269–273, 2012.

OUCHI, N. et al. Adipokines in inflammation and metabolic disease. **Nat Rev Immunol**, v. 11, n. 2, p. 85–97, 2011.

PALLANDRE, J.R. et al. Role of STAT3 in CD4+CD25+FOXP3+ Regulatory Lymphocyte Generation: Implications in Graft-versus-Host Disease and Antitumor Immunity. **The Journal of Immunology**, v. 179, n. 11, p. 7593–7604, 2007.

PEREIRA, P. F.; ALFENAS, R. D. C. G.; ARAÚJO, R. M. A. Does breastfeeding influence the risk of developing diabetes mellitus in children? A review of current evidence. **Jornal de Pediatria**, v. 90, n. 1, p. 7-15, 2014.

QI, L.; RIFAI, N.; HU, F. B. Interleukin-6 receptor gene variations, plasma interleukin-6 levels, and type 2 diabetes in U.S. women. **Diabetes**, v. 56, n. 12, p. 3075–3081, 2007.

RAFIQ, S. et al. A common variant of the interleukin 6 receptor (IL-6r) gene increases IL-6r and IL-6 levels, without other inflammatory effects. **Genes and Immunity**, v. 8, n. 7, p. 552–559, 2007.

RUEDA, C. M. et al. High Density Lipoproteins Selectively Promote the Survival of Human Regulatory T-cells. **Journal of lipid research**, v.58, n.8, p.1514-1523, 2017.

SABIO, G.; DAVIS, R. J. C. Jun NH2-terminal kinase 1 (JNK1): Roles in metabolic regulation of insulin resistance. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 35, n. 9, p. 490-496, 2010.

SBD, S. B. DE D. Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes 2015. **Diabetes**, v. 1, 2015.

SBD, S. B. DE D. Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes 2015. **Diabetes**, v. 1, 2017.

SCHELLER, J. et al. The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research**, v. 1813, n. 5, p. 878-888, 2011.

SENTHILKUMAR, G. P. et al. Role of omentin 1 and IL-6 in type 2 diabetes mellitus patients with diabetic nephropathy. **Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews**, v. 12, n. 1, p. 23-26, 2017.

SHI, H.; CHE, Y.; BAI, L.I.N. et al. High mobility group box 1 in diabetic nephropathy. **Experimental and therapeutic medicine**, v.14, n.3, p.2431–2433, 2017.

SINDHU, S.; THOMAS, R.; SHIHAB, P. et al. Obesity is a positive modulator of IL-6R and IL-6 expression in the subcutaneous adipose tissue: Significance for metabolic inflammation. **PLoS One**, v. 10, n. 7, p.1–17, 2015.

TINIAKOU, I. et al. High-Density Lipoprotein Attenuates Th1 and Th17 Autoimmune Responses by Modulating Dendritic Cell Maturation and Function. **The Journal of Immunology**, v. 194, n. 10, p. 4676–4687, 2015.

VISSER, M. et al. Elevated C-reactive protein levels in overweight and obese adults 1. **JAMA**, v. 282, n. 98–7484, p. 2131–2135, 1999.

WANG, Y.; VAN B.A.; CHEON, H. et al. STAT3 activation in response to IL-6 is prolonged by the binding of IL-6 receptor to EGF receptor. **Proc Natl Acad**, v. 110, n. 42, p. 16975-16980, 2013

WARREN, T. Y. et al. Sedentary behaviors increase risk of cardiovascular disease mortality in men. **MedSci Sports Exerc**, v. 42, n. 5, p. 879–885, 2010.

WELTER, M. et al. The rs10885122 polymorphism of the adrenoceptor alpha 2A (ADRA2A) gene in Euro-Brazilians with type 2 diabetes mellitus. **Archives of endocrinology and metabolism**, v. 59, n. 1, p. 29–33, 2015.

WHITE, A.T.; LABARGE, S.A.; MCCURDY, C.E.; SCHENK, S. Knockout of STAT3 in skeletal muscle does not prevent high-fat diet-induced insulin resistance. **Mol Metab**, v. 4, n. 8, p.569–575, 2015.

XIA, C.; RAO, X.; ZHONG, J. Role of T Lymphocytes in Type 2 Diabetes and Diabetes-Associated Inflammation. **Journal of Diabetes Research**, v. 2017, n. 2017, p. 1-6, 2017.

YANG, X.O.; PANOPOULOS, A.D.; NURIEVA, R. et al. STAT3 regulates cytokine-mediated generation of inflammatory helper T cells. **J Biol Chem**, v. 282, n.13 , p. 9358–9363, 2007.

ZENG, C. et al. The imbalance of Th17/Th1/Tregs in patients with type 2 diabetes: Relationship with metabolic factors and complications. **Journal of Molecular Medicine**, v. 90, n. 2, p. 175–186, 2012.

ZHANG, L. et al. Stat3 activation links a C/EBPdelta to myostatin pathway to stimulate loss of muscle mass. **Cell metabolism**, v. 18, n. 3, p. 368–379, 2013.

ZHOU, R. et al. Thioredoxin-interacting protein links oxidative stress to inflammasome activation. **Nature Immunology**, v. 11, n. 2, p. 136–140, 2010.

ZHOU, X. et al. Instability of the transcription factor Foxp3 leads to the generation of pathogenic memory T cells in vivo. **Nature Immunology**, v. 10, n. 9, p. 1000–1007, 2009.