

UNIVERSIDADE DE LISBOA

Faculdade de Medicina



**Contribuição para o estudo de biomarcadores inflamatórios
associados ao risco cardiovascular na Diabetes *Mellitus* tipo 2**

Carolina Isabel Agostinho da Fonseca

Orientadora: Professora Doutora Ana Margarida Saraiva Valente

Co-Orientador: Professor Doutor Manuel Diamantino Bicho

Dissertação especialmente elaborada para obtenção do grau de mestre em
Doenças Metabólicas e Comportamento Alimentar

2022

UNIVERSIDADE DE LISBOA

Faculdade de Medicina



**Contribuição para o estudo de biomarcadores inflamatórios
associados ao risco cardiovascular na Diabetes *Mellitus* tipo 2**

Carolina Isabel Agostinho da Fonseca

Orientadora: Professora Doutora Ana Margarida Saraiva Valente

Co-Orientador: Professor Doutor Manuel Diamantino Bicho

Dissertação especialmente elaborada para obtenção do grau de mestre em
Doenças Metabólicas e Comportamento Alimentar

2022

A impressão desta dissertação foi aprovada pelo Conselho Científico da Faculdade de Medicina de Lisboa em reunião de 28 de julho de 2022.

FINANCIAMENTO

Neste trabalho foram utilizados os dados da amostra do estudo “Hábitos alimentares, hiperhomocisteinémia e doença cardiovascular na diabetes tipo 2”, financiado pela Fundação para a Ciência e Tecnologia (Projeto PIC/IC/82957/2007) e por Bolsa de Doutoramento (SFRH/BD/16166/2004/5E4M).

As análises dos polimorfismos efetuados obtiveram o apoio financeiro do Instituto de Investigação Científica Bento da Rocha Cabral e do Instituto de Saúde Ambiental (ISAMB), da Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa através do Grupo Ecogenética e Saúde Humana com a referência UIDB/04295/2020.

Congresso Internacional

No âmbito da presente tese, foi aceite o abstract para comunicação oral para ser apresentado no 58th Annual Meeting of the European Association for the study of Diabetes.

M. Bicho, C. Fonseca, A.C. Santos, J.F. Raposo, A. Valente. "Impact of RAGE and IL-6 polymorphisms in the progression for angiopathy in patients with type 2 diabetes", 58th Annual Meeting of the European Association for the study of Diabetes, Suécia, 19-23 de setembro de 2022.

Agradecimentos

A realização da presente dissertação só foi possível graças ao apoio e contributo de várias pessoas.

À Professora Doutora Ana Margarida Valente, gostaria de prestar um especial agradecimento, por ter aceite ser minha orientadora, por todos os ensinamentos ao longo da minha vida académica, por toda a paciência, apoio e disponibilidade sempre demonstrada.

Ao Professor Doutor Manuel Bicho (Laboratório de Genética da Faculdade Medicina da Universidade de Lisboa e Instituto de Investigação Científica Bento da Rocha Cabral), por ter aceite que realizasse este trabalho no Instituto de Saúde Ambiental da Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa. E por toda a disponibilidade e apoio demonstrado ao longo deste projeto.

À Dra. Ana Carolina Santos, por todos os ensinamentos e disponibilidade demonstrada, em particular, no trabalho desenvolvido em laboratório, e por toda a simpatia e atenção que sempre teve para comigo.

Um agradecimento muito especial à minha família, pelo apoio incondicional e incentivo, sempre demonstrado ao longo destes anos.

Um agradecimento também muito especial ao meu namorado, por sempre acreditar em mim, apoiando-me incondicionalmente em todos os momentos.

E a todos os intervenientes, que de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

Expresso a todos, a minha gratidão.

Resumo

Introdução: A diabetes mellitus tipo 2 é uma doença metabólica crónica caracterizada por níveis elevados de glucose no sangue, originando, com o tempo, lesões no coração, olhos, rins e nervos. Esta doença heterogénea resulta da interação entre fatores ambientais e fatores genéticos. A predisposição genética tem um papel relevante no risco de desenvolver DMT2. Tem sido relatado que a DMT2 é uma manifestação clínica de uma contínua inflamação crónica de baixo grau, e que esta é vista como um fator crucial para o desenvolvimento e progressão da DMT2. A patogénese desta doença parece ser mediada por citocinas, quimiocinas e interleucinas que provocam uma resposta inflamatória e imune.

Objetivos: **1.** Avaliar o contributo da variação genética e de biomarcadores do processo inflamatório na progressão para a doença cardiovascular em pessoas com DMT2; **2.** Avaliar as frequências na distribuição de quatro variantes polimórficas genéticas das citocinas envolvidas no processo inflamatório; **3.** Avaliar os níveis sanguíneos dos biomarcadores bioquímicos e celulares associados ao processo inflamatório e *stress* oxidante na DMT2; **4.** Estudar a associação das variantes polimórficas genéticas com os níveis circulantes de biomarcadores do processo inflamatório e a progressão para a doença cardiovascular em pessoas com DMT2.

Métodos: A amostra foi constituída por 148 adultos portugueses com diabetes tipo 2, de ambos os géneros e com idades compreendidas entre os 45 e 75 anos. Os participantes foram categorizados de acordo com dois grupos: grupo I (n=75) – diabéticos do tipo 2 com angiopatia; e grupo II (n=73) – diabéticos do tipo 2 sem angiopatia. Os parâmetros biológicos (bioquímicos e celulares) inflamatórios foram obtidos apenas para 130 participantes. As variantes polimórficas genéticas da IL-6 -174 G/C, do TNF- α -238 G/A e do RAGE -374 T/A pró-inflamatórias foram determinadas por Endpoint genotyping. A variante polimórfica genética da HMOX-1 -413 T/A anti-inflamatória foi determinada por PCR-RFLP. A análise estatística dos dados foi realizada utilizando os softwares informáticos para Windows, SPSS®, versão 26 (SPSS INc, Chicago). Os testes foram considerados estatisticamente significativos quando $p < 0,05$.

Resultados: Foram identificados dois biomarcadores circulantes bioquímicos relacionados com o *stress* oxidativo associado ao processo inflamatório e progressão para a doença angiopática são eles, o malondialdeído (MDA) e homocisteína (Hcy). Apenas se observou uma correlação entre o MDA e os parâmetros dos eritrócitos nos indivíduos com doença cardiovascular. Observamos, por outro lado, uma correlação indireta entre a Hcy e os parâmetros dos eritrócitos em ambos os grupos. Não foram encontradas associações entre os polimorfismos estudados e a progressão para a doença cardiovascular. Neste trabalho foi encontrada uma associação entre o polimorfismo da IL-6 com níveis mais elevados, no entanto, ainda dentro dos valores de referência, de parâmetros hematológicos e marcadores de processo inflamatório. E uma associação do polimorfismo de RAGE com homocisteína. No caso do polimorfismo anti-inflamatório (HMOX-1), houve uma associação com o parâmetro monócitos, apesar de se encontrar dentro dos valores de referência, e com níveis elevados de um parâmetro relacionado com a extensão da inflamação e *stress* oxidativo (rácio monócitos/C-HDL).

Conclusão: Estes resultados poderão constituir um contributo para a definição de um perfil de risco cardiovascular em doentes com DMT2 baseado nos biomarcadores genéticos, bioquímicos e celulares. Foi possível identificar biomarcadores inflamatórios que estão associados ao desenvolvimento de complicações da DMT2, como é o caso da doença cardiovascular, bem como, a sua modulação por variantes polimórficas genéticas que poderão ajudar a prever os riscos individuais do aparecimento e posteriormente, fazer o seu diagnóstico e determinar qual o tratamento mais adequado a cada indivíduo.

Palavras-chave: Diabetes *mellitus* tipo 2; IL-6; TNF- α ; RAGE; HMOX-1.

Abstract

Introduction: Type 2 diabetes mellitus is a chronic metabolic disease characterized by high blood glucose levels, leading to damage to the heart, eyes, kidneys, and nerves over time. This heterogeneous disease results from the interaction between environmental factors and genetic factors. Genetic predisposition plays an important role in the risk of developing T2DM. It has been reported that T2DM is a clinical manifestation of ongoing chronic low-grade inflammation, and that this is seen as a crucial factor in the development and progression of T2DM. The pathogenesis of this disease appears to be mediated by cytokines, chemokines and interleukins that provoke an inflammatory and immune response.

Aims: **1.** To assess the contribution of genetic variation and biomarkers of the inflammatory process in the progression to cardiovascular disease in people with T2DM; **2.** To evaluate the frequencies in the distribution of four genetic polymorphic variants of the cytokines involved in the inflammatory process; **3.** To assess blood levels of biochemical and cellular biomarkers associated with the inflammatory process and oxidative stress in T2DM; **4.** Study the association of genetic polymorphic variants with circulating levels of biomarkers of the inflammatory process and progression to cardiovascular disease in people with T2DM.

Methods: The sample consisted of 148 Portuguese adults with type 2 diabetes of both genders and aged between 45 and 75 years. Participants were categorized according to two groups: group I (n=75) – type 2 diabetics with angiopathy; and group II (n=73) – type 2 diabetics without angiopathy. Inflammatory biological (biochemical and cellular) parameters were obtained only for 130 participants. The pro-inflammatory genetic polymorphic variants IL-6 -174 G/C, TNF- α -238 G/A and RAGE -374 T/A were determined by Endpoint genotyping. The polymorphic genetic variant of the anti-inflammatory HMOX-1 -413 T/A was determined by PCR-RFLP. Statistical analysis of the data was performed using computer software for Windows, SPSS®, version 26 (SPSS INC, Chicago). The tests were considered statistically significant when $p < 0.05$.

Results: Two circulating biochemical biomarkers related to oxidative stress associated with the inflammatory process and progression to angiopathic disease have been identified: malondialdehyde (MDA) and homocysteine (Hcy). A correlation between MDA and erythrocyte parameters was only observed in subjects with cardiovascular disease. On the other hand, we observed an indirect correlation between Hcy and erythrocyte parameters in both groups. No associations were found between the polymorphisms studied and progression to cardiovascular disease. In this work, an association was found between the IL-6 polymorphism with higher levels, however, still within the reference values, of hematological parameters and markers of the inflammatory process. And an association of RAGE polymorphism with homocysteine. In the case of anti-inflammatory polymorphism (HMOX-1), there was an association with the monocyte parameter, despite being within the reference values, and with high levels of a parameter related to the extent of inflammation and oxidative stress (monocyte/HDL-C ratio).

Conclusion: These results may contribute to the definition of a cardiovascular risk profile in patients with T2DM based on genetic, biochemical, and cellular biomarkers. It was possible to identify inflammatory biomarkers that are associated with the development of complications of T2DM, such as cardiovascular disease, as well as its modulation by genetic polymorphic variants that may help to predict the individual risks of the onset and subsequently make its diagnosis. and determine which treatment is most appropriate for each subject.

Keywords: Type 2 diabetes mellitus; IL-6; TNF- α ; RAGE; HMOX-1.

Índice

Agradecimentos.....	i
Resumo.....	ii
Abstract.....	iv
Índice de Figuras	ix
Índice de Tabelas.....	x
Lista de Abreviaturas.....	xiii
1. INTRODUÇÃO	15
1.1. Etiologia e Fisiopatologia da Diabetes <i>mellitus</i> tipo 2	15
1.2. Epidemiologia e prevalência da diabetes.....	18
1.3. Patogénese e complicações da diabetes mellitus	24
1.4. Processo inflamatório e a Diabetes Mellitus.....	32
1.5. Processo inflamatório e obesidade	34
1.6. Doença Cardiovascular e a Diabetes <i>Mellitus</i> tipo 2.....	35
1.7. Anemia e a progressão de Diabetes <i>Mellitus</i> para doença cardiovascular	38
1.8. Nutrigenética e a DMT2	40
1.9. Variantes genéticas polimórficas	40
1.9.1. Gene da Interleucina-6 (IL-6).....	41
1.9.2. Gene do Fator de necrose tumoral alfa (TNF- α).....	44
1.9.3. Gene do Recetor para produtos finais de glicação avançada (RAGE)	46
1.9.4. Gene da Heme oxigenase-1 (HMOX-1).....	48
1.9.5. Quadro resumo dos polimorfismos estudados	50
2. OBJETIVOS.....	51
2.1. Objetivo Geral	51
2.2. Objetivos Específicos.....	51
3. MATERIAIS E MÉTODOS	52
3.1. Caracterização da Amostra Populacional	52
3.2. Critérios de inclusão	52
3.3. Critérios de exclusão	52
3.3. Considerações éticas.....	52
3.4. Colheita de dados.....	53
3.4.1. Colheita de dados Gerais e Bioquímicos	53
3.4.2. Extração de DNA genómico	53

3.4.3. Avaliação da concentração e do grau de pureza do DNA extraído ..	53
3.5. Variantes genéticas polimórficas analisadas.....	53
3.6. Genotipagem dos polimorfismos genéticos	54
3.6.1. Identificação dos polimorfismos genéticos IL-6 -174 G/C, TNF- α -238 G/A e RAGE -374 T/A.....	54
3.6.2. Identificação do polimorfismo genético HMOX-1 -413 T/A.....	54
3.7. Parâmetros bioquímicos e celulares estudados	56
3.8. Análise estatística.....	57
4. RESULTADOS.....	58
4.1. Caracterização da amostra	58
4.2. Dados bioquímicos e celulares da amostra total	59
4.3. Dados bioquímicos e celulares da amostra por grupos.....	61
4.4. Comparação entre a distribuição dos genótipos da IL-6, TNF- α , RAGE e HMOX-1 da população estudada e as populações europeia, espanhola e italiana	63
4.5. Associação das variantes genéticas polimórficas com os grupos estudados.....	64
4.6. Frequência e distribuição dos modelos genéticos para os quatro polimorfismos genéticos nos grupos estudados	65
4.7. Associação dos parâmetros bioquímicos e celulares com as variantes genéticas polimórficas	66
4.7.1. Associação dos parâmetros bioquímicos e celulares com o polimorfismo IL-6 -174 GC.....	66
4.7.2. Associação dos parâmetros bioquímicos e celulares com o polimorfismo RAGE -374 TA.....	68
4.7.3. Associação dos parâmetros bioquímicos e celulares com o polimorfismo HMOX-1 -413 TA	70
4.8. Associação dos parâmetros bioquímicos e celulares com as variantes genéticas polimórficas e os grupos estudados	72
4.8.1. Associação do polimorfismo -174 GC da IL-6 com os parâmetros bioquímicos e celulares e os grupos estudados	72
4.8.2. Associação do polimorfismo -238 GA do TNF- α com os parâmetros bioquímicos e celulares e os grupos estudados	77
4.8.3. Associação do polimorfismo -374 TA do RAGE com os parâmetros bioquímicos e celulares e os grupos estudados	79
4.8.4. Associação do polimorfismo -413 TA da HMOX-1 com os parâmetros bioquímicos e celulares e os grupos estudados	82
4.9. Associação dos parâmetros bioquímicos e celulares com as variantes genéticas polimórficas por grupo estudado	85

4.9.1. Associação do polimorfismo -174 GC da IL-6 com os parâmetros bioquímicos e celulares e os grupos estudados	85
4.9.2. Associação do polimorfismo -238 GA do TNF- α com os parâmetros bioquímicos e celulares e os grupos estudados	89
4.9.3. Associação do polimorfismo -374 TA do RAGE com os parâmetros bioquímicos e celulares e os grupos estudados	92
4.9.4. Associação do polimorfismo -413 TA da HMOX-1 com os parâmetros bioquímicos e celulares e os grupos estudados	96
5. DISCUSSÃO	102
5.1. Frequências e distribuição dos genótipos na população diabética estudada	102
5.2. Associação entre os parâmetros bioquímicos e celulares e os grupos estudados.....	105
5.3. Associação entre os parâmetros bioquímicos e celulares e os polimorfismos genéticos estudados por grupos	108
5.3.1. Polimorfismos pró-inflamatórios (RAGE, IL-6 e TNF- α)	108
5.3.2. Polimorfismo anti-inflamatório (HMOX-1)	112
6. CONCLUSÃO	115
7. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICAS	118
8. ANEXOS	132

Índice de Figuras

Figura 1	Número estimado de pessoas com diabetes em todo o mundo e por região da IDF em 2019, 2030 e 2045 (20–79 anos).	18
Figura 2	Vias de formação e produtos finais de glicação avançada.	25
Figura 3	Desenvolvimento do estado de inflamação na DMT2.	33
Figura 4	Fatores que contribuem para o risco cardiovascular aumentado na diabetes <i>mellitus</i> tipo 2	36
Figura 5	Mecanismos envolvidos no desenvolvimento de complicações vasculares na diabetes <i>mellitus</i> .	37
Figura 6	Localização do gene IL-6.	41
Figura 7	Localização do gene TNF- α .	44
Figura 8	Localização do gene RAGE.	46
Figura 9	Localização do gene HMOX-1.	48
Figura 10	Diagrama utilizado na análise dos resultados obtidos.	56

Índice de Tabelas

Tabela 1	Tabela resumo dos polimorfismos estudados	50
Tabela 2	Polimorfismos genéticos analisados, número rs, localização no cromossoma e respectivas alterações.	53
Tabela 3	Condições de amplificação e genotipagem e respetivos componentes utilizados no <i>Endpoint genotyping</i> .	54
Tabela 4	Sequência do <i>primer</i> utilizado para amplificação dos fragmentos de interesse.	55
Tabela 5	Condições de amplificação e componentes utilizados na reação de PCR.	55
Tabela 6	Características iniciais da amostra.	59
Tabela 7	Dados bioquímicos e celulares da amostra total.	60
Tabela 8	Dados bioquímicos e celulares da amostra por grupos estudados.	62
Tabela 9	Comparação das frequências genotípicas entre a população estudada e as populações europeia, espanhola e italiana.	63
Tabela 10	Associação dos polimorfismos genéticos com os grupos estudados.	64
Tabela 11	Frequência e distribuição dos modelos genéticos dos 4 polimorfismos avaliados na amostra.	66
Tabela 12	Associação do alelo G do polimorfismo -174 GC da IL-6 com os parâmetros bioquímicos.	66
Tabela 13	Associação do alelo C do polimorfismo -174 GC da IL-6 com os parâmetros bioquímicos.	67
Tabela 14	Associação do genótipo GC do polimorfismo -174 GC da IL-6 com os parâmetros bioquímicos.	67
Tabela 15	Associação do alelo A do polimorfismo -374 TA do RAGE com os parâmetros bioquímicos.	68
Tabela 16	Associação do alelo T do polimorfismo -374 TA do RAGE com os parâmetros bioquímicos.	69
Tabela 17	Associação do genótipo TA do polimorfismo -374 TA do RAGE com os parâmetros bioquímicos.	69
Tabela 18	Associação do alelo A do polimorfismo -413 TA da HMOX-1 com os parâmetros bioquímicos.	70
Tabela 19	Associação do genótipo TA do polimorfismo -413 TA da HMOX-1 com os parâmetros bioquímicos.	71
Tabela 20	Associação do alelo G do polimorfismo -174 GC da IL-6 com os parâmetros bioquímicos e os grupos estudados.	72

Tabela 21	Associação do alelo C do polimorfismo -174 GC da IL-6 com os parâmetros bioquímicos e os grupos estudados.	74
Tabela 22	Associação do genótipo GC do polimorfismo -174 GC da IL-6 com os parâmetros bioquímicos e os grupos estudados.	75
Tabela 23	Associação do alelo A do polimorfismo -238 GA do TNF- α com os parâmetros bioquímicos e os grupos estudados.	77
Tabela 24	Associação do genótipo GA do polimorfismo -238 GA do TNF- α com os parâmetros bioquímicos e os grupos estudados.	78
Tabela 25	Associação do alelo T do polimorfismo -374 TA do RAGE com os parâmetros bioquímicos e os grupos estudados.	79
Tabela 26	Associação do genótipo TA do polimorfismo -374 TA do RAGE com os parâmetros bioquímicos e os grupos estudados.	81
Tabela 27	Associação do alelo T do polimorfismo -413 TA da HMOX-1 com os parâmetros bioquímicos e os grupos estudados.	82
Tabela 28	Associação do genótipo TA do polimorfismo -413 TA da HMOX-1 com os parâmetros bioquímicos e os grupos estudados.	84
Tabela 29	Associação dos parâmetros bioquímicos com a doença para o alelo G do polimorfismo -174 GC da IL-6.	85
Tabela 30	Associação dos parâmetros bioquímicos com a doença para o alelo C do polimorfismo -174 GC da IL-6.	87
Tabela 31	Associação dos parâmetros bioquímicos com a doença para o genótipo GC do polimorfismo -174 GC da IL-6.	88
Tabela 32	Associação dos parâmetros bioquímicos com a doença para o alelo A do polimorfismo -238 GA do TNF- α .	90
Tabela 33	Associação dos parâmetros bioquímicos com a doença para o genótipo GA do polimorfismo -238 GA do TNF- α .	91
Tabela 34	Associação dos parâmetros bioquímicos com a doença para o alelo T do polimorfismo -374 TA do RAGE.	93
Tabela 35	Associação dos parâmetros bioquímicos com a doença para o genótipo TA do polimorfismo -374 TA do RAGE.	95
Tabela 36	Associação dos parâmetros bioquímicos com a doença para o alelo T do polimorfismo -413 TA da HMOX-1.	97
Tabela 37	Associação dos parâmetros bioquímicos com a doença para o genótipo TA do polimorfismo -413 TA da HMOX-1.	100
Tabela 38	Correlação de Pearson entre os parâmetros bioquímicos para o grupo I (com angiopatia).	132
Tabela 39	Correlação de Pearson entre os parâmetros bioquímicos para o grupo I (com angiopatia) (continuação).	133

Tabela 40	Correlação de Pearson entre os parâmetros bioquímicos para o grupo II (sem angiopatia).	134
Tabela 41	Correlação de Pearson entre os parâmetros bioquímicos para o grupo II (sem angiopatia) (continuação).	135

Lista de Abreviaturas

AGEs – *Advanced glycation end-products*

AVC – Acidente vascular cerebral

CHGM – Concentração de hemoglobina globular média

C-HDL – Colesterol das lipoproteínas de elevada densidade plasmática

C-LDL – Colesterol das lipoproteínas de baixa densidade plasmática

CT – Colesterol total

DCV – Doença cardiovascular

DMT2 – Diabetes *mellitus* tipo 2

DNA – Ácido desoxirribonucleico

HbA1c – Hemoglobina glicada

HMOX-1 – Heme oxigenase-1

IC – Intervalo de confiança

IDF – *International Diabetes Federation*

IL-1 – Interleucina 1

IL-1 β – Interleucina 1 beta

IL-1RA – Antagonista do recetor da interleucina-1

IL-6 – Interleucina 6

IL-10 – Interleucina 10

IL-18 – Interleucina 18

IMC – Índice de massa corporal

Hcy – Homocisteína

HGM – Hemoglobina globular média

MAD – Malondialdeído

NF-kB – Fator nuclear kappa B

OR – *Odds Ratio*

PAD – Pressão arterial diastólica

PAI-1 – Inibidor-1 do ativador do plasminogénio

PAS – Pressão arterial sistólica

PCR – *Polymerase chain reaction*

RAGE – *Receptor for advanced glycation end products*

RE – Retículo endoplasmático

ROS – *Reactive oxygen species*

RFLP – *Restriction fragment length polymorphism*

SNS – Sistema Nacional de Saúde

TBE – Tris/Borato/EDTA

TGF- β – Fator de transformação de crescimento beta

TNF- α – Fator de necrose tumoral alfa

UE – União Europeia

VGM – Volume globular médio

1. INTRODUÇÃO

1.1. Etiologia e Fisiopatologia da Diabetes *mellitus* tipo 2

A diabetes *mellitus* tipo 2 (DMT2) é uma doença metabólica crônica caracterizada por níveis elevados de glucose no sangue (1), originando, com o tempo, lesões no coração, olhos, rins e nervos (2). Esta doença heterogênea resulta da interação entre fatores ambientais e fatores genéticos (1,3). A predisposição genética tem um papel relevante no risco de desenvolver DMT2 (2). A presença de história familiar de DMT2 representa um risco aumentado de 2 a 3 vezes para o surgimento da doença, com um risco de 15% a 30% de desenvolver DMT2 ou menor tolerância à glucose em familiares de 1º grau de indivíduos com DMT2. Se ambos os pais tiverem DMT2, o descendente terá um risco superior, cerca de 60% aos 60 anos de vir a desenvolver diabetes *mellitus* do tipo 2. O mesmo acontece se, no caso de gêmeos monozigóticos, um dos gêmeos tiver DMT2, o risco de o outro gêmeo desenvolver DMT2 será superior, cerca de 35% a 58%, quando comparado com gêmeos dizigóticos em que o risco diminui para cerca de 20% (1).

A insulina é a hormona responsável por regular os níveis de glucose no sangue e é produzida nos ilhéus de Langerhans localizados no pâncreas. Neste órgão, existem dois tipos de células, as células α , que quando existe uma redução dos níveis de glucose no sangue secretam glucagina, ao passo que as células β são responsáveis pela produção de insulina que é libertada quando existe uma elevação dos níveis plasmáticos de glucose. No caso de um indivíduo não diabético, a glicémia é mantida estável devido a uma interação equilibrada entre a secreção de insulina e a eficácia da ação da mesma, isto é, as células pancreáticas são capazes de se adaptar a variações na ação da insulina e, como tal, se existir uma diminuição da ação da insulina, haverá uma maior secreção da mesma (1). Em indivíduos não diabéticos, após uma refeição, os níveis de glucose sobem e a libertação de insulina aumenta, ao passo que a secreção de glucagina diminui. Nos indivíduos com DMT2, o cenário é diferente, depois de uma refeição, os níveis de glucose no sangue sobem mais comparando com os indivíduos não diabéticos, o pico de insulina plasmática é retardado e os níveis de glucagina não diminuem, em vez disso, observa-se um ligeiro aumento.

Efetivamente, o facto de os níveis de glucagina não diminuírem, pensa-se que será a chave para entender a desregulação do metabolismo da glucose, a resistência à insulina e a sua produção insuficiente (4).

A diabetes *mellitus* tipo 2 é uma doença inflamatória crónica induzida pela obesidade. Caracteriza-se por uma inflamação crónica de baixo grau, hiperglicemia, resistência à insulina, hiperinsulinémia e secreção deficiente de insulina pelas células β pancreáticas. Os órgãos envolvidos no desenvolvimento desta doença incluem o pâncreas (células α e células β), fígado, músculo esquelético, rins, cérebro, intestino delgado e tecido adiposo (5,6).

A inflamação crónica leva à resistência à insulina nos órgãos-alvo da insulina primária, nomeadamente, o tecido adiposo, músculo e fígado. No processo de inflamação, existem uns mediadores importantes, os macrófagos, que atuam principalmente no tecido adiposo e nas células β pancreáticas (6).

No processo inflamatório, existem determinados macrófagos que promovem a inflamação, designados por M1 (macrófago pró-inflamatório), e macrófagos que atenuam a inflamação, apelidados por M2 (macrófago anti-inflamatório) (7).

A resistência à insulina é uma condição na qual a insulina no corpo não exerce ação suficiente proporcional à sua concentração no sangue (2). As células β tendem a aumentar a secreção de insulina (hiperinsulinémia) de forma a compensar a resistência à insulina, mantendo as concentrações plasmáticas de glucose em níveis normais ou pré-diabéticos. O pâncreas é incapaz de continuar a produzir insulina de maneira adequada, ou seja, os níveis de insulina são sempre deficientes em relação aos níveis elevados de glucose, tornando-se difícil de manter a homeostase da glucose, levando a uma condição de hiperglicemia (2,3). Quando isto acontece, é feito o diagnóstico de diabetes *mellitus* tipo 2 (3).

Os critérios de diagnóstico segundo a Associação Americana de Diabetes (8) são:

- Glicemia em jejum superior a 126 mg/dl. O jejum é definido como não havendo ingestão calórica por pelo menos 8 horas;

OU

- Glicemia superior a 200 mg/dl às 2 horas na Prova de Tolerância à Glicose Oral (PTGO) com 75 g de glucose;
OU
- Hemoglobina Glicada A1c superior a 6,5%;
OU
- Sintomas clássicos + glicemia ocasional superior a 200 mg/dl.

Os sintomas clássicos no diagnóstico da diabetes são a polidipsia (sede constante e difícil de controlar), poliúria (urinar em grande quantidade e várias vezes), polifagia (fome constante e difícil de controlar), xerostomia (sensação de boca seca), fadiga, feridas de cicatrização lenta e visão turva (9).

A resistência à insulina causa hiperglicemia, e esta por sua vez, promove um aumento da formação intercelular *Advanced glycation end-products* (AGEs) (10). Os AGEs são um grupo de compostos heterogêneos, formados a partir de uma reação não enzimática que ocorre entre açúcares redutores ou lípidos oxidados com proteínas, aminofosfolípidos ou ácidos nucleicos, durante o envelhecimento, mas que ocorre de forma acelerada na diabetes *mellitus* como resultado da hiperglicemia (11,12,13,14). Os mecanismos por de trás da lesão no tecido causada por AGEs, tem que ver com glicação intracelular, formação de reticulação e interação com *Receptor for advanced glycation end products* (RAGE) (10).

A hiperglicemia desenvolve-se progressivamente e normalmente, ao início, não é grave o suficiente para que o indivíduo perceba os sintomas clássicos da diabetes. No entanto, estes indivíduos não diagnosticados apresentam já um risco aumentado de desenvolver complicações microvasculares e macrovasculares (3).

Estas circunstâncias resultam em danos na vasculatura, podendo originar complicações como aterosclerose, insuficiência renal e retinopatia. Condições inflamatórias prejudicam a cicatrização de feridas por macrófagos, levando a uma das principais causas de amputação em doentes com DMT2, as úlceras nos pés (6).

Na diabetes *mellitus* tipo 2, existem fatores de risco modificáveis e não modificáveis. Os fatores de risco modificáveis podem ser alvo de intervenção por

parte dos profissionais de saúde, e são eles, a alimentação, sedentarismo, excesso de peso ou obesidade, hipertensão arterial, exposição ambiental, tabagismo e consumo de bebidas alcoólicas. E existem fatores de risco não modificáveis, tais como, a idade, genética, história familiar e etnia (15).

1.2. Epidemiologia e prevalência da diabetes

A diabetes *mellitus* tem vindo a ser reconhecida como sendo uma epidemia emergente em todo o mundo (16) fortemente impulsionada pela interação entre fatores socioeconómicos, demográficos, genéticos e ambientais (17). A evolução da sociedade, a crescente urbanização e a alteração de estilos de vida, nomeadamente, um aumento da ingestão de alimentos excessivamente calóricos e o sedentarismo, têm contribuído para o aumento da prevalência da DMT2. Muito embora, a prevalência global de diabetes seja em áreas urbanas com 10,8%, a prevalência em zonas rurais tem vindo a aumentar, estando atualmente em 7,2% (17).

Segundo a *International Diabetes Federation* (IDF), 9ª edição do Atlas da Diabetes, estimou-se que em 2019 existisse em todo o mundo cerca de 463 milhões de pessoas adultas com diabetes, ou seja, 9,3% dos adultos com idades compreendidas entre os 20 e 79 anos é diabético (18). Em 2010, a projeção global

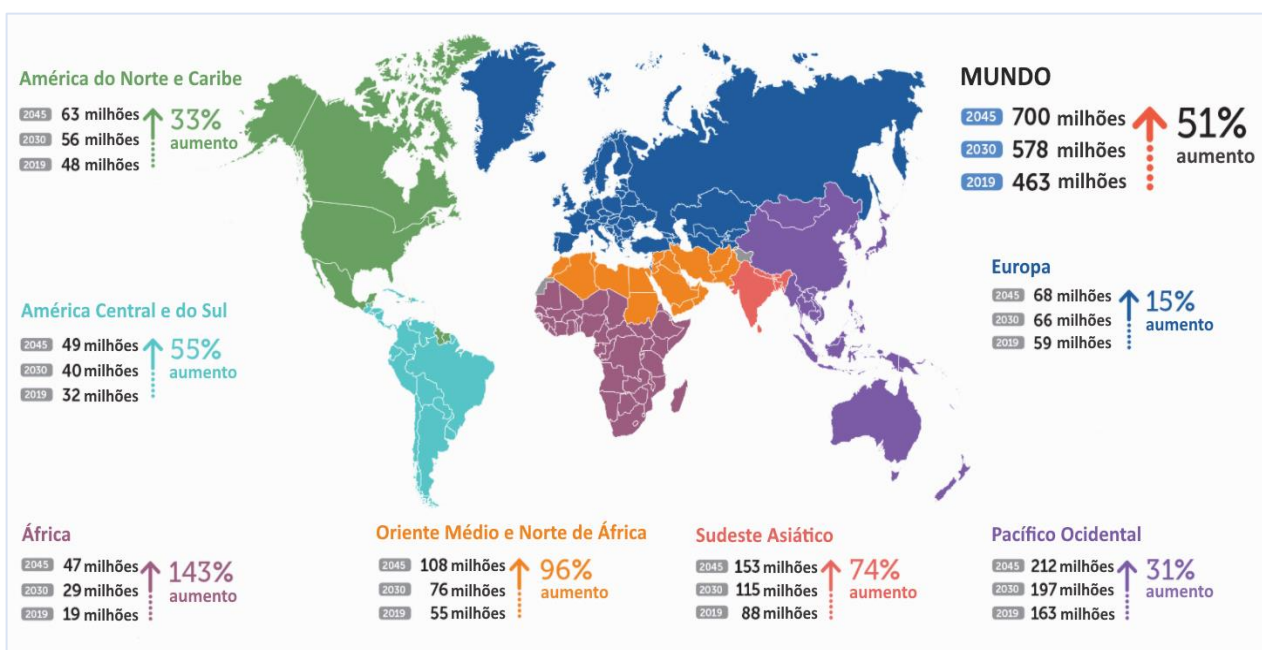


Figura 1. Número estimado de pessoas com diabetes em todo o mundo e por região da IDF em 2019, 2030 e 2045 (20–79 anos). [Adaptado de (17)].

para a diabetes em 2025 era de 438 milhões, o que significa que, à data da publicação desta edição, ainda restavam 5 anos e essa previsão já tinha sido superada em 25 milhões. Estes dados demonstram que existe a necessidade urgente de se implementar estratégias que abrangem várias áreas e setores, de modo a “combater” a diabetes, se tal não acontecer, estima-se que em 2030, haverá 578 milhões de adultos com diabetes e em 2045, haverá 700 milhões (**Fig. 1**) (17).

Ainda assim, dos 463 milhões de adultos com diabetes, metade não tinha sido diagnosticado (cerca de 232 milhões de pessoas) (18). Das pessoas diagnosticadas com diabetes, cerca de 352 milhões está em idade ativa, ou seja, situam-se na faixa etária entre 20 e 64 anos. Calcula-se que em 2030 sejam 417 milhões e, em 2045 sejam 486 milhões. Estes dados revelam que nas próximas décadas, haverá um impacto bastante negativo na produtividade e crescimento económico (17).

No ano de 2019, os dados indicam que uma em cada cinco pessoas com mais de 65 anos tem diabetes (cerca de 111 milhões de pessoas) e estima-se que este número aumente para 195 milhões em 2030, e 276 milhões em 2045. Estes valores indicam que nos próximos 25 anos, haverá uma sociedade em envelhecimento diabética e como tal, trará inevitáveis custos económicos para a saúde. Em 2019, a região do mundo com maior prevalência de diabetes em adultos ajustada por idade era o Médio Oriente e o Norte de África, representando 12,2% da prevalência global, e estima-se que em 2030 este valor aumente para 13,3% e, em 2045 para 13,9%. No mesmo ano de 2019, a região do mundo com menor prevalência de diabetes em adultos ajustada por idade era África, representando 4,7% da prevalência global, e calcula-se que em 2030 este valor aumente para 5,1% e, em 2045 para 5,2%. Estas percentagens mais baixas podem ser, em parte, justificadas pelos baixos níveis de urbanização, existência de subnutrição e reduzida prevalência de pessoas com excesso de peso e obesidade. Em 2019, os países com maior número de adultos com diabetes era a China com 116 milhões, a Índia com 77 milhões e os Estados Unidos da América com 31 milhões, e estima-se que este *ranking* permaneça assim até 2030 (17). Em 2019, estimou-se que morreriam nesse mesmo ano, 4,2 milhões de adultos com idade entre 20 e 79 anos em todo o mundo devido à diabetes,

representando 11,3% de todas as causas de morte. Estimando-se ainda que, quase metade (46,2% - 1,9 milhões de adultos) tenham acontecido em adultos com idade inferior a 60 anos. No mesmo ano de 2019, o número de mortes devido à diabetes foi superior nas mulheres (2,3 milhões), do que nos homens (1,9 milhões). Contudo, ao estratificar-se por idade e género, pode observar-se que no género feminino, a maior mortalidade associada à diabetes situa-se na faixa etária dos 70 aos 79 anos (aproximadamente 708 mil), e no caso do género masculino, situa-se na faixa etária dos 60 aos 69 anos (cerca de 524 mil) (19).

A diabetes *mellitus* cria um impacto económico negativo nos sistemas de saúde dos países. A IDF estima que 10% dos gastos globais anuais com a saúde sejam gastos devido à diabetes, aproximadamente 621 milhões de euros. Prevê-se que estes custos diretos atinjam os 674 milhões de euros em 2030 e os 690 milhões de euros em 2045. Os custos dos tratamentos por complicações derivadas da diabetes representam mais de 50% dos custos diretos nos sistemas de saúde. Em relação aos custos indiretos, estima-se que acrescentem 35% aos gastos anuais globais, estes compreendem a invalidez, abandono/perda do emprego, absentéismo, presenteísmo e mortalidade prematura (17).

Recentemente, foi divulgada a 10ª edição do Atlas da Diabetes – IDF, confirmando que a diabetes é uma das doenças que mais cresce a nível mundial no século XXI. Estima-se que em 2021 existisse mais de meio milhão (537 milhões) de pessoas com diabetes em todo o mundo com idades compreendidas entre 20 e 79 anos, e que mais de 6,7 milhões tenham morrido de causas associadas à diabetes. Prevê-se ainda que em 2030 existam cerca de 643 milhões de pessoas com diabetes e 783 milhões em 2045. Estes números superam as previsões da 9ª edição do Atlas da Diabetes, revelando o grave problema de saúde que os sistemas de saúde de todos os países do mundo têm em mãos, e que urge a tomada de decisões para o resolver (20).

Foi estimado para a União Europeia (UE) em 2019, a existência de 32,3 milhões de adultos com diabetes, um aumento bastante considerável tendo em conta os 16,8 milhões estimados em 2000. Estimou-se ainda que mais de 24,2 milhões não tenham sido diagnosticados. O número de mulheres com diabetes em 2000 era de 9,5 milhões, tendo aumentado para 15,6 milhões em 2019. Em relação ao número de homens com diabetes, à data de 2000 era de 7,3%, aumentando

mais do dobro, com 16,7% em 2019. Tal é explicado devido à maior probabilidade destes últimos desenvolverem esta doença, por apresentarem fatores biológicos e não necessitarem de ganhar tanto peso como as mulheres para desenvolverem diabetes (21).

É mais comum surgirem pessoas com diabetes na faixa etária dos 60 aos 79 anos, existindo cerca de 19,3 milhões de indivíduos com esta doença na UE. Já na faixa etária dos 40 aos 59 anos, existem 11,3 milhões e 1,7 milhões entre os 20 e 39 anos. Em 2019, a média da prevalência de diabetes em adultos nos países da UE era de 6,2%. Os três países da UE que apresentavam maior prevalência eram a Alemanha com 10,4%, de seguida Portugal com 9,8% e o Chipre com 9,0%. Os países da EU com menor prevalência eram a Irlanda com 3,2%, a Lituânia com 3,8% e a Estónia com 4,2% (21).

Nos últimos anos, a prevalência desta doença parece ter estabilizado em vários países europeus, principalmente nos países do Norte da Europa, contudo, parece ter havido um ligeiro aumento nos países do Sul, Centro e Leste da Europa. Tal pode ser justificado devido ao aumento do sedentarismo, obesidade e à forma como olham para o envelhecimento da população. Como já antes referido, a diabetes *mellitus* acarreta elevados custos económicos. As despesas de saúde reservadas para o tratamento e prevenção de complicações pela diabetes, foram estimadas em aproximadamente 150 mil milhões de euros em 2019 na UE, sendo a despesa média por cada adulto diabético estimada em 3 mil euros por ano. Portugal, Espanha e Itália apresentaram as taxas mais baixas por admissões hospitalares evitáveis por diabetes. Sendo que entre 2012 e 2017, este tipo de admissões hospitalares diminuiu em mais de 40% em Portugal. Em 2017, a diabetes foi responsável por 2% de todas as causas de morte nos países europeus (21).

Em Portugal, no ano de 2018, a prevalência estimada de diabetes na faixa etária dos 20 aos 79 anos era de 13,6%, cerca de 7,7 milhões de indivíduos. Sendo que 56% destes indivíduos já tinham diagnóstico e os restantes ainda não. Observa-se uma diferença estatisticamente significativa na prevalência da diabetes entre homens e mulheres, sendo mais prevalente nos homens (18).

Existe também um aumento da prevalência consoante a idade, sendo que mais de um quarto dos indivíduos entre os 60 e 79 anos sofre desta patologia. Verifica-se que existe uma relação entre o escalão de Índice de Massa Corporal (IMC) e a diabetes, pois cerca de 90% da população com diabetes apresenta excesso de peso ou obesidade. A prevalência desta doença em indivíduos obesos ($IMC \geq 30 \text{kg/m}^2$) é quatro vezes superior do que nos indivíduos com IMC normal ($18,6 \text{kg/m}^2 > IMC \leq 24,9 \text{kg/m}^2$) (18).

Nos últimos 10 anos, tem sido verificado anualmente um ligeiro aumento do número de novos casos diagnosticados. Em 2018, havia uma incidência de 605 a 618 novos casos de diabetes por cada 100 mil indivíduos. Os indivíduos com diabetes representaram em 2018, cerca de 26,6% (10 701 indivíduos) da letalidade intra-hospitalar no Sistema Nacional de Saúde (SNS), ou seja, mais de $\frac{1}{4}$ das pessoas que morreram nos hospitais sofriam desta patologia. Não obstante, em casos em que a diabetes era o diagnóstico principal, houve um decréscimo no número absoluto de óbitos registados nos internamentos, -38% nos últimos 10 anos. Entre 2009 e 2018, diminuiu significativamente o número de utentes saídos dos internamentos em hospitais do SNS, cuja diabetes é o diagnóstico principal. Em casos em que a diabetes é considerada como diagnóstico associado, foi registado um aumento de 39,3% entre 2009 e 2018 dos utentes saídos dos internamentos em hospitais do SNS. As causas principais destes internamentos devem-se maioritariamente a doenças do aparelho circulatório (26%), do aparelho respiratório (16%) e do aparelho digestivo (10%). De salientar que se registou uma perda da representatividade das doenças endócrinas entre 2009 e 2018, de 12% para 7%, respetivamente (18).

Relativamente às causas de internamento por descompensação ou complicações derivadas da diabetes, as manifestações oftálmicas mostram ser a principal causa com 83%, de seguida outras manifestações especificadas com 7%, e a cetoacidose e alterações circulatórias periféricas a registarem ambas 3%. A permanência constante de elevados níveis de glucose no sangue, leva ao surgimento de lesões em tecidos e órgãos, nomeadamente nos olhos, rins, nervos periféricos e sistema vascular, dando origem a complicações da diabetes, graves e por vezes fatais. Os custos associados a esta doença são muito elevados, estes incluem os cuidados de saúde, a perda de rendimentos, a perda

de produtividade e os custos económicos para a sociedade portuguesa. As complicações crónicas mais frequentes desta doença, são a neuropatia e amputação, retinopatia, nefropatia e doenças cardiovasculares (DCV). Nos últimos anos, tem-se observado uma redução significativa no número total de amputações nos membros inferiores devido à diabetes, diminuindo de 1620 em 2009, para 928 em 2018. Desde 2009, que se observa um crescente número de pessoas com diabetes inseridas em Programas de Rastreio da Retinopatia Diabética. A prevalência de diabetes em pessoas com insuficiência renal crónica era de 27,2% em 2011, e de 27,8% em 2018. Em relação aos internamentos por Acidente Vascular Cerebral (AVC) em pessoas com diabetes, estes rondavam os 30% em 2018. E em internamentos por Enfarte Agudo do Miocárdio em pessoas com diabetes, rondavam em 2018%, os 32,6% (18).

Ao longo da última década, tem sido observado um decréscimo no número de anos potenciais de vida perdida devido à diabetes *mellitus*, cerca de -26%. No entanto, em 2018, verificou-se a perda de 8 anos de vida por cada óbito devido à diabetes em indivíduos com idade inferior a 70 anos. Embora, tenha havido uma ligeira redução da representatividade da diabetes como causa de morte, a mesma continua a ter um peso significativo, tendo originado 3,8% dos óbitos verificados em 2018. Os custos da diabetes para o sistema de saúde português, são também eles elevados, sendo que em 2018, foram gastos entre 1 300 e 1 550 milhões de euros em custos diretos, representando 0,6 a 0,8% do Produto Interno Bruto português e 7 a 8% da despesa em saúde (18). Em 2019, em Portugal, a prevalência estimada de diabetes na faixa etária dos 20 aos 79 anos era de 9,8% (21).

A Organização Mundial de Saúde e a Organização das Nações Unidas estabeleceram metas a nível global para incentivar ações com vista a fortalecer os sistemas de saúde e a melhorar o atendimento das pessoas com esta patologia. Assim, poderá ser possível reduzir o número de mortes prematuras por doenças não transmissíveis, onde se inclui a diabetes, em 30% até 2030 (22).

1.3. Patogénese e complicações da diabetes mellitus

O *stress* oxidativo desempenha um papel relevante na patogénese das complicações micro e macrovasculares em indivíduos diabéticos. O aumento do *stress* oxidativo em pacientes com DMT2 é devido a vários fatores, tais como, a hiperglicemia, resistência à insulina, hiperinsulinemia e dislipidemia (23).

A presença constante de níveis elevados de glucose no sangue está também associada a um risco aumentado de desenvolvimento de complicações micro e macrovasculares em doentes diabéticos através de mecanismos moleculares, nomeadamente aumento da formação de AGEs, produção excessiva de ROS, ativação da proteína quinase C e ainda a ativação das vias do polioli e da hexosamina, mecanismos estes que têm sido mencionados como estando envolvidos na disfunção endotelial e aterogénese (17,24,25). Estas complicações são responsáveis por morbidade e mortalidade significativas (16).

A glicação não enzimática é outro importante fator que pode explicar como a hiperglicemia crónica leva a danos celulares e teciduais, tendo assim, uma grande contribuição na patogénese das complicações de diabetes *mellitus* (26). Está descrito na literatura que pessoas com diabetes têm níveis mais elevados AGEs, comparando com pessoas não diabéticas. Tal acontece porque a hiperglicemia e o *stress* oxidativo contribuem para a sua acumulação (27).

A capacidade que os AGEs têm para alterar irreversivelmente as propriedades químicas e funcionais de diversas estruturas biológicas está relacionada com os efeitos patológicos que AGEs produzem, através da produção de radicais livres, da formação de ligações cruzadas com proteínas e de interação com recetores celulares, promovendo respetivamente, *stress* oxidativo, alterações morfológicas e funcionais e aumento da expressão de mediadores inflamatórios (13).

A reação de *Maillard*, uma reação não enzimática, é a via mais comum conhecida para formar AGEs (11), designando-se simultaneamente por glicação, é constituída por três etapas principais: iniciação, propagação e terminação (13). O grupo carbonilo de um açúcar redutor, como por exemplo a glucose, reage com o grupo amino, como por exemplo a lisina, formando uma base de *Schiff*. A base de *Schiff* que é instável, sofre vários rearranjos formando um produto mais estável, denominado por produto de *Amadori* (11). Os produtos de *Amadori*

pode ocorrer em proteínas, lípidos e ácidos nucleicos. No caso das proteínas, como por exemplo o colagénio, os AGEs causam ligações cruzadas entre polipeptídeos da membrana do colagénio e aprisionam proteínas plasmáticas ou intersticiais não glicadas. Nos vasos, o aprisionamento da lipoproteína de baixa densidade (LDL) diminui o efluxo a partir da parede vascular e acelera a deposição de colesterol na íntima, promovendo o processo de aterogénese. Complementarmente, a membrana basal glicosilada dos capilares leva a fixação de proteínas plasmáticas, como a albumina, que é em parte responsável pelo aumento da espessura da membrana, característica de microangiopatia diabética. Os AGEs ligam-se a recetores que estão presentes em vários tipos de células, tais como, células endoteliais, macrófagos, monócitos, linfócitos, células do músculo liso, células mesangiais. Esta ligação origina uma grande variedade de atividades biológicas, nomeadamente, emigração de monócitos, libertação de citocinas e fatores de crescimento induzidos por macrófagos, incremento da permeabilidade endotelial, aumento da atividade pró-coagulante nas células endoteliais e os macrófagos, proliferação acelerada da síntese da matriz extracelular por parte de fibroblastos e células musculares lisas. Todos estes efeitos podem contribuir para as complicações da diabetes *mellitus* (26).

O primeiro exemplo de glicação não enzimática de proteínas a ser descoberto *in vivo* foi a hemoglobina glicada (HbA1c). Esta sofre glicação na valina terminal da cadeia β com alteração da sua carga elétrica de superfície. Regra geral, o tempo médio de vida das hemácias é de 120 dias, durante esse período, a hemoglobina presente nos glóbulos vermelhos é exposta à glucose plasmática e dependendo da sua concentração, a glucose reage com a hemoglobina de forma não enzimática, originando a hemoglobina glicada. Como tal, a concentração de HbA1c reflete a média da concentração de glucose plasmática durante as semanas antecedentes. Deste modo, a HbA1c é utilizada para avaliar o controlo metabólico da diabetes a longo prazo, promovendo um melhor controlo da doença e das suas complicações cardiovasculares (3,26).

O *pool* endógeno de AGEs tem que ver com o balanço entre a formação endógena e a absorção de AGEs exógenos e, por outro lado, a degradação e eliminação destes. A formação de AGEs é maioritariamente endógena, porém podem também ser introduzidos no organismo a partir de fontes exógenas

(alimentação e fumo) (13). Os últimos anos têm sido tomados por uma modificação na alimentação humana, tendo-se observado um aumento do consumo de alimentos industrializados. Estes alimentos processados contêm elevados níveis de AGEs que contribuem para o incremento do *stress* oxidativo e da inflamação, através da ligação a recetores de superfície celular ou ligação cruzada com proteínas alterando a estrutura e função, estando ambos relacionados com a diabetes *mellitus* e doenças cardiovasculares, como referido anteriormente. Os AGEs estão naturalmente presentes em alimentos não cozinhados de origem animal e o próprio processamento e aquecimento, nomeadamente técnicas que utilizam elevadas temperaturas e baixa humidade durante longos períodos de tempo, como assar, grelhar e fritar, aceleram formação de novos AGEs. Como referido anteriormente, vivemos numa era em que existe um excessivo consumo de alimentos industrializados. De facto, a indústria produz alimentos que são expostos a processos térmicos seja por razões de segurança, seja por conveniência, para além de realçar o seu sabor, cor e aparência, com a finalidade de induzir o consumidor a adquirir estes produtos. Como tal, a alimentação dos dias de hoje é extremamente rica em AGEs, e tem sido relacionada com a diabetes e doenças cardiovasculares (28). Cerca de 10% dos AGEs consumidos numa refeição, podem ser absorvidos e entram em circulação (29). Da fração absorvida, cerca de dois terços são retidos pelo organismo e o restante um terço é excretado pela urina num período de 48 horas, em indivíduos com função renal normal (13). Em pessoas com diabetes mas sem complicações, tem sido observado um aumento de 20-30% dos níveis plasmáticos de AGEs, e em pessoas diabéticas com doença arterial coronária ou microalbuminúria, tem sido notado um aumento de 40-100% (27). Alterar o tipo de confeção e diminuir o consumo de alimentos ricos em AGEs, como os alimentos de origem animal com elevado teor em gordura e proteína, lacticínios com elevado teor de gordura e alimentos processados, diminuirá os níveis plasmáticos destes em circulação. Assim, deverá optar-se pelo aumento do consumo de alimentos como vegetais, frutas, grão integrais, peixe, produtos lácteos com baixo teor de gordura, porque contêm menores níveis de AGEs, mesmo após a confeção. Bem como, por métodos de confeção que limitem a formação de novos AGEs, nomeadamente, estufar, cozinhar ao vapor, ferver, pois levam menor tempo de aquecimento, a baixa temperatura e elevada

humidade. Outra estratégia é expor determinados alimentos a um ambiente acidificado, como sendo o uso de ingredientes ácidos, por exemplo sumo de limão e vinagre, através de marinadas feitas antes de cozinhar, diminuindo substancialmente a quantidade de novos AGEs formados. Tais recomendações sustentam as diretrizes já publicadas por organizações como a *American Heart Association*, a *American Institute for Cancer Research* e a *American Diabetes Association*, como medidas de controlo e prevenção da diabetes e suas complicações cardiovasculares (28).

Os AGEs podem contribuir para a lesão vascular através de três mecanismos: 1) modificação de estruturas intracelulares, incluindo as que estão envolvidas na transcrição génica; 2) interação de AGEs com proteínas da matriz extracelular alterando a sinalização entre moléculas desta e células, levando a disfunção; e 3) modificação de proteínas ou lípidos em circulação, sendo que estes podem ligar-se a recetores específicos, como por exemplo RAGE, originando produção de citocinas inflamatórias e fatores de crescimento, contribuindo para o surgimento de complicações vasculares da diabetes. O RAGE pertence à superfamília de imunoglobulinas de recetores de superfície celular. Alguns estudos comprovaram o envolvimento do RAGE no desenvolvimento de macro e microangiopatias da diabetes *mellitus*. Nas células endoteliais, a interação AGE-RAGE ativa a transcrição de fator nuclear kappa B (NF- κ B), originando consequentemente um aumento da expressão dos seus genes-alvo, como a endotelina-1, moléculas de adesão de células vasculares 1, seletina E, fator tecidual, trombomodulina, fator de crescimento endotelial vascular e citocinas pró-inflamatórias, nomeadamente, interleucina-1a (IL-1a), interleucina 6 (IL-6) e TNF- α , e também de RAGE (11,13).

Em condições de excesso de AGEs, observa-se um aumento da expressão de RAGE, exemplo de *feedback* positivo (13). Ou seja, os AGEs aceleram a produção do seu recetor RAGE. Mediante o reconhecimento de AGEs por RAGE em células endoteliais, a produção de *stress* oxidativo é acelerada nas células, e diversas citocinas e fatores de crescimento são secretados através da ativação do NF- κ B, induzindo a expressão do fator de adesão e originando uma resposta inflamatória. A interação AGE-RAGE leva ao aumento do *stress* oxidativo, que por sua vez, inativa o óxido nítrico (NO), causando uma resposta inflamatória ou

levando ao agravamento de aspetos tendencialmente trombóticos que levam à progressão da arteriosclerose, ou seja, esta interação desempenha um papel importante no desenvolvimento de progressão de complicações vasculares na diabetes *mellitus* (30;31). Os AGEs promovem a produção de *vascular endothelial growth factor* (VEGF) nas células endoteliais, induzindo a angiogénese. O VEGF está relacionado com o aumento do ateroma em lesões ateroscleróticas, sugerindo que o sistema AGE-RAGE ativa a angiogénese nos ateromas, através da produção de VEGF, agravando a inflamação da placa. Este sistema AGE-RAGE inibe a produção de prostaciclina, um importante vasodilatador e inibidor da agregação plaquetária, em células endoteliais e promove a síntese *de novo* do inibidor-1 do ativador do plasminogénio (PAI-1), inibindo a atividade fibrinolítica, levando assim à estabilização do trombo. Os AGEs contribuem para a agregação plaquetária e também para a cascata de coagulação através da produção de fator tecidual. As síndromes coronarianas agudas resultam de um bloqueio repentino de uma artéria coronária, causando angina instável ou infarto agudo do miocárdio. A característica trombótica induzida por AGEs é considerada uma causa para estes eventos. Os macrófagos expressam recetores necrófagos que reconhecem as moléculas de LDL oxidadas e desnaturadas por AGEs e desenvolvem-se em células espumosas, libertando quimiocinas e acelerando o desenvolvimento da aterosclerose. Em doentes diabéticos, é comum observar-se o desenvolvimento da aterosclerose acompanhada por lesões calcificadas, sendo considerado um fator preditor de futuros eventos cardiovasculares. Os AGEs comportam-se como os pericitos em células da parede dos vasos sanguíneos, ou seja, promovem a sua diferenciação em osteoblastos, originando calcificação. Como tal, os AGEs estão envolvidos no surgimento e desenvolvimento de lesões cardiovasculares (31).

As doenças microvasculares apresentam maior prevalência e envolvem os pequenos vasos sanguíneos, incluindo a retinopatia, nefropatia e neuropatia (3, 16).

A retinopatia diabética é considerada a principal causa de cegueira na população em idade ativa, compreendendo o impacto económico que a perda de visão e a cegueira têm nos países. É, por isso, de extrema importância o diagnóstico precoce e posterior tratamento (17,32). A hiperglicemia crónica leva a lesões nos

capilares da retina, podendo levar a perda de visão e eventualmente à cegueira. Níveis constantemente elevados de glucose no sangue, em conjunto com pressão arterial elevada e colesterol também elevado, demonstram ser as principais causas de retinopatia. Aproximadamente uma em cada três pessoas com diabetes sofrem de retinopatia diabética, sendo que uma em cada dez pessoas poderá desenvolver esta complicação (33).

A nefropatia diabética é uma das causas mais comuns da doença renal crónica. É causada por lesões nos pequenos vasos, podendo contribuir para que os rins sejam menos eficientes ou falhem por completo a sua função. A constante presença de elevados níveis de glucose no sangue induz hiperfiltração e alterações morfológicas nos rins, levando ao aumento da excreção urinária de albumina (albuminúria) (34).

A neuropatia diabética é causada devido a lesões nos nervos do corpo todo, derivado da hiperglicemia crónica e de elevada pressão arterial. As partes do corpo mais afetadas são as extremidades, nomeadamente os pés. A lesão do nervo nesta área, designada por neuropatia periférica, pode causar dor, dormência progressiva e perda de sensibilidade, facilitando que os ferimentos passem despercebidos, originando graves infeções e por vezes, amputações (35). O pé diabético, que consiste na presença de úlcera no pé, está associado a neuropatia, doença arterial periférica e a infeção, sendo esta uma das causas principais de amputação dos membros inferiores (16). É também uma das complicações mais comuns, graves e caras decorrentes da diabetes. A amputação do membro inferior em pessoas com diabetes acontece 10 a 20 vezes mais, comparando com pessoas sem diabetes (35).

As doenças macrovasculares envolvem os grandes vasos sanguíneos, onde se incluem a doença arterial coronária, a doença arterial periférica e doença cerebrovascular (3,36).

Pensa-se que o principal mecanismo patológico das complicações macrovasculares seja a lesão do endotélio vascular. Devido ao metabolismo da glucose estar alterado, dá-se um aumento da produção de ROS e a enzima responsável pela produção de NO é inibida. Estes fatores, em combinação com a resistência à insulina das células endoteliais, resultam nomeadamente, em

disfunção endotelial que se manifesta no aumento da expressão de moléculas de adesão. Outro fator relacionado com desenvolvimento e progressão de complicações macrovasculares, é o comprometimento da função plaquetária, podendo originar um aumento do risco de formação de trombo e progressão da aterosclerose (24).

Níveis elevados de glucose em circulação no sangue e a própria diabetes leva a um risco aumentado de DCV, decorrentes da resistência à insulina, inflamação causada, disfunção endotelial e efeitos negativos da glucose na microvasculatura. As pessoas com diabetes têm duas a três vezes mais probabilidade de vir a desenvolver DCV do que as pessoas sem diabetes. A DCV é a causa mais comum de mortalidade em pessoas com diabetes (36).

Além destas complicações da diabetes, existem outras que não se incluem nas categorias acima referidas, são elas, as doenças periodontais, complicações no parto em mulheres com diabetes gestacional e maior suscetibilidade para desenvolver infeções (16).

A manutenção dos níveis de glucose no sangue, da pressão arterial e níveis de colesterol iguais ou próximos dos parâmetros normais, pode auxiliar a retardar ou mesmo prevenir complicações da diabetes. Daí que, a monitorização regular seja de enorme importância, até porque, este tipo de complicações tem um enorme impacto socioeconómico, tanto nos sistemas de saúde dos países, como também nos doentes e seus familiares (17).

A diabetes tipo 2 é amplamente evitável. Vários fatores de risco, como sobrepeso e obesidade, nutrição e sedentarismo, são modificáveis por meio de estratégias preventivas eficazes e mudanças no estilo de vida. A formação e a acumulação de AGEs desempenham um papel central no dano vascular, como tal, a inibição da formação de AGEs, o bloqueio do sistema AGE-RAGE e a restrição de AGEs oriundos de determinados alimentos, podem também ser novas estratégias terapêuticas nas complicações vasculares da diabetes *mellitus*. O controle eficaz do número crescente de pessoas com diabetes também é uma prioridade em muitos países, geralmente envolvendo uma quantidade considerável de autocuidado. Portanto, o aconselhamento e educação adequados são essenciais para os cuidados primários de pessoas com diabetes (21;30).

1.4. Processo inflamatório e a Diabetes Mellitus

Para que a função celular decorra de forma correta e equilibrada, é necessário um equilíbrio entre as citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias. Na DMT2, este equilíbrio é perturbado devido à destruição e inflamação das células β pancreáticas (37).

Tem sido relatado que a DMT2 é uma manifestação clínica de uma contínua inflamação crônica de baixo grau (38), e que esta inflamação crônica é vista como um fator crucial para o desenvolvimento e progressão da DMT2 (39). A patogênese desta doença parece ser mediada por citocinas, quimiocinas e interleucinas que provocam uma resposta inflamatória e imune (37).

O processo inflamatório consiste numa cascata de acontecimentos induzidos em resposta a diversos estímulos patológicos. A resposta a este processo inflamatório acontece em duas fases: fase aguda que tem a duração de algumas horas e posteriormente a fase crônica (38).

Este processo inflamatório que é desencadeado tem como objetivo a destruição e eliminação dos agentes que estão a prejudicar o sistema, para que, posteriormente, seja restaurada a homeostase (38).

Normalmente, a resposta inflamatória inicia-se com a deslocação dos neutrófilos para o local lesado, sendo que de seguida fagocitam os corpos estranhos e libertam citocinas pró e anti-inflamatórias. Posteriormente, os monócitos são recrutados, diferenciando-se depois em macrófagos (7). Em consequência da destruição e inflamação das células β pancreáticas, várias citocinas, quimiocinas e interleucinas estão envolvidas no desenvolvimento da DMT2, originando respostas inflamatórias e imunitárias, através de mediadores de inflamação como fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interleucina 1 beta (IL-1 β), IL-6, interleucina 18 (IL-18), e pensa-se que a interleucina 10 (IL-10) e algumas quimiocinas estejam relacionadas com a causa da DMT2 (37).

A resistência à insulina está habitualmente presente durante a progressão de pré-diabetes para DMT2. Os principais mecanismos que explicam a resistência à insulina e a disfunção das células β em pessoas com DMT2 são o *stress* oxidativo, *stress* do retículo endoplasmático (RE), a deposição de amiloide no

pâncreas (amiloidose), deposição ectópica de lípidos no músculo, fígado e pâncreas, glucotoxicidade e lipotoxicidade. No entanto, pensa-se que estes mecanismos, exceto a deposição amiloide, tenham um papel relevante na resistência à insulina e na secreção deficiente de insulina pelas células β pancreáticas, induzindo uma resposta inflamatória. O envolvimento patológico do sistema imunitário está implicado na DMT2, e por isso, a patogênese desta doença pode ser vista como uma doença autoinflamatória (40).

Tem sido descrito que indivíduos com DMT2, apresentam níveis elevados de proteínas de fase aguda, ácido siálico, citocinas, quimiocinas. Além do mais, níveis elevados de IL-1 β , IL-6 e de proteína C reativa (PCR) têm sido referidos como preditores da DMT2. Na obesidade e pré-diabetes, as concentrações séricas do antagonista do recetor da interleucina-1 (IL-1RA) encontram-se elevadas, revelando um aumento acelerado antes do início da DMT2. A expressão deste antagonista (IL-1RA) é induzida pelo IL-1 β e reflete a resposta do organismo para contrabalançar o aumento da atividade de IL-1 β . É de relevar o nível de PCR, que é atualmente o melhor biomarcador para doença cardiovascular relacionada com a DMT2 (40). Recentemente, os rácios

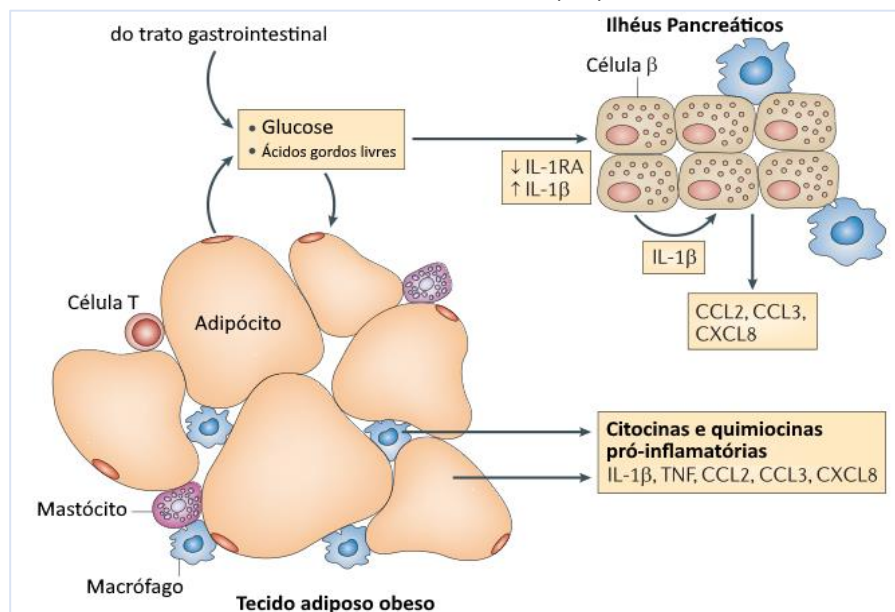


Figura 3. Desenvolvimento do estado de inflamação na DMT2. Níveis excessivos de nutrientes, nomeadamente glucose e ácidos gordos livres, irão causar *stress* nos ilhéus pancreáticos e tecidos sensíveis à insulina como é o caso do tecido adiposo (e o fígado e músculos, não evidenciados na figura), levando à produção e libertação de citocinas e quimiocinas no local. Estes fatores incluem IL-1 β , TNF, ligante 2 de quimiocina CC (CCL2), (CCL3) e ligante 8 de quimiocina CXC (CXCL8). Para além disso, a produção de IL-1RA pelas células β está diminuída. Como tal, as células imunitárias serão recrutadas e contribuirão para a inflamação do tecido. A libertação de citocinas e quimiocinas do tecido adiposo para a circulação sanguínea irá promover a inflamação noutros tecidos, nomeadamente nos ilhéus pancreáticos. [Adaptado de (40)].

neutrófilos/linfócitos, monócitos-linfócitos, plaquetas-linfócitos e monócitos/C-HDL foram sugeridos como potenciais marcadores de respostas inflamatórias, e como tal, têm sido estudados por serem dados de fácil obtenção e de baixo custo (41,42). A relação neutrófilos/linfócitos tem sido a mais investigada, porque os neutrófilos estão associados à inflamação e os linfócitos refletem a via de resposta regulatória imune, por isso tem sido considerado um indicador para inflamação sistêmica (42), e também como um indicador potencial de complicações vasculares em pacientes com diabetes, sendo considerado fator de risco para DCV quando a razão for superior a 3,0 (43). A relação monócitos/C-HDL foi definida recentemente como um novo marcador associado à extensão da inflamação e *stress* oxidativo e também como desfechos cardiovasculares, sendo considerado fator de risco para DCV quando a razão for superior a 8,2 (43,44).

1.5. Processo inflamatório e obesidade

Parece haver um consenso de que o tecido adiposo e as células musculares e pancreáticas são locais de inflamação na presença de obesidade e DMT2 e que essas células são muito importantes na produção de citocinas pró-inflamatórias (45).

A obesidade é considerada um dos principais fatores associados à DMT2 (46). O tecido adiposo é composto por tecido adiposo visceral e tecido adiposo subcutâneo. Diversas moléculas bioativas são secretadas pelo tecido adiposo, nomeadamente, as adipocinas (citocinas), que comunicam com outros órgãos e tecidos, regulando a ingestão energética, sensibilidade à insulina e também a inflamação (47). Em condições fisiológicas normais, os adipócitos secretam maioritariamente adipocinas anti-inflamatórias, tais como, adiponectina, fator de transformação do crescimento beta (TGF- β), IL-10 e óxido nítrico, que têm efeitos protetores a nível cardiovascular e são antiaterogénicos, para além de promoverem a sensibilidade à insulina. Todavia, quando estamos perante um caso patológico como a obesidade, os adipócitos produzem e secretam adipocinas pró-inflamatórias, são exemplos, o TNF- α , IL-6, IL-18, leptina e resistina. A obesidade visceral está fortemente relacionada com o

desenvolvimento de risco cardiovascular, nomeadamente a resistência à insulina, dislipidemia aterogénica e hipertensão, com a produção de adipocinas pró-inflamatórias. Por outro lado, a deposição de gordura subcutânea tem um efeito protetor em relação ao risco de DCV e liberta adipocinas anti-inflamatórias (48).

Pessoas com DMT2 apresentam uma ativação crónica do sistema imunitário nos ilhéus pancreáticos e nos tecidos sensíveis à insulina. Isto decorre de uma resposta patológica à supernutrição e da inexistência de atividade física, que se pode observar em indivíduos geneticamente predispostos (49).

1.6. Doença Cardiovascular e a Diabetes *Mellitus* tipo 2

A diabetes *mellitus* é considerada uma doença metabólica com consequências vasculares devido a uma aceleração dos processos ateroscleróticos. O risco cardiovascular em pessoas com diabetes *mellitus* está aumentado, podendo variar entre 1,7 e 4,5 em homens e entre 1,8 e 9,5 em mulheres, comparando com homens e mulheres sem diabetes *mellitus*. O risco cardiovascular está relacionado com diversos fatores que são mais comuns em pessoas com DMT2 comparando com a população em geral, nomeadamente o sedentarismo, obesidade, dislipidemia e hipertensão (50).

A doença cardiovascular é, por isso, uma comorbilidade muito comum da DMT2 e a sua prevalência tem aumentado ao longo dos últimos anos. Além disso, é uma das principais causas de morte e de incapacidade em pessoas com DMT2 (51). A taxa de incidência anual de DMT2 por 1000 indivíduos nos Estados Unidos da América aumentou de 3,0 na década de 1970 para 5,5 na primeira década dos anos 2000 (52).

Vários estudos têm indicado que o *stress* oxidativo, a inflamação vascular e a disfunção endotelial, que são fatores fisiopatológicos relacionados com a DMT2, podem contribuir para o desenvolvimento de DCV. As pessoas com DMT2 têm maior carga de placa aterosclerótica, maior volume de ateroma e menor diâmetro luminal das artérias coronárias, relativamente a pessoas não diabéticas. Verifica-se uma relação linear entre a HbA1c e a doença macrovascular, havendo um

risco aumentado de eventos cardiovasculares adversos entre 11% e 16% por cada 1% de aumento da HbA1c (50).

A hiperglicemia, a resistência à insulina, a dislipidemia, a inflamação, o *stress* oxidativo, a disfunção endotelial, a hipercoagulabilidade e a calcificação vascular são fatores que contribuem para o risco cardiovascular aumentado na DMT2 (50).

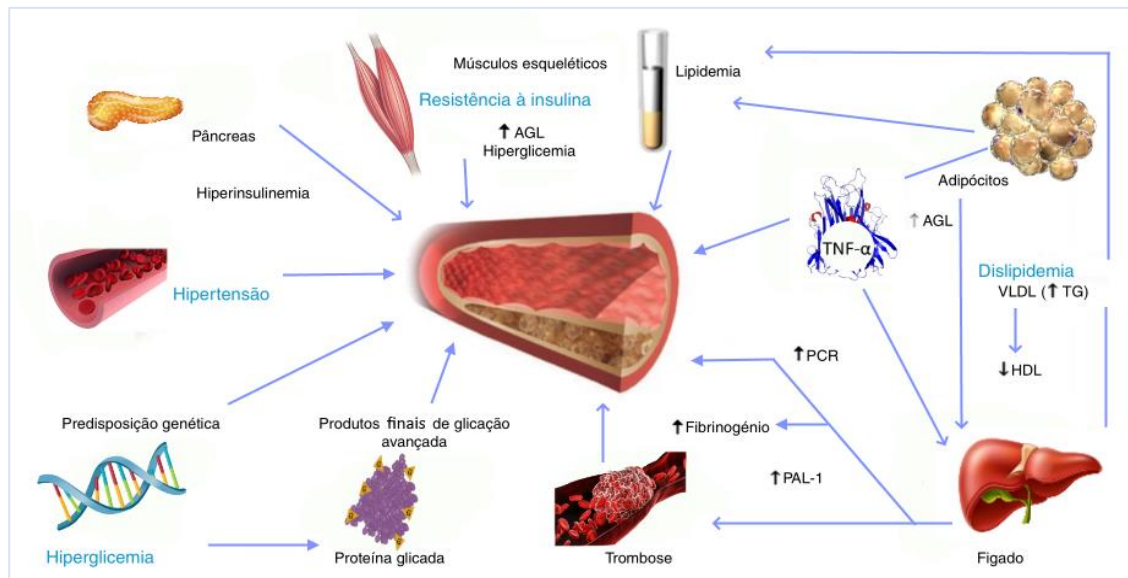


Figura 4. Fatores que contribuem para o risco cardiovascular aumentado na diabetes *mellitus* tipo 2. AGL, ácidos gordos livres; HDL, lipoproteínas de alta densidade; LDL, lipoproteínas de baixa densidade; PAI-1, inibidor do ativador do plasminogênio tipo 1; PCR, proteína C-reativa; TG, triglicéridos; TNF- α , fator de necrose de tumoral alfa; VLDL, lipoproteínas de muito baixa densidade. [Adaptado de (50)].

Tem sido sugerido que a resistência à insulina está associada a uma maior incidência de hipertensão, dislipidemia e a uma diminuição da tolerância à glucose, contribuindo para o processo aterosclerótico e por conseguinte o desenvolvimento de DCV. A resistência à insulina está relacionada com o aumento dos níveis de ácidos gordos livres no plasma em pessoas com DMT2, levando ao aumento da produção hepática de glucose e de insulina, e ao aumento das reservas de triglicéridos (50).

O risco aumentado de sofrer um evento cardiovascular está relacionado com marcadores e mediadores inflamatórios, nomeadamente, a IL-6 e PCR. Uma das relações que tem sido estabelecida em vários estudos, assenta na associação entre estes mediadores inflamatórios, deduzindo que níveis aumentados de

interleucina-1 (IL-1), IL-6 e PCR, poderão ser um dos indicadores preditivos mais relevantes na progressão de DMT2. Dada a produção de IL-1 β a partir das células β pancreáticas que levam à sua apoptose, a DMT2 poderá porventura ser definida como uma forma de doença crónica autoinflamatória (50).

O endotélio desempenha uma função importante na regulação do tónus muscular e na estrutura vascular, através da libertação equilibrada de fatores de contração e relaxamento. Na presença de DMT2, este equilíbrio é alterado, conduzindo a alterações na parede vascular devido à disfunção endotelial, *stress* oxidativo, hiper-reatividade plaquetária e inflamação (2). A disfunção endotelial significa por isso, uma incapacidade do endotélio em regular a homeostase vascular (53). A disfunção endotelial leva à adesão de plaquetas e leucócitos, a trombose e inflamação. Quando existem níveis elevados de glucose, a biodisponibilidade de óxido nítrico (responsável pela vasodilatação do endotélio) situa-se em estado reduzido e como tal, ocorre comprometimento da vasodilatação. Tem sido descrito que condições de hiperinsulinemia e hiperglicemia contribuem para um aumento em circulação do fator tecidual, demonstrando deste modo, o risco de trombose mais elevado em pessoas com diabetes. Um dos fatores de aceleração da calcificação vascular é a hiperglicemia. O risco de aterotrombose é mais elevado em indivíduos com diabetes, devido aos índices de calcificação arterial serem mais elevados, quando comparado com indivíduos sem a presença desta patologia (50).

A inflamação, diabetes e doenças cardiovasculares estão relacionadas através de uma série de mecanismos fundamentais de inflamação, *stress* oxidativo e disfunção endotelial (54).

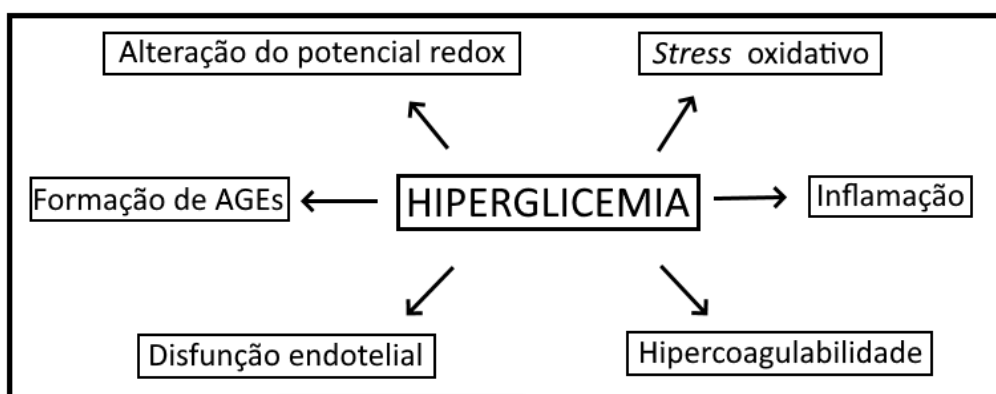


Figura 5. Mecanismos envolvidos no desenvolvimento de complicações vasculares na diabetes *mellitus*. [Adaptado de (83)].

1.7. Anemia e a progressão de Diabetes *Mellitus* para doença cardiovascular

A anemia consiste numa condição na qual os eritrócitos estão em número insuficiente para fazer face às necessidades fisiológicas do organismo, e que irá, conseqüentemente, interferir na capacidade de transporte de oxigênio. Trata-se de uma complicação comum na diabetes *mellitus* e o risco de anemia em pessoas diabéticas é cerca de duas a três vezes maior do que em pacientes sem esta patologia. A etiologia da anemia na diabetes é multifatorial e inclui deficiências nutricionais, inflamação, doenças autoimunes, idade avançada, doença vascular periférica, certos medicamentos, alterações hormonais e doença renal. Diversos estudos concluíram que a duração da diabetes e complicações microvasculares (nefropatia, neuropatia e retinopatia diabéticas) estão significativamente associadas à anemia em pacientes com DMT2 (55).

A anemia está associada a um maior risco cardiovascular em indivíduos com diabetes *mellitus* tipo 2 (56). A anemia contribui para o desenvolvimento e progressão das complicações micro e macrovasculares da diabetes, causando um impacto negativo na esperança e qualidade de vida do paciente, e tem ainda uma grande importância como fator de risco cardiovascular relacionado com a doença renal (55,57).

Têm sido sugeridos diversos fatores como responsáveis para o início precoce da anemia em pacientes diabéticos, nomeadamente, neuropatia autónoma sintomática que causa denervação simpática eferente do rim; danos no interstício renal; produção de eritropoietina afetada; inflamação sistémica; e inibição da libertação de eritropoietina (57).

A diabetes *mellitus* está relacionada com diversas alterações hematológicas que afetam os eritrócitos. A hiperglicemia crónica, típica da diabetes *mellitus*, provoca o desenvolvimento de uma condição inflamatória causada pelo aumento da expressão de citocinas pró-inflamatórias, nomeadamente, a IL-1, IL-6, TNF- α e fator de transformação de crescimento beta (TGF- β), que induzem o aparecimento de complicações micro e macrovasculares, doença renal e anemia (58). Níveis elevados de IL-6 circulante promovem um efeito antieritropoiético, altera a sensibilidade das células progenitoras à eritropoietina, promove a

apoptose dos eritrócitos imaturos, causando a diminuição do número de eritrócitos em circulação (59,60). Além disto, a hiperglicemia crónica da diabetes pode resultar em eritrócitos anormais, stress oxidativo e denervação simpática eferente do rim associada à neuropatia autónoma sintomática. Estas razões promovem um ambiente hipóxico no interstício renal, causando o comprometimento na produção de eritropoetina pelos fibroblastos peritubulares renais, e conseqüentemente, como o nível de eritropoetina é reduzido, leva ao estado de anemia em pacientes com diabetes *mellitus* (58).

Níveis persistentemente elevados de glucose no sangue leva a formação de RAGE e hiperatividade associada a um elevado risco de complicações vasculares. A interação do RAGE com os seus ligantes pode resultar na ativação de diversas vias de sinalização, que por sua vez, podem aumentar a secreção de citocinas pró-inflamatórias como a IL-6 e o TNF- α em indivíduos com DMT2 (61).

De notar que, com o desenvolvimento da diabetes *mellitus*, pode surgir a nefropatia que compromete ainda mais a produção renal de eritropoietina, piorando o quadro anémico. O facto de a função renal estar diminuída e a secreção de citocinas pró-inflamatórias estar aumentada, são dois fatores importantes para a redução dos níveis de hemoglobina. Nestes pacientes, existe uma condição inflamatória que é criada pela doença renal e tal, interfere na absorção intestinal de ferro e na mobilização das suas reservas. Assim, os indivíduos diabéticos que sofram de doença renal terão maior risco de desenvolver anemia (59).

De facto, uma condição anémica em indivíduos com diabetes afeta negativamente a sua saúde, agravando o risco cardiovascular e causando danos em órgãos-alvo devido ao ambiente hipóxico, como a nefropatia, neuropatia e retinopatia diabéticas, daí a importância de se avançar com o tratamento da anemia assim que é diagnosticada (58,59).

1.8. Nutrigenética e a DMT2

A nutrigenética estuda, com base na análise de polimorfismos genéticos, o efeito que as variações genéticas individuais têm na resposta à ingestão alimentar e a sua influência no estado de saúde e risco de aparecimento de doenças (62). Ou seja, a nutrigenética debruça-se sobre a forma como a composição genotípica de um indivíduo influencia a resposta fenotípica aos hábitos alimentares (63).

Vários estudos referem que muitas das variantes genéticas associadas à DMT2 estão localizadas em genes relacionados com a via de secreção de insulina, sinalização de insulina, disfunção das células β pancreáticas e resistência à insulina (64). Embora ainda sejam necessárias pesquisas mais específicas, vários estudos concluem que fazer uso da nutrigenética poderá ser uma mais valia para prevenir eventuais riscos genéticos pré-existentes, de modo a diminuir a suscetibilidade a doenças relacionadas com o estilo de vida, como é o caso da diabetes *mellitus* tipo 2 (65).

1.9. Variantes genéticas polimórficas

Variações na sequência de DNA que são herdadas e ocorrem na população com uma frequência superior a 1%, designam-se por polimorfismos genéticos. Dependendo da posição no genoma, é possível observar-se diferentes efeitos no fenótipo. Pode acontecer existir uma substituição num único par de bases, designado por polimorfismo de nucleótido único (SNP), sendo estes tipos de polimorfismos os mais comuns. Normalmente, ocorrem em áreas que cercam genes codificadores de proteínas, essenciais para a ligação do microRNA e regulação da expressão génica, em sequências de codificação, intrões ou regiões intergénicas (66,67).

Este tipo de polimorfismos genéticos pode levar a algumas alterações, bem como alterar a expressão génica e a função da proteína quando um aminoácido é alterado, tornando o gene mais ou menos ativo, ou seja, podem não ser capazes de causar diretamente doença, mas podem levar a uma maior propensão para desenvolver a doença. Estas variantes genéticas podem ter um papel relevante em doenças, como diabetes, doença de Crohn, doença

coronária, doença celíaca, esclerose múltipla e degeneração macular. Os SNPs são utilizados como assinaturas genéticas em populações com o intuito de se estudar a predisposição a certas situações, incluindo doenças (66,68).

1.9.1. Gene da Interleucina-6 (IL-6)

O gene IL-6 localiza-se no cromossoma 7, região 15.3 (7p15.3), sendo constituído por seis exões e quatro intrões (**Fig. 6**). O SNP do promotor do gene da IL-6 em estudo é rs1800795 que se localiza na posição -174.

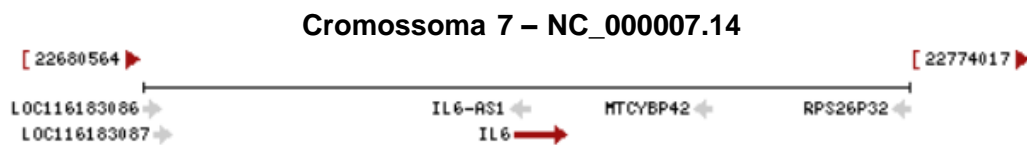


Figura 6. Localização do gene IL-6. [Adaptado do site (69)].

A IL-6 é uma citocina que atua como pró-inflamatória. É secretada por células T e macrófagos e estimula a resposta imune levando à inflamação (54). É uma citocina pleiotrópica, ou seja, pode ter ação pró-inflamatória como anti-inflamatória e desempenha um papel relevante de defesa do organismo. Na presença de infeções ou lesões nos tecidos, esta interleucina contribui para a eliminação dos agentes infecciosos e para a restauração dos tecidos danificados através da ativação de respostas imunológicas, hematológicas e de fase aguda. Assim que a homeostase é atingida, a síntese de IL-6 é reduzida e a concentração sérica é normalizada. Porém, a produção persistente e descontrolada de IL-6 origina uma situação patológica no desenvolvimento de diversas doenças inflamatórias crónicas e cancros (70). Níveis elevados de IL-6 têm sido associados a obesidade e deposição de gordura visceral, ao aumento do risco de intolerância à glucose, DM2 e pressão arterial elevada. O tecido adiposo visceral secreta duas a três vezes mais esta citocina do que o tecido subcutâneo, secretando também outras moléculas que levam ao aumento da expressão de IL-6 (71). O facto de IL-6 estar presente nos tecidos é uma consequência normal, no entanto, a sua produção irregular leva a inflamação de baixo grau, estando fortemente ligada a vários tipos de doenças inflamatórias. A

IL-6 tem também um papel importante no desenvolvimento da resistência à insulina, por estar envolvida na indução de inflamação tecidual de baixo grau nos ilhéus pancreáticos, prejudicando a secreção de insulina (72). É também uma citocina relevante para doenças cardiovasculares (73). Indivíduos com DMT2 e aterosclerose, apresentam níveis de IL-6 mais elevados do que os indivíduos sem diabetes (74).

O SNP que se localiza na posição -174 dentro do promotor da IL-6 está relacionado com a presença de dois alelos, G e C, verificando-se que o alelo G tem maior frequência do que o alelo C (75).

A nível mundial, a frequência dos genótipos deste polimorfismo rs1800795 de IL-6 -174 GC é de 76,6% para o genótipo GG, de 18,6% para o genótipo GC e de 4,8% para o genótipo CC. Na Europa, a frequência do genótipo GG é de 36,0%, do genótipo GC é de 44,9% e por último, 19,1% para o genótipo CC (75).

Numa meta-análise realizada em 2006, com dados de adultos com DMT2 (n=4.746) e controlos não diabéticos (n=16.230), refere o papel causal da citocina IL-6 -174 GC no desenvolvimento de DMT2, os autores observaram que o polimorfismo IL-6 -174 GC estava associado à DMT2 e que os genótipos GC e CC do polimorfismo rs1800795 da IL-6 estavam associados a uma redução do risco de DMT2, cerca de 9%, em comparação com indivíduos com o genótipo GG selvagem. Assim, os autores concluíram que os indivíduos portadores do alelo C tinham menor probabilidade de vir a desenvolver DMT2 (76).

Num estudo publicado em 2014 por Papaoikonomou S, Tousoulis D, Tentolouris N, *et al.* (74), que teve como objetivo avaliar a associação do polimorfismo rs1800795 da IL-6 na prevalência de alguma doença macrovascular em pacientes com DMT2, foram incluídos participantes adultos caucasianos com DMT2 e macroangiopatia (n=208) e sem macroangiopatia (n=203). Os autores concluíram que os indivíduos portadores do alelo C do polimorfismo rs1800795 da IL-6 apresentaram menor probabilidade de sofrer complicações macrovasculares, comparando com genótipo GG. Concluíram também que existiu uma estreita associação entre polimorfismos inflamatórios e complicações macrovasculares em indivíduos diabéticos (74).

Em 2015, num estudo realizado por Buraczynska M, *et al.* em adultos com DMT2 (n=1.090) e um grupo controlo saudável (n=612), com o objetivo de avaliar a associação entre o polimorfismo -174 do gene da IL-6 e o risco cardiovascular em pacientes com DMT2, foi demonstrado pelos autores que as pessoas com DMT2 portadores do genótipo CC do polimorfismo rs1800795 da IL-6 tinham um risco de quase 5 vezes superior de desenvolver DCV (73).

Em 2016, Lu QK, *et al.*, investigaram uma possível associação do polimorfismo -174 do gene da IL-6 com a retinopatia diabética numa população chinesa, tendo sido concluído que o polimorfismo -174 do gene da IL-6 era mais frequente nos participantes com retinopatia diabética. Concluíram também que a presença do polimorfismo -174 do gene da IL-6 pode representar um risco relativamente alto para pacientes com DMT2 e retinopatia diabética em estado avançado (77).

Em 2019, Chen B, *et al.*, realizaram uma meta-análise com objetivo avaliar a relevância de polimorfismos frequentes da IL-6 na suscetibilidade para a nefropatia diabética, sendo um dos polimorfismos estudados o -174 GC do gene da IL-6. Neste trabalho, os autores concluíram que esse polimorfismo desempenhava um papel importante no desenvolvimento da nefropatia diabética. Revelando que o alelo C do polimorfismo estava relacionado com a diminuição do risco de nefropatia diabética, podendo ter por isso, um efeito protetor. Os autores sugeriram ainda que o polimorfismo -174 GC da IL-6 poderia ser considerado um bom indicador para a previsão do risco de nefropatia diabética, acrescentando que o alelo G possivelmente estaria relacionado com a patogénese desta doença (78). Já em outra meta-análise do mesmo ano, foram incluídos 1.203 indivíduos adultos com DMT2 e nefropatia diabética e 1.571 controlos com DMT2 sem nefropatia diabética. Os autores concluíram que o polimorfismo -174 GC da IL-6 estava associado ao risco de nefropatia diabética em indivíduos com DMT2, sendo que o alelo G contribuiu para o aumento do risco de nefropatia diabética, sugerindo que estes resultados poderiam ser úteis para a identificação precoce de pacientes de alto risco para desenvolver esta patologia (79).

Recentemente, em 2021, foi realizada uma meta-análise e revisão sistemática, conduzida por Salari N, *et al.* com o objetivo de investigar a relação entre polimorfismos do gene da IL-6, nomeadamente do polimorfismo -174 GC do

gene da IL-6 e a doença arterial coronária. Esta meta-análise incluiu indivíduos adultos com doença arterial coronária e adultos sem esta patologia. Os autores concluíram que existia uma relação entre o genótipo GC do polimorfismo e a doença arterial coronária, sendo que o genótipo GG teve um efeito protetor, ou seja, pessoas com este genótipo tiveram menos 20% de probabilidade de apresentar esta patologia. Verificou-se também que indivíduos com genótipo GC tinham maior risco de vir a desenvolver esta doença, sendo 16% mais propensos a ter esta doença. Foi também verificado que pessoas com o genótipo CC tiveram um efeito crescente na probabilidade de desenvolver esta doença. Concluiu-se que o alelo C representava um fator de risco para doença arterial coronária (80). Numa outra meta-análise e revisão sistemática publicada no mesmo ano, em indivíduos adultos (de ascendência europeia, do Médio Oriente, asiática, indiana, africana e mista) com doença arterial coronária e respetivos controlos, os autores concluíram que existia uma associação significativa do polimorfismo -174 GC do gene da IL-6 com a doença arterial coronária. No entanto, acrescentaram que estes resultados foram impulsionados principalmente por estudos com participantes de ascendência asiática e indiana. Em estudos com participantes de ascendência europeia ou do Médio Oriente, não foi observada a mesma associação. Ainda assim, em portadores do alelo C no grupo controlo, pareceu haver níveis plasmáticos significativamente mais elevados de IL-6, o que pode explicar parte da associação entre este polimorfismo e doença arterial coronária (81).

1.9.2. Gene do Fator de necrose tumoral alfa (TNF- α)

O gene TNF- α localiza-se no cromossoma 6, região 21.33 (6p21.33), sendo constituído por quatro exões e três intrões (**Fig. 7**). O SNP do promotor do gene TNF- α em estudo é rs361525 que se localiza na posição -238.

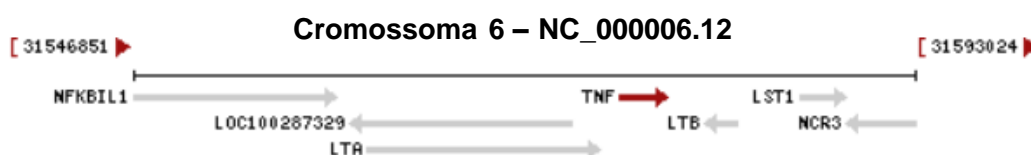


Figura 7. Localização do gene TNF- α . [Adaptado do site (82)].

O TNF- α , pertencente à superfamília dos fatores de necrose tumoral, é uma citocina com ação pró-inflamatória e faz parte de um grupo de citocinas que estimulam a reação de fase aguda (54,83). É produzida principalmente por macrófagos, mas é também produzida por neutrófilos, células NK (*natural killer*). Esta citocina desempenha funções em diversos processos biológicos, tais como proliferação celular, diferenciação, apoptose, metabolismo lipídico, coagulação e inflamação. Está relacionada com diversas doenças, nomeadamente doenças autoimunes, resistência à insulina, cancro, entre outras (82,83).

Esta citocina induz uma resposta inflamatória no local da infeção, dando início a uma cascata de citocinas e ao aumento da permeabilidade vascular através do recrutamento de macrófagos e neutrófilos (83).

O polimorfismo de nucleótido único localiza-se na posição -238 dentro do promotor da TNF- α e está relacionado com a presença de dois alelos, o G e o A, verificando-se que o alelo G tem maior frequência que o alelo A (84).

Ao nível global, a frequência dos genótipos deste polimorfismo rs361525 de TNF- α -238 GA é de 88,3% para o genótipo GG, de 11,2% para o genótipo GA e 0,5% para genótipo AA. Na Europa, a frequência do genótipo GG é de 87,7%, do genótipo GA é de 11,9% e por último, 0,4% para o genótipo AA (84).

Uma meta-análise de 2009 levada a cabo por Feng R, *et al*, realizada em 2.106 participantes diabéticos e 2.920 controlos não diabéticos com o objetivo de verificar a existência de associação entre o polimorfismo rs361525 de TNF- α -238 GA e o risco de DMT2, não foi possível associar o risco de DMT2 com o polimorfismo rs361525 de TNF- α (85).

Em 2012, foi demonstrado por Elmarakby AA, Sullivan JC. que o aumento dos níveis urinários de TNF- α antecede o aumento da albuminúria na diabetes e que os níveis urinários desta citocina aumentam com a evolução da nefropatia diabética, sugerindo que níveis elevados de TNF- α podem contribuir para o desenvolvimento e progressão da lesão renal em doentes diabéticos (86).

Recentemente (2019), foi realizada outra meta-análise por Guo X, *et al.*, em indivíduos adultos com diabetes *mellitus* tipo 2 (n=4.935) e respetivos controlos (n=5.260) de várias etnias, com o objetivo de estudar a existência de associação

entre o polimorfismo rs361525 de TNF- α -238 GA e suscetibilidade a DMT2. Os resultados mostraram que o polimorfismo rs361525 de TNF- α não estava associado à DMT2 nos grupos populacionais estudados, necessitando de mais pesquisas (87).

1.9.3. Gene do Recetor para produtos finais de glicação avançada (RAGE)

O gene RAGE localiza-se no cromossoma 6, região 21.32 (6p21.32), sendo constituído por onze exões (**Fig. 8**). O SNP do promotor do gene RAGE em estudo é rs1800624 que se localiza na posição -374.

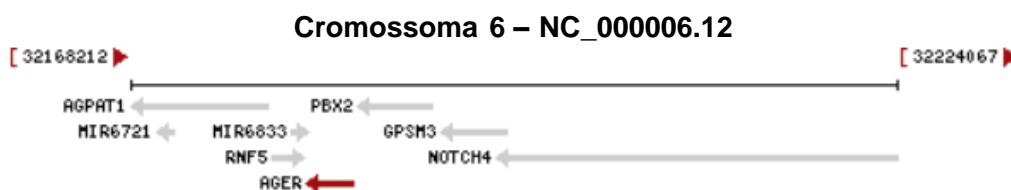


Figura 8. Localização do gene RAGE. [Adaptado do site (88)].

O RAGE pertence à superfamília de imunoglobulinas de recetores de superfície celular e trata-se de um recetor multifuncional, que se liga a *Advanced glycation end-products* e a outras moléculas envolvidas na homeostase, desenvolvimento da inflamação e em algumas doenças, nomeadamente, na diabetes (88,89). Em condições fisiológicas ditas normais, o RAGE é produzido em baixos níveis por monócitos, células endoteliais, células musculares lisas e células epiteliais glomerulares (90).

Em doentes diabéticos, foram identificados níveis aumentados de RAGE nas células mesangiais glomerulares, na retina e em vasos da aorta, em simultâneo com a acumulação de AGEs (14).

Foram identificados níveis aumentados de RAGE em locais envolvidos em complicações cardiovasculares resultantes da diabetes, derivado dos níveis elevados de AGEs em circulação. A relação entre AGE e RAGE, como testemunhado em situação de diabetes, origina um estado pró-trombótico e pré-adetivo ao nível do endotélio (14).

Ao nível global, a frequência dos genótipos deste polimorfismo rs1800624 de RAGE -374 TA é de 73,7% para o genótipo AA, de 22,6% para o genótipo TA e 3,7% para genótipo TT. Na Europa, a frequência do genótipo AA é de 55,8%, do genótipo TA é de 38,4% e por último, 5,8% para o genótipo TT (91).

Em condições de aterosclerose e em especial, de complicações da diabetes, RAGE funciona como um mediador da inflamação vascular aguda e crónica. A sinalização de AGE/RAGE tem um papel relevante na regulação da produção/expressão de TNF- α , do stress oxidativo e disfunção endotelial na DMT2 (92).

Num estudo realizado em 2001 por Hudson BI, *et al.* (14) com participantes com DMT2 e retinopatia diabética (n=5.106), participantes com DMT2 sem retinopatia diabética (n=5.109) e controlos sem diabetes (n=5.113), os autores concluíram que a prevalência do polimorfismo RAGE -374 TA não apresentava diferenças significativas entre os grupos, embora existisse uma tendência para um aumento da frequência do alelo A no grupo com retinopatia diabética (14).

Em outro trabalho realizado 6 anos depois, por Picheth G, *et al.* (93), em 98 pacientes com DMT2 e 148 pacientes sem DMT2, em que foi avaliada a associação do polimorfismo RAGE -374 TA com a gravidade da doença arterial coronária. Os autores verificaram que o genótipo AA teve um efeito protetor na doença cardíaca coronária em indivíduos com DMT2 (93).

Já numa meta-análise realizada por Lu X, Feng B (90) em 2010, baseada em adultos de diferentes etnias (caucasiana, asiática e africana), dos quais 3.799 com DMT2 e angiopatia (retinopatia diabética, nefropatia diabética ou doença macrovascular) e 4.899 controlos com DMT2 sem complicações, os autores observaram que existia uma associação entre o genótipo AA do polimorfismo RAGE -374 TA com a redução de 30% no risco de complicações cardiovasculares resultantes da diabetes, em comparação com os restantes dois genótipos, concluindo, assim, que o alelo A teria um potencial efeito protetor para complicações vasculares diabéticas, especialmente em descendentes caucasianos e em doenças macrovasculares (90). Está também descrita na literatura científica, outra meta-análise realizada em 2017, com o objetivo de estudar uma possível associação entre o polimorfismo RAGE -374 TA e o risco

de retinopatia diabética, tendo sido sugerido pelos autores que o alelo A do polimorfismo RAGE -374 TA acarreta um risco moderadamente aumentado para retinopatia diabética em pacientes com DMT2 (94).

1.9.4. Gene da Heme oxigenase-1 (HMOX-1)

O gene da HMOX-1 localiza-se no cromossoma 22, região 12.3 (22q12.3), sendo constituído por cinco exões (**Fig. 9**). O SNP do promotor do gene HMOX-1 em estudo é rs2071746 que se localiza na posição -413.

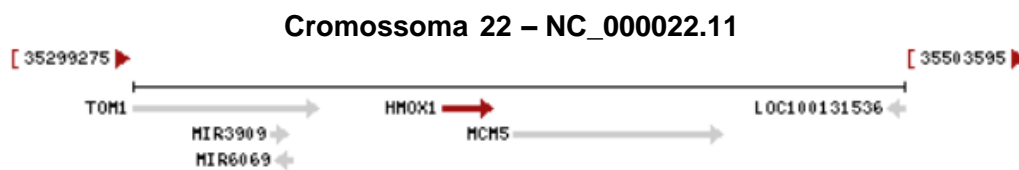


Figura 9. Localização do gene HMOX-1. [Adaptado do site (95)].

A HMOX-1 pertence à família da heme oxigenase, é uma enzima essencial para o catabolismo do heme, faz a clivagem do grupo heme para formar biliverdina, sendo posteriormente convertida em bilirrubina através da biliverdina redutase, monóxido de carbono e ferro (95). Tem um efeito antioxidante e anti-inflamatório. Em condições fisiológicas normais, a atividade da HMOX-1 é superior no baço, onde os eritrócitos senescentes são sequestrados e destruídos. Possui efeitos citoprotetores, porque o excesso de heme livre sensibiliza as células para a apoptose (96).

O *stress* oxidativo causado pela hiperglicemia crónica pode desempenhar um papel fundamental na patogénese da nefropatia diabética. *Reactive oxygen species* podem estimular a expressão de citocinas, lesando podócitos e células mesangiais que são fulcrais para a manutenção da função glomerular. A HMOX-1 é uma enzima chave relativamente a mecanismos citoprotetores contra o *stress* oxidativo no sistema cardiovascular-renal (97).

Ao nível global, a frequência dos genótipos deste polimorfismo rs2071746 da HMOX-1 -413 TA é de 46,2% para o genótipo TA, de 29,7% para o genótipo TT

e 24,1% para genótipo AA. Na Europa, a frequência do genótipo TA é de 50,7%, do genótipo AA é de 30,6% e por último, 18,7% para o genótipo TT (98).

A evidência científica que estuda uma possível associação entre o polimorfismo rs2071746 da HMOX-1 e a DMT2 é escassa, no entanto em 2010, foi realizada uma meta-análise por Bao W., *et al.* (99) em adultos com DMT2 (n=1.751) e seus controlos (n=2.902), com o objetivo de avaliar o risco de ter DMT2 em função do genótipo do polimorfismo rs2071746 da HMOX-1. Verificou-se que os portadores do alelo T apresentavam um maior risco para desenvolver diabetes (99).

Na bibliografia científica é também possível encontrar um estudo efetuado em 2015 por Lee EY, *et al.* (97) com o objetivo de estudar a associação entre o polimorfismo rs2071746 da HMOX-1 e a nefropatia diabética. Nesse trabalho, foram incluídos 536 adultos Sul Coreanos com DMT2, dos quais 239 com albuminúria e 297 sem albuminúria e a presença de albuminúria foi utilizada como marcador de nefropatia diabética. Os autores concluíram que os homens com DMT2, portadores do genótipo TT do polimorfismo rs2071746 da HMOX-1, com diagnóstico de diabetes há mais de 20 anos e com mau controlo glicémico, estão mais suscetíveis a desenvolver albuminúria, com possível evolução para nefropatia diabética quando comparados com outros participantes no estudo (97).

1.9.5. Quadro resumo dos polimorfismos estudados

De seguida, a Tabela 1 apresenta um resumo dos 4 polimorfismos estudados (IL-6 -174 GC, TNF- α -238 GA, RAGE -374 TA e HMOX-1 -413 TA) com a respetiva alteração nucleotídica, qual o alelo e possível efeito dessa variação alélica e a percentagem do alelo menos frequente.

Tabela 1. Tabela resumo sobre os polimorfismos estudados.

Gene	Alteração nucleotídica	Alelo e possível efeito da variação alélica	Percentagem do alelo menos frequente
IL-6	-174 G/C; Substituição de uma guanina (G) por uma citosina (C), na posição -174	Alelo C – Expressão diminuída do gene IL-6	41,5% (C) (100)
TNF-α	-238 G/A; Substituição de uma guanina (G) por uma adenina (A), na posição -238	Alelo A – Expressão aumentada do gene TNF- α	6,4% (A) (101)
RAGE	-374 T/A; Substituição de uma timina (T) por uma adenina (A) na posição -374	Alelo A – Expressão aumentada do gene RAGE	25,0% (T) (102)
HMOX-1	-413 T/A; Substituição de uma timina (T) por uma adenina (A) na posição -413	Alelo A – Expressão aumentada do gene HMOX-1	44,0% (T) (103)

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Avaliar o contributo da variação genética e de biomarcadores do processo inflamatório na progressão para a doença cardiovascular em pessoas com DMT2.

2.2. Objetivos Específicos

- Avaliar as frequências na distribuição de quatro variantes polimórficas genéticas das citocinas envolvidas no processo inflamatório;
- Avaliar os níveis sanguíneos dos biomarcadores bioquímicos e celulares associados ao processo inflamatório e *stress* oxidante na DMT2;
- Estudar a associação das variantes polimórficas genéticas com os níveis circulantes de biomarcadores do processo inflamatório e a progressão para a doença cardiovascular em pessoas com DMT2.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Caracterização da Amostra Populacional

Os resultados do presente estudo foram baseados nos resultados do projeto “Hábitos alimentares, hiperhomocisteinémia e doença cardiovascular na diabetes tipo 2” (104), financiado pela Fundação para a Ciência e Tecnologia com a referência PIC/IC/82957/2007. A amostra foi constituída por 148 adultos portugueses com diabetes tipo 2. Os participantes foram categorizados de acordo com dois grupos: grupo I (n=75) – diabéticos do tipo 2 com angiopatia; e grupo II (n=73) – diabéticos do tipo 2 sem angiopatia. Os dados bioquímicos foram obtidos apenas para 130 participantes. Em relação aos polimorfismos genéticos estudados, o tamanho amostral foi o seguinte: IL-6: n=92; TNF- α : n=72; RAGE: n=45; HMOX-1: n=57. E relativamente às complicações angiopáticas, o tamanho amostral foi: microangiopatia: n=40 (53,3%); macro e microangiopatia: n=25 (33,3%) e macroangiopatia: n=10 (13,4%).

3.2. Critérios de inclusão

Os critérios de inclusão foram: a) ambos os géneros; b) 40-75 anos; c) caucasianos; d) presença de DMT2 diagnosticada há pelo menos 1 ano; e) assinar o consentimento informado; e um critério de inclusão adicional para o grupo I que foi a presença de pelo menos uma das seguintes complicações angiopáticas: acidente vascular cerebral, enfarte agudo do miocárdio, doença vascular periférica ou retinopatia (104).

3.3. Critérios de exclusão

Foi considerado critério de exclusão para o grupo II, a presença de complicações micro- e/ou macroangiopáticas (104).

3.3. Considerações éticas

O presente estudo foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética e Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa.

Todo o trabalho de investigação foi desenvolvido de acordo com as considerações constantes na Declaração de Helsínquia (105).

3.4. Colheita de dados

3.4.1. Colheita de dados Gerais e Bioquímicos

Todos os dados gerais e bioquímicos foram obtidos por consulta da base de dados criada no âmbito do projeto “Hábitos alimentares, hiperhomocisteinémia e doença cardiovascular na diabetes do tipo 2” (104).

3.4.2. Extração de DNA genómico

O DNA genómico foi extraído do sangue total através de um método de extração não enzimático e adaptado do método descrito por Lahiri e Nurnberger (106).

3.4.3. Avaliação da concentração e do grau de pureza do DNA extraído

A avaliação da concentração e do grau de pureza do DNA extraído foram determinadas utilizando NanoDrop® (ND-1000, *Thermo Fisher Scientific Inc.*, Waltham, EUA), usando com referência a solução TE, tendo sido realizadas espectrofotometricamente através da leitura da absorvência a 260 nm e a razão entre a absorvência a 260 e 280 nm, respetivamente.

3.5. Variantes genéticas polimórficas analisadas

Encontram-se descritos na seguinte tabela (**Tabela 2**) os polimorfismos genéticos analisados.

Tabela 2. Polimorfismos genéticos analisados, número rs, localização no cromossoma e respetivas alterações.

Polimorfismo	Número rs	Cromossoma	Alelos
IL-6 -174 G/C	rs1800795	7p15.3	G:C
TNF- α -238 G/A	rs361525	6p21.33	G:A
RAGE -374 T/A	rs1800624	6p21.32	T:A
HMOX-1 -413 T/A	rs2071746	22q12.3	T:A

3.6. Genotipagem dos polimorfismos genéticos

3.6.1. Identificação dos polimorfismos genéticos IL-6 -174 G/C, TNF- α -238 G/A e RAGE -374 T/A

Os polimorfismos IL-6 -174 G/C, TNF- α -238 G/A e RAGE -374 T/A foram determinados por *Endpoint genotyping*, que combina a técnica PCR com um mecanismo de detecção e quantificação por fluorescência. As amostras produzem fluorescência e o termociclador (*LightCycler® 480 Instrument II, 96-multiwell plate, Roche Applied Science, Penzberg, Alemanha*) detecta-a à medida que o DNA vai sendo amplificado, possibilitando o acompanhamento da reação e apresentação dos resultados em tempo real.

Na **Tabela 3** encontram-se descritas as condições a que as sequências de DNA de interesse foram amplificadas e genotipadas e respectivos componentes utilizados no *Endpoint genotyping*.

Tabela 3. Condições de amplificação e genotipagem e respectivos componentes utilizados no *Endpoint genotyping*.

Polimorfismos	Condições	Componentes
IL-6 -174 G/C	Pré-incubação: 95°C, 10 min.	5 ng DNA (50/[DNA]ng/ μ L) + H ₂ O
TNF- α -238 G/A		até 50 μ L
RAGE -374 T/A	40 ciclos	
	Amplificação:	DNA + H ₂ O: 6,75 μ L, 5 ng
	- 95°C, 5s	<i>TaqMan™ Master Mix</i> : 7,5 μ L
	- 60°C, 1min.	<i>TaqMan™ SNP</i> : 0,75 μ L

TaqMan™ SNP diluída 20x.

3.6.2. Identificação do polimorfismo genético HMOX-1 -413 T/A

O polimorfismo genético HMOX-1 -413 T/A foi determinado por PCR-RFLP (*Polymerase chain reaction - Restriction fragment length polymorphism*). Para a realização desta técnica, foi utilizado o termociclador *2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems, Foster City, EUA)*.

Nas **Tabela 4 e 5** encontra-se descrito a sequência de DNA de interesse que foi amplificada e as condições de amplificação e componentes utilizados na reação de PCR, respetivamente.

Tabela 4. Sequência do *primer* utilizado para amplificação dos fragmentos de interesse.

Polimorfismo	Sequência do <i>Primer</i>	Fragmento de amplificação
HMOX-1	<i>Forward</i> 5' – TGATGTTGCCACCCAGGCTT – 3'	290pb
	<i>Direto</i> 5' – TGATGTTGCCACCCAGGCTA – 3'	
	<i>Reverse</i> 5' – GGAGCAGTCATATATGACCCTTGGG – 3'	

pb – pares de bases.

Tabela 5. Condições de amplificação e componentes utilizados na reação de PCR.

Polimorfismo	Condições PCR	Componentes (<i>Thermo Scientific</i> ®)
HMOX-1	Desnaturação inicial: 94°C, 5 min.	200 ng DNA (200/[DNA]ng/μL) + H ₂ O até 10 μL
	28 ciclos:	
	Desnaturação: 94°C, 30 s	DNA: 10 μL, 200 ng
	Emparelhamento: 61°C, 30 s	<i>Primer</i> A: 0,5 μL + <i>Primer</i> R: 0,5 μL ou <i>Primer</i> T: 0,5 μL + <i>Primer</i> R: 0,5 μL
	Extensão: 72°C, 40 s	Green Taq PCR Master Mix: 12,5 μL
1 ciclo		
	Extensão final: 72°C, 10 min.	H ₂ O: 1,5 μL

DreamTaq Green PCR Master Mix (2X) (*Thermo Scientific*™).
Primers A, R e T diluídos 10x.

As quantidades dos componentes referidos na **Tabela 5** foram multiplicadas tendo em conta o número de amostras a analisar em cada uma das vezes.

Os fragmentos de DNA obtidos foram posteriormente submetidos a eletroforese onde foram separados tendo em conta o tamanho (tina de eletroforese *Sub-Cell* GT (*BIO-RAD*, Hercules, EUA) fonte de alimentação *PowerPac 300* (*BIO-RAD*, Hercules, EUA)) em gel de agarose a 2% (m/v) em 100 mL (*SeaKem*® LE Agarose (*Lonza*, Basileia, Suíça)), em tampão TBE (Tris/Borato/EDTA) 1x (GRiSP) e corado com 7,5 μL de brometo de etídio. Após uma corrida de 60

minutos a 120 Volts, as bandas de DNA foram visualizadas através de um transiluminador ultravioleta (*GenoSmart*, VWR, Radnor, EUA).

3.7. Parâmetros bioquímicos e celulares estudados

Os parâmetros bioquímicos e celulares estudados foram os seguintes: HbA1c, glicemia ocasional, eritrócitos, hemoglobina, hematócrito, volume globular médio, hemoglobina globular média, concentração de hemoglobina globular média, plaquetas, leucócitos, neutrófilos, eosinófilos, basófilos, linfócitos, monócitos, neutrófilos/linfócitos, neutrófilos x neutrófilos/linfócitos, monócitos/linfócitos, monócitos/colesterol das lipoproteínas de alta densidade plasmáticas, creatinina, colesterol total, colesterol das lipoproteínas de alta densidade plasmáticas, colesterol das lipoproteínas de baixa densidade plasmática, triglicéridos, proteína C-reativa, MDA e Hcy.

No entanto, apenas os parâmetros bioquímicos e celulares que originaram resultados estatisticamente significativos ou com tendência para ser estatisticamente significativos foram introduzidos no presente trabalho.

A análise dos resultados obtidos foi feita com base no seguinte diagrama (**Fig. 10**) com o objetivo de facilitar o entendimento e significado dos mesmos.

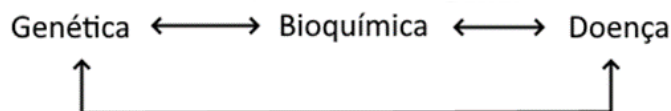


Figura 10 – Diagrama utilizado na análise dos resultados obtidos.

3.8. Análise estatística

Foi construída uma base de dados com todas as variáveis em estudo, onde foi definida a codificação, descrição, valoração e categorização estatística das variáveis. A análise estatística dos dados foi realizada utilizando os softwares informáticos para Windows, SPSS®, versão 26 (SPSS INC, Chicago). Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão (DP) ou como número e percentagem. Relativamente aos polimorfismos estudados, foram avaliados estatisticamente segundo os três modelos: modelo codominante (genótipo), modelo dominante (agrupando o genótipo heterozigoto com o genótipo dominante) e modelo recessivo (agrupando o genótipo heterozigoto com o genótipo recessivo). Foi testada a normalidade de todas as variáveis pela aplicação do teste Kolmogorov-Smirnov. A comparação dos valores médios de variáveis numéricas com distribuição normal foi realizada pela aplicação dos testes de *t-student*. As variáveis qualitativas foram comparadas pela aplicação do teste do Qui-quadrado ou pelo teste exato de *Fisher* e o *Odds Ratio* (OR) foi calculado através de regressão logística binária, com os seus respetivos intervalos de confiança (IC) de 95%. Foram ainda realizadas correlações e considerados apenas os resultados estatisticamente significativos. Os testes foram considerados estatisticamente significativos quando $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1. Caracterização da amostra

As características iniciais da amostra estudada encontram-se descritas na **Tabela 6**. Recorreu-se ao teste *t student* para identificar possíveis diferenças entre os dois grupos para os parâmetros quantitativos, e recorreu-se ao teste qui-quadrado de Pearson para parâmetros qualitativos. Foram incluídos no presente estudo 75 participantes com DMT2 e angiopatia (idade média: $62,9 \pm 7,17$ anos, 52,0% do sexo feminino) e 73 participantes com DMT2 sem angiopatia (idade média: $62,7 \pm 7,07$ anos, 58,9% do sexo feminino). Não foram observadas diferenças significativas para a idade ($p=0,878$), para o sexo ($p=0,398$) e para a pressão arterial diastólica ($p=0,133$). Contudo, os parâmetros IMC, perímetro abdominal e pressão arterial sistólica apresentam uma tendência para serem estatisticamente significativos ($p=0,062$; $p=0,060$; $p=0,051$, respetivamente). Os resultados evidenciam que o tempo de duração da diabetes foi estatisticamente significativo ($p=0,000$) e que o grupo com angiopatia ($19,4 \pm 9,33$ anos) tem em média quase 6 anos a mais de duração da DMT2 do que o grupo sem angiopatia ($13,6 \pm 7,92$ anos). Por último, em relação ao valor médio de PAS, o grupo I ($154 \pm 20,3$ mmHg) teve valores superiores aos do grupo II ($148 \pm 21,0$ mmHg).

Tabela 6. Características iniciais da amostra.

Características	Grupo I (N total=75)	Grupo II (N total=75)	p
Idade (anos) (GI: N=75; GII: N=73)	62,9 ± 7,17	62,7 ± 7,07	0,878*
Sexo			
Masculino	36 (48,0)	30 (41,1)	0,398**
Feminino	39 (52,0)	43 (58,9)	
Duração da diabetes <i>mellitus</i> (anos) (GI: N=74; GII: N=72)	19,4 ± 9,33	13,6 ± 7,92	0,000*
IMC (kg/m²) (GI: N=75; GII: N=73)	31,0 ± 5,47	29,5 ± 3,89	0,062*
Perímetro abdominal (cm) (GI: N=75; GII: N=73)	103 ± 12,6	99,6 ± 11,2	0,060*
PAS (mmHg) (GI: N=74; GII: N=73)	154 ± 20,3	148 ± 21,0	0,051*
PAD (mmHg) (GI: N=74; GII: N=73)	79,2 ± 13,1	82,2 ± 12,8	0,133*

Os resultados estão expressos como número de indivíduos (percentagem) ou média ± desvio-padrão. Grupo I – DMT2 com angiopatia; Grupo II – DMT2 sem angiopatia; DMT2, diabetes *mellitus* tipo 2; IMC, índice de massa corporal; PAS, pressão arterial sistólica; PAD, pressão arterial diastólica; N, número de indivíduos analisados.

*Teste t-student

**Teste qui-quadrado de Pearson.

4.2. Dados bioquímicos e celulares da amostra total

Os dados bioquímicos e celulares da amostra estudada encontram-se descritos na **Tabela 7**. Os dados bioquímicos foram obtidos apenas para 130 participantes.

Tabela 7. Dados bioquímicos e celulares da amostra total.

Parâmetros	Amostra total (N total=130)
HbA1c (%) (N=130)	7,68 ± 1,26
Glicemia ocasional (mg/dL) (N=66)	181 ± 61,3
Eritrócitos (M/μL) (N=130)	4,61 ± 0,52
Hemoglobina (g/dL) (N=130)	13,5 ± 1,58
Hematócrito (%) (N=130)	39,8 ± 4,42
VGM (fl) (N=96)	86,8 ± 3,97
HGM (pg) (N=96)	29,5 ± 1,57
CHGM (g/dL) (N=96)	33,9 ± 1,05
Plaquetas (K/μL) (N=96)	285 ± 85,8
Leucócitos (K/μL) (N=96)	7,68 ± 1,86
Neutrófilos (mm³) (N=96)	3998 ± 565
Linfócitos mm³ (N=96)	2183 ± 542
Monócitos (mm³) (N=96)	414 ± 131
Neutrófilos/Linfócitos (N=96)	2,04 ± 0,92
Neutrófilos X Plaquetas/Linfócitos (N=96)	585 ± 340
Monócitos/Linfócitos (N=96)	0,20 ± 0,08
Monócitos/HDL (N=96)	8,53 ± 4,25
Creatinina (mg/dL) (N=94)	1,02 ± 0,39
CT (mg/dL) (N=127)	181 ± 37,9
C-HDL (mg/dL) (N=127)	14,0 ± 12,6
C-LDL (mg/dL) (N=129)	115 ± 31,4
Triglicéridos (mg/dL) (N=126)	167 ± 93,1
PCR (mg/L) (N=81)	3,88 ± 4,78
Malondialdeído (μmol/L) (N=130)	2,38 ± 0,67
Homocisteína (μmol/L) (N=130)	8,73 ± 4,07

Os resultados estão expressos em média \pm desvio-padrão. Grupo I – DMT2 com angiopatia; Grupo II – DMT2 sem angiopatia; HbA1c, hemoglobina glicada; VGM, volume globular médio; HGM, hemoglobina globular média; CHGM, concentração de hemoglobina globular média; CT, colesterol total; C-HDL, colesterol das lipoproteínas de alta densidade plasmática; C-LDL, colesterol das lipoproteínas de baixa densidade plasmática; PCR, proteína C-reativa; N, número de indivíduos analisados.

4.3. Dados bioquímicos e celulares da amostra por grupos

Os dados bioquímicos e celulares da amostra por grupos estudados encontram-se descritos na **Tabela 8**. Recorreu-se ao teste *t student* para identificar possíveis diferenças entre os dois grupos. Os dados bioquímicos foram obtidos apenas para 130 participantes. Apenas foram observadas diferenças estatisticamente significativas para os parâmetros malondialdeído e homocisteína ($p=0,010$ e $p=0,022$, respetivamente), sendo que o grupo I apresenta níveis mais elevados destes parâmetros relativamente ao grupo sem angiopatia.

Tabela 8. Dados bioquímicos e celulares da amostra por grupos estudados.

Parâmetros	Grupo I (N total=64)	Grupo II (N total=66)	p
HbA1c (%) (GI: N=64; GII: N=66)	8,65 ± 1,45	8,34 ± 1,36	0,218
Glicemia ocasional (mg/dL) (GI: N=30; GII: N=36)	204 ± 72,0	186 ± 61,5	0,302
Eritrócitos (M/μL) (GI: N=64; GII: N=66)	4,58 ± 0,59	4,64 ± 0,44	0,375
Hemoglobina (g/dL) (GI: N=64; GII: N=66)	13,4 ± 1,72	13,7 ± 1,43	0,337
Hematócrito (%) (GI: N=64; GII: N=66)	39,3 ± 4,74	40,3 ± 4,06	0,203
VGM (fl) (GI: N=43; GII: N=53)	86,4 ± 4,19	87,2 ± 3,79	0,376
HGM (pg) (GI: N=43; GII: N=53)	29,5 ± 1,58	29,4 ± 1,58	0,959
CHGM (g/dL) (GI: N=43; GII: N=53)	34,1 ± 0,98	33,8 ± 1,08	0,130
Plaquetas (K/μL) (GI: N=43; GII: N=53)	288 ± 86,1	283 ± 86,2	0,771
Leucócitos (K/μL) (GI: N=43; GII: N=53)	8,06 ± 1,93	7,37 ± 1,77	0,072
Neutrófilos (mm³) (GI: N=43; GII: N=53)	4092 ± 616	3922 ± 515	0,144
Linfócitos (mm³) (GI: N=43; GII: N=53)	2086 ± 583	2261 ± 498	0,115
Monócitos (mm³) (GI: N=43; GII: N=53)	385 ± 80,9	437 ± 157	0,077
Neutrófilos/Linfócitos (GI: N=43; GII: N=53)	2,22 ± 1,02	1,89 ± 0,81	0,109
Neutrófilos X Plaquetas/Linfócitos (GI: N=43; GII: N=53)	631 ± 333	547 ± 344	0,147
Monócitos/Linfócitos (GI: N=43; GII: N=53)	0,20 ± 0,08	0,21 ± 0,09	0,966
Monócitos/HDL (GI: N=43; GII: N=53)	8,28 ± 3,43	8,74 ± 4,83	0,619
Creatinina (mg/dL) (GI: N=43; GII: N=51)	1,16 ± 0,57	1,01 ± 0,19	0,182
CT (mg/dL) (GI: N=61; GII: N=66)	203 ± 49,4	201 ± 37,8	0,967
C-HDL (mg/dL) (GI: N=61; GII: N=66)	48,9 ± 13,8	52,2 ± 13,7	0,125
C-LDL (mg/dL) (GI: N=63; GII: N=66)	129 ± 38,2	127 ± 33,4	0,870
Triglicéridos (mg/dL) (GI: N=60; GII: N=66)	199 ± 97,5	176 ± 110	0,088
PCR (mg/L) (GI: N=35; GII: n=46)	3,93 ± 2,85	3,85 ± 5,87	0,347
Malondialdeído (μmol/L) (GI: N=64; GII: N=66)	2,92 ± 0,76	2,58 ± 0,72	0,010
Homocisteína (μmol/L) (GI: N=64; GII: N=66)	11,0 ± 4,90	9,26 ± 4,62	0,022

Os resultados estão expressos em média \pm desvio-padrão. Grupo I – DMT2 com angiopatia; Grupo II – DMT2 sem angiopatia; HbA1c, hemoglobina glicada; VGM, volume globular médio; HGM, hemoglobina globular média; CHGM, concentração de hemoglobina globular média; CT, colesterol total; C-HDL, colesterol das lipoproteínas de alta densidade plasmática; C-LDL, colesterol das lipoproteínas de baixa densidade plasmática; PCR, proteína C-reativa; N, número de indivíduos analisados.

4.4. Comparação entre a distribuição dos genótipos da IL-6, TNF- α , RAGE e HMOX-1 da população estudada e as populações europeia, espanhola e italiana

Recorreu-se ao teste qui-quadrado de Pearson para identificar possíveis associações entre a distribuição genotípica dos polimorfismos estudados neste trabalho e as populações europeia, espanhola e italiana (**Tabela 9**).

Tabela 9. Comparação das frequências genotípicas entre a população estudada e as populações europeia, espanhola e italiana.

Polimorfismos	Genótipos	a - Distribuição na população em estudo (%)	b - Distribuição na população europeia (%)	c - Distribuição na população espanhola (%)	d - Distribuição na população italiana (%)	p^* (a-b)	p^* (a-c)	p^* (a-d)
IL-6 -174 GC	GG	37 (40,2)	181 (36,0)	44 (41,1)	45 (42,1)	0,195	0,951	0,704
	GC	46 (50,0)	226 (44,9)	51 (47,7)	48 (44,9)			
	CC	9 (9,80)	96 (19,1)	12 (11,2)	14 (13,1)			
TNF- α -238 GA	GG	61 (84,7)	441 (87,7)	96 (89,7)	91 (85,0)	0,813	0,541	0,831
	GA	11 (15,3)	60 (11,9)	11 (10,3)	14 (13,1)			
	AA	0 (0,00)	2 (0,40)	0 (0,00)	2 (1,90)			
RAGE -374 TA	TT	3 (6,70)	29 (5,80)	5 (4,70)	9 (8,40)	0,958	0,752	0,612
	TA	17 (37,8)	193 (38,4)	45 (42,1)	47 (43,9)			
	AA	25 (55,5)	281 (55,9)	57 (53,3)	51 (47,7)			
HMOX-1 -413 TA	TT	14 (24,6)	94 (18,7)	16 (15,0)	17 (15,9)	0,400	0,111	0,276
	TA	24 (42,1)	255 (50,7)	59 (55,1)	53 (49,5)			
	AA	19 (33,3)	154 (30,6)	32 (29,9)	37 (34,6)			

Os resultados estão expressos como número de indivíduos e percentagem. IL-6, interleucina-6; TNF- α , fator de necrose tumoral alfa; RAGE, recetor para produtos finais de glicação avançada; HMOX-1, Heme oxigenase-1.

* Teste qui-quadrado de Pearson.

Não se verificaram-se diferenças estatisticamente significativas entre a população estudada e as populações europeia, espanhola e italiana.

4.5. Associação das variantes genéticas polimórficas com os grupos estudados

Recorreu-se aos testes de independência do qui-quadrado de Pearson para identificar possíveis associações entre os polimorfismos genéticos e os grupos estudados, não tendo havido resultados estatisticamente significativos. Em relação à IL-6, observa-se em ambos os grupos, maior prevalência do genótipo GC (GI: 51,1% vs. GII: 48,9%). Relativamente ao TNF- α , existe maior predomínio do genótipo homozigótico GG (GI: 85,7% vs. GII: 83,8%). Observou-se maior prevalência do genótipo AA do polimorfismo RAGE (GI: 56,5% vs. GII: 54,5%). E por último, em relação à HMOX-1 houve maior predomínio do genótipo heterozigótico TA (GI: 48,3% vs. GII: 35,7%), sendo que no grupo II se observou igual prevalência do genótipo TA e TT.

Tabela 10. Associação dos polimorfismos genéticos com os grupos estudados.

Polimorfismos	Genótipos	Grupo I (N total=75)		Grupo II (N total=73)		p
		N	%	N	%	
IL-6 -174 GC (GI: N=47; GII: N=45)	GG	17	36,2	20	44,4	0,525
	GC	24	51,1	22	48,9	
	CC	6	12,7	3	6,70	
TNF-α -238 GA (GI: N=35; GII: N=37)	GG	30	85,7	31	83,8	1,000
	GA	5	14,3	6	16,2	
	AA	0	0,00	0	0,00	
RAGE -374 TA (GI: N=23; GII: N=22)	TT	1	4,40	2	9,10	0,815
	TA	9	39,1	8	36,4	
	AA	13	56,5	12	54,5	
HMOX-1 -413 TA (GI: N=29; GII: N=28)	TT	4	13,8	10	35,7	0,158
	TA	14	48,3	10	35,7	
	AA	11	37,9	8	28,6	

Os resultados estão expressos como número de indivíduos e percentagem. Grupo I – DMT2 com angiopatia; Grupo II – DMT2 sem angiopatia; IL-6, interleucina-6; TNF- α , fator de necrose tumoral alfa; RAGE, recetor para produtos finais de glicação avançada; HMOX-1, Heme oxigenase-1; N, número de indivíduos analisados.

4.6. Frequência e distribuição dos modelos genéticos para os quatro polimorfismos genéticos nos grupos estudados

Recorreu-se aos testes de independência do qui-quadrado de Pearson e de Fisher para identificar possíveis associações entre a frequência e distribuição dos quatro polimorfismos genéticos e os grupos com DMT2 e angiopatia e sem angiopatia (**Tabela 11**).

Tabela 11. Frequência e distribuição dos modelos genéticos dos 4 polimorfismos avaliados na amostra.

Polimorfismo	Grupo I		Grupo II		p*	
	N	%	N	%		
IL-6 -174 GC	GG+GC	41	87,2	42	93,3	0,486
	CC	6	12,8	3	6,7	
	GC+CC	30	63,8	25	55,6	0,524
	GG	17	36,2	20	44,4	
	GG+CC	23	48,9	23	51,1	1,000
	GC	24	51,1	22	48,9	
TNF- α -238 GA	GG+GA	---	---	---	---	---
	AA	---	---	---	---	
	GA+AA	5	14,3	6	16,2	1,000
	GG	30	85,7	31	83,8	
	GG+AA	30	85,7	31	83,8	1,000
	GA	5	14,3	6	16,2	
RAGE -374 TA	AA+TA	22	95,7	20	90,9	0,608
	TT	1	4,3	2	9,1	
	TT+TA	10	43,5	10	45,5	1,000
	AA	13	56,5	12	54,5	
	TT+AA	14	60,9	14	63,6	1,000
	TA	9	39,1	8	36,4	
HMOX-1 -413 TA	AA+TA	25	86,2	18	64,3	0,070
	TT	4	13,8	10	35,7	
	TT+TA	18	62,1	20	71,4	0,576
	AA	11	37,9	8	28,6	
	TT+AA	15	51,7	18	64,3	0,424
	TA	14	48,3	10	35,7	

Os resultados estão expressos como número de indivíduos e percentagem. Grupo I – DMT2 com angiopatia; Grupo II – DMT2 sem angiopatia; IL-6, interleucina-6; TNF- α , fator de necrose tumoral alfa; RAGE, recetor para produtos finais de glicação avançada; HMOX-1, Heme oxigenase-1; N, número de indivíduos analisados. *Teste de Fisher.

Não se verificaram diferenças estatisticamente significativas entre os dois grupos estudados, no entanto, é possível observar que, no modelo genético AA+TA vs TT do polimorfismo -413 TA da HMOX-1 existe uma tendência para ser estatisticamente significativo ($p=0,070$).

4.7. Associação dos parâmetros bioquímicos e celulares com as variantes genéticas polimórficas

Para cada um dos polimorfismos, agruparam-se os genótipos consoante os modelos dominante e recessivo e são apresentados apenas os resultados estatisticamente significativos ou com tendência para serem estatisticamente significativos.

4.7.1. Associação dos parâmetros bioquímicos e celulares com o polimorfismo IL-6 -174 GC

Recorreu-se ao teste t-student para identificar possíveis associações entre os parâmetros bioquímicos e celulares e os diferentes modelos genéticos (**Tabelas 12, 13, 14**).

Tabela 12. Associação do alelo G do polimorfismo -174 GC da IL-6 com os parâmetros bioquímicos.

Parâmetros	IL-6						p	OR [IC 95%]	p*
	GG+GC			CC					
	N	Média	DP	N	Média	DP			
HGM	45	29,2	1,40	8	30,5	1,01	0,015	0,465 [0,245-0,883]	0,019
CHGM	45	33,9	1,12	8	34,7	1,09	0,062	-----	-----

Os resultados estão expressos em número de indivíduos, média e desvio-padrão. VGM, volume globular médio; HGM, hemoglobina globular média; CHGM, concentração de hemoglobina globular média; N, número de indivíduos analisados; DP, desvio-padrão; p* - ajustado para duração de diabetes.

- **HGM:** os indivíduos com os genótipos GG+CC apresentam valores mais baixos de HGM em comparação com os indivíduos com o genótipo CC. Para os indivíduos portadores do alelo G, em relação a este parâmetro, parece ser um fator de proteção independentemente dos anos de duração de diabetes.

Contudo, é possível observar que o parâmetro concentração de hemoglobina globular média apresenta uma tendência para ser estatisticamente significativo.

Tabela 13. Associação do alelo C do polimorfismo -174 GC da IL-6 com os parâmetros bioquímicos.

Parâmetros	IL-6						p	OR [IC 95%]	p*
	GC+CC			GG					
	N	Média	DP	N	Média	DP			
Rácio Monócitos/C-HDL	31	7,74	2,43	22	9,43	3,38	0,038	1,242 [1,000-1,544]	0,050

Os resultados estão expressos em número de indivíduos, média e desvio-padrão. C-HDL, colesterol das lipoproteínas de alta densidade plasmática; N, número de indivíduos analisados; DP, desvio-padrão; p* - ajustado para duração de diabetes.

- **Rácio monócitos/C-HDL:** os indivíduos homozigóticos para o genótipo GG apresentam valores mais elevados comparativamente com os indivíduos com os genótipos GC+CC. Para os indivíduos portadores do genótipo homozigótico GG, em relação a este parâmetro, parece ser um fator de risco independentemente dos anos de duração de diabetes.

Tabela 14. Associação do genótipo GC do polimorfismo -174 GC da IL-6 com os parâmetros bioquímicos.

Parâmetros	IL-6						p	OR [IC 95%]	p*
	GG+CC			GC					
	N	Média	DP	N	Média	DP			
HGM	30	29,8	1,45	23	28,8	1,22	0,015	0,561 [0,345-0,915]	0,020
Rácio Monócitos/C-HDL	30	9,22	3,17	23	7,41	2,33	0,026	0,759 [0,593-0,971]	0,028
Malondialdeído	46	2,85	0,80	46	2,53	0,76	0,049	0,554 [0,316-0,969]	0,038

Os resultados estão expressos em número de indivíduos, média e desvio-padrão. HGM, hemoglobina globular média; C-HDL, colesterol das lipoproteínas de alta densidade plasmática; N, número de indivíduos analisados; DP, desvio-padrão; p* - ajustado para duração de diabetes.

- **HGM:** os indivíduos com os genótipos GG+CC apresentam valores mais elevados relativamente aos indivíduos com o genótipo GC. Para os indivíduos portadores do genótipo GC, em relação a este parâmetro, parece ser um fator de proteção independentemente dos anos de duração de diabetes.
- **Rácio monócitos/C-HDL:** os indivíduos com os genótipos GG+CC apresentam valores mais elevados comparando com os indivíduos com o

genótipo GC. Para os indivíduos portadores do genótipo GC, em relação a este parâmetro, parece ser um fator de proteção independentemente dos anos de duração da diabetes.

- **Malondialdeído:** os indivíduos com os genótipos GG+CC apresentam valores mais elevados comparativamente com os indivíduos com o genótipo GC. Para os indivíduos portadores do genótipo GC, em relação a este parâmetro, parece ser um fator de proteção independentemente dos anos de duração de diabetes.

4.7.2. Associação dos parâmetros bioquímicos e celulares com o polimorfismo RAGE -374 TA

Recorreu-se ao teste t-student para identificar possíveis associações entre os parâmetros bioquímicos e os diferentes modelos genéticos (**Tabelas 15, 16, 17**).

Tabela 15. Associação do alelo A do polimorfismo -374 TA do RAGE com os parâmetros bioquímicos.

Parâmetros	RAGE						<i>p</i>
	AA+TA			TT			
	N	Média	DP	N	Média	DP	
Linfócitos	29	2219	493	3	1626	247	0,051

Os resultados estão expressos em número de indivíduos, média e desvio-padrão. N, número de indivíduos analisados; DP, desvio-padrão.

Não se verificaram-se diferenças estatisticamente significativas, contudo, é possível observar que o parâmetro linfócitos apresenta uma tendência para ser estatisticamente significativo.

Tabela 16. Associação do alelo T do polimorfismo -374 TA do RAGE com os parâmetros bioquímicos.

Parâmetros	RAGE						p	OR [IC 95%]	p*
	TT+TA			AA					
	N	Média	DP	N	Média	DP			
Creatinina	16	1,15	0,28	17	0,98	0,20	0,058	-----	-----
Homocisteína	20	10,9	4,24	25	8,52	2,91	0,039	0,827 [0,686-0,998]	0,048

Os resultados estão expressos em número de indivíduos, média e desvio-padrão. N, número de indivíduos analisados; DP, desvio-padrão; p* - ajustado para duração de diabetes.

- **Homocisteína:** os indivíduos com os genótipos TT+TA apresentam valores mais elevados comparativamente com os indivíduos com o genótipo AA. Para os indivíduos portadores do genótipo AA, em relação a este parâmetro, parece ser um fator de proteção independentemente dos anos de duração de diabetes.

No entanto, é possível observar que o parâmetro creatinina apresenta uma tendência para ser estatisticamente significativo.

Tabela 17. Associação do genótipo TA do polimorfismo -374 TA do RAGE com os parâmetros bioquímicos.

Parâmetros	RAGE						p	OR [IC 95%]	p*
	TT+AA			TA					
	N	Média	DP	N	Média	DP			
Rácio Monócitos/Linfócitos	19	0,22	0,08	13	0,18	0,04	0,069	-----	-----
C-Total	28	191	35,2	16	214	44,3	0,069	-----	-----
Homocisteína	28	8,71	3,17	17	11,0	4,19	0,041	1,195 [1,002-1,431]	0,054

Os resultados estão expressos em número de indivíduos, média e desvio-padrão. N, número de indivíduos analisados; DP, desvio-padrão; p* - ajustado para duração de diabetes.

- **Homocisteína:** os indivíduos com os genótipos TT+AA apresentam valores mais baixos relativamente aos indivíduos com o genótipo TA. Para os indivíduos portadores do genótipo TA, em relação a este parâmetro, parece ser um fator de risco independentemente dos anos de duração de diabetes.

Contudo, os parâmetros rácio monócitos/linfócitos e colesterol total apresentam uma tendência para serem estatisticamente significativos.

4.7.3. Associação dos parâmetros bioquímicos e celulares com o polimorfismo HMOX-1 -413 TA

Recorreu-se ao teste t-student para identificar possíveis associações entre os parâmetros bioquímicos e os diferentes modelos genéticos (**Tabelas 18, 19**).

Tabela 18. Associação do alelo A do polimorfismo -413 TA da HMOX-1 com os parâmetros bioquímicos.

Parâmetros	HMOX-1						p	OR [IC 95%]	p*
	AA+TA			TT					
	N	Média	DP	N	Média	DP			
Monócitos	25	360	63,3	8	470	114	0,030	0,984 [0,972-0,997]	0,017
Rácio Monócitos/ Linfócitos	25	0,18	0,06	8	0,22	0,02	0,055	-----	-----
Rácio Monócitos/C-HDL	25	7,30	1,73	8	9,16	3,13	0,039	0,649 [0,419-0,985]	0,053

Os resultados estão expressos em número de indivíduos, média e desvio-padrão. HbA1c, hemoglobina glicada; C-HDL, colesterol das lipoproteínas de alta densidade plasmática; N, número de indivíduos analisados; DP, desvio-padrão; p* - ajustado para duração de diabetes.

- **Monócitos:** os indivíduos homocigóticos para o alelo T apresentam valores mais elevados em relação aos indivíduos com os genótipos AA+TA. Para os indivíduos portadores do alelo A, em relação a este parâmetro, parece ser um fator de proteção independentemente dos anos de duração de diabetes.
- **Rácio monócitos/C-HDL:** os indivíduos homocigóticos para o alelo T apresentam valores mais elevados comparativamente aos indivíduos com os genótipos AA+TA. Para os indivíduos portadores do alelo A, em relação a este parâmetro, parece ser um fator de proteção independentemente dos anos de duração de diabetes.

Todavia, o parâmetro rácio monócitos/linfócitos apresenta uma tendência para ser estatisticamente significativo.

Tabela 19. Associação do genótipo TA do polimorfismo -413 TA da HMOX-1 com os parâmetros bioquímicos.

Parâmetros	HMOX-1						<i>p</i>
	AA+TT			TA			
	N	Média	DP	N	Média	DP	
Creatinina	20	1,14	0,31	16	0,98	0,15	0,054

Os resultados estão expressos em número de indivíduos, média e desvio-padrão. N, número de indivíduos analisados; DP, desvio-padrão.

Não se verificaram-se diferenças estatisticamente significativas, contudo, é possível observar que o parâmetro creatinina apresenta uma tendência para ser estatisticamente significativo.

4.8. Associação dos parâmetros bioquímicos e celulares com as variantes genéticas polimórficas e os grupos estudados

Para cada um dos polimorfismos, agruparam-se os genótipos consoante os modelos dominante e recessivo para o grupo I e grupo II. São apresentados apenas os resultados estatisticamente significativos ou com tendência para serem estatisticamente significativos.

4.8.1. Associação do polimorfismo -174 GC da IL-6 com os parâmetros bioquímicos e celulares e os grupos estudados

Recorreu-se ao teste t-student para identificar possíveis associações entre os parâmetros bioquímicos e os diferentes modelos genéticos (Tabelas 20, 21, 22).

Tabela 20. Associação do alelo G do polimorfismo -174 GC da IL-6 com os parâmetros bioquímicos e os grupos estudados.

Parâmetros	Grupo I							p	OR [IC 95%]	p*	Grupo II							p	OR [IC 95%]	p*
	GG+GC			CC			GG+GC				CC									
	N	Média	DP	N	Média	DP	N				Média	DP	N	Média	DP					
Glicémia Ocasional	16	194	76,5	2	125	48,8	0,237	-----	-----	17	192	59,8	2	161	1,41	0,049	1,009 [0,981-1,037]	0,542		
VGM	17	84,6	3,28	5	87,7	1,34	0,058	-----	-----	28	87,2	4,02	3	88,4	1,33	0,619	-----	-----		
HGM	17	28,9	1,26	5	30,7	1,19	0,009	0,280 [0,079-0,993]	0,049	28	29,4	1,47	3	30,1	0,61	0,403	-----	-----		
CT	37	199	46,5	6	171	21,4	0,155	-----	-----	41	198	34,3	3	182	3,15	0,007	1,015 [0,978-1,054]	0,420		

Os resultados estão expressos em número de indivíduos, média e desvio-padrão. Grupo I – DMT2 com angiopatia; Grupo II – DMT2 sem angiopatia; VGM, volume globular médio; HGM, hemoglobina globular média; CT, colesterol total; N, número de indivíduos analisados; DP, desvio-padrão; p* - ajustado para duração de diabetes.

No grupo I, observou-se uma diferença estatisticamente significativa para o parâmetro HGM. Contudo, o parâmetro VGM apresenta uma tendência para ser estatisticamente significativo.

- **HGM:** os indivíduos homozigóticos para o alelo C apresentam valores mais elevados relativamente aos indivíduos com os genótipos GG+GC. Para os indivíduos do grupo I portadores do alelo G, em relação a este parâmetro, parece ser um fator de proteção para a evolução da doença angiopática nestes indivíduos que já a têm, independentemente dos anos de duração de diabetes.

No grupo II, verificou-se a existência de diferenças estatisticamente significativas para os parâmetros: glicémia ocasional e colesterol total, sendo que no grupo I não se verificaram diferenças estatisticamente significativas nestes parâmetros.

- **Glicémia ocasional:** os indivíduos com os genótipos GG+GC apresentam valores mais elevados comparativamente aos indivíduos com o genótipo CC. Para os indivíduos do grupo II portadores do alelo G, em relação a este parâmetro, parece ser um fator de risco para doença angiopática, independentemente dos anos de duração de diabetes.
- **CT:** os indivíduos com os genótipos GG+GC apresentam valores mais elevados em comparação com os indivíduos com o genótipo CC. Para os indivíduos do grupo II portadores do alelo G, em relação a este parâmetro, parece ser um fator de risco para doença angiopática, independentemente dos anos de duração de diabetes.

Tabela 21. Associação do alelo C do polimorfismo -174 GC da IL-6 com os parâmetros bioquímicos e os grupos estudados.

Parâmetros	Grupo I						<i>p</i>	Grupo II						<i>p</i>
	GC+CC			GG				GC+CC			GG			
	N	Média	DP	N	Média	DP		N	Média	DP	N	Média	DP	
HbA1c	29	8,84	1,47	16	8,01	1,25	0,065	25	8,29	1,53	19	8,43	1,18	0,746

Os resultados estão expressos em número de indivíduos, média e desvio-padrão. Grupo I – DMT2 com angiopatia; Grupo II – DMT2 sem angiopatia; HbA1c, hemoglobina glicada; N, número de indivíduos analisados; DP, desvio-padrão.

Em ambos os grupos não se observaram diferenças estatisticamente significativas, contudo, no grupo I é possível verificar que o parâmetro hemoglobina glicada apresenta uma tendência para ser estatisticamente significativo, não se observando o mesmo para o grupo II.

Tabela 22. Associação do genótipo GC do polimorfismo -174 GC da IL-6 com os parâmetros bioquímicos e os grupos estudados.

Parâmetros	Grupo I							OR [IC 95%]	p*	Grupo II								
	GG+CC			GC			p			GG+CC			GC			p	OR [IC 95%]	p*
	N	Média	DP	N	Média	DP				N	Média	DP	N	Média	DP			
VGM	14	86,4	2,30	8	83,4	3,80	0,032	0,715 [0,503-1,017]	0,062	16	87,9	4,24	15	86,7	3,42	0,394		
HGM	14	29,9	1,34	8	28,4	1,14	0,015	0,340 [0,125-0,928]	0,035	16	29,7	1,57	15	29,1	1,21	0,227	-----	-----
Leucócitos	14	7,42	1,75	8	9,85	1,91	0,007	2,385 [1,081-5,262]	0,031	16	7,10	1,19	15	7,39	2,11	0,634	-----	-----
Rácio Monócitos/C-HDL	14	9,41	3,91	8	5,90	1,78	0,027	0,553 [0,315-0,971]	0,039	16	9,06	2,48	15	8,22	2,23	0,329	-----	-----
Malondialdeído	23	2,91	0,84	24	2,74	0,85	0,488	-----	-----	23	2,79	0,77	22	2,30	0,57	0,019	0,315 [0,111-0,891]	0,029

Os resultados estão expressos em número de indivíduos, média e desvio-padrão. Grupo I – DMT2 com angiopatia; Grupo II – DMT2 sem angiopatia; VGM, volume globular médio; HGM, hemoglobina globular média; C-HDL, colesterol das lipoproteínas de alta densidade plasmática; N, número de indivíduos analisados; DP, desvio-padrão; p* - ajustado para duração de diabetes.

No grupo I, observaram-se diferenças estatisticamente significativas para os parâmetros: VGM, HGM, leucócitos e rácio monócitos/C-HDL, não se observando diferenças estatisticamente significativas nestes parâmetros no grupo II.

- **VGM:** os indivíduos com os genótipos GG+CC apresentam valores mais elevados relativamente aos indivíduos com o genótipo GC. Para os indivíduos do grupo I portadores do genótipo GC, em relação a este parâmetro, parece ser um fator de proteção para a evolução da doença angiopática nestes indivíduos que já a têm, independentemente dos anos de duração de diabetes.

- **HGM:** os indivíduos com os genótipos GG+CC apresentam valores mais elevados em relação aos indivíduos com o genótipo GC. Para os indivíduos do grupo I portadores do genótipo GC, em relação a este parâmetro, parece ser um fator de proteção para a evolução da doença angiopática nestes indivíduos que já a têm, independentemente dos anos de duração de diabetes.
- **Leucócitos:** os indivíduos com os genótipos GG+CC apresentam valores mais baixos comparativamente aos indivíduos com o genótipo GC. Para os indivíduos do grupo I portadores do genótipo GC, em relação a este parâmetro, parece ser um fator de risco para a evolução da doença angiopática nestes indivíduos que já a têm, independentemente dos anos de duração de diabetes.
- **Rácio monócitos/C-HDL:** os indivíduos com os genótipos GG+CC apresentam valores mais elevados relativamente aos indivíduos com o genótipo GC. Para os indivíduos do grupo I portadores do genótipo GC, em relação a este parâmetro, parece ser um fator de proteção para a evolução da doença angiopática nestes indivíduos que já a têm, independentemente dos anos de duração de diabetes.

No grupo II, o parâmetro malondialdeído demonstrou ser estatisticamente significativo, o que não se verificou no grupo I.

- **Malondialdeído:** os indivíduos com os genótipos GG+CC apresentam valores mais elevados em relação aos indivíduos com o genótipo GC. Para os indivíduos do grupo II portadores do genótipo GC, em relação a este parâmetro, parece ser um fator de proteção para doença angiopática, dependente dos anos de duração de diabetes.

4.8.2. Associação do polimorfismo -238 GA do TNF- α com os parâmetros bioquímicos e celulares e os grupos estudados

Recorreu-se ao teste t-student para identificar possíveis associações entre os parâmetros bioquímicos e os diferentes modelos genéticos (Tabelas 23, 24).

Tabela 23. Associação do alelo A do polimorfismo -238 GA do TNF- α com os parâmetros bioquímicos e os grupos estudados.

Parâmetros	Grupo I						p	OR [IC 95%]	p*	Grupo II						p	OR [IC 95%]	p*
	GA+AA			GG						GA+AA			GG					
	N	Média	DP	N	Média	DP				N	Média	DP	N	Média	DP			
Eritrócitos	5	4,63	0,74	25	4,52	0,61	0,714	-----	-----	5	4,22	0,36	28	4,71	0,46	0,032	391,6 [2,422-63339]	0,021
PCR	2	9,69	1,83	11	4,17	2,38	0,011	NA	NA	3	1,50	0,84	19	4,22	3,88	0,249	-----	-----

Os resultados estão expressos em número de indivíduos, média e desvio-padrão. Grupo I – DMT2 com angiopatia; Grupo II – DMT2 sem angiopatia; PCR, proteína C-reativa; N, número de indivíduos analisados; DP, desvio-padrão; p* - ajustado para duração de diabetes; NA – não aplicável.

No grupo I, observou-se uma diferença estatisticamente significativa para o parâmetro PCR, não se observando diferenças estatisticamente significativas neste parâmetro no grupo II.

- **PCR:** os indivíduos com os genótipos GA+AA apresentam valores mais elevados em relação aos indivíduos com o genótipo GG. Não foi possível obter os valores de *odd ratio* e valor de *p* ajustado para a duração da diabetes *mellitus*, provavelmente devido ao tamanho reduzido da amostra.

No grupo II, verificou-se a existência de uma diferença estatisticamente significativa para o parâmetro eritrócitos, sendo que no grupo I não se verificou nenhuma diferença estatisticamente significativa neste parâmetro.

- **Eritrócitos:** os indivíduos homozigóticos para o alelo G apresentam valores mais elevados comparativamente com os indivíduos com os genótipos GA+AA. Para os indivíduos do grupo II portadores do genótipo GG, em relação a este parâmetro, parece ser um fator de risco para doença angiopática, independentemente dos anos de duração de diabetes.

Tabela 24. Associação do genótipo GA do polimorfismo -238 GA do TNF- α com os parâmetros bioquímicos e os grupos estudados.

Parâmetros	Grupo I						p	OR [IC 95%]	p*	Grupo II						p	OR [IC 95%]	p*
	GG+AA			GA						GG+AA			GA					
	N	Média	DP	N	Média	DP				N	Média	DP	N	Média	DP			
Eritrócitos	25	4,52	0,61	5	4,63	0,74	0,714	-----	-----	28	4,71	0,46	5	4,22	0,36	0,032	0,003 [0,000-0,413]	0,021
PCR	11	4,17	2,38	2	9,69	1,83	0,011	NA	NA	19	4,22	3,88	3	1,50	0,84	0,249	-----	-----

Os resultados estão expressos em número de indivíduos, média e desvio-padrão. Grupo I – DMT2 com angiopatia; Grupo II – DMT2 sem angiopatia; PCR, proteína C-reativa; N, número de indivíduos analisados; DP, desvio-padrão; p* - ajustado para duração de diabetes; NA – não aplicável.

No grupo I, observou-se uma diferença estatisticamente significativa para o parâmetro PCR, não se observando diferenças estatisticamente significativas neste parâmetro para o grupo II.

- **PCR:** os indivíduos com o genótipo GA apresentam valores mais elevados em relação aos indivíduos com os genótipos GG+AA. Não foi possível obter os valores de *odd ratio* e valor de *p* ajustado para a duração da diabetes *mellitus*, provavelmente devido ao tamanho reduzido da amostra.

- No grupo II, verificou-se a existência de uma diferença estatisticamente significativa para o parâmetro eritrócitos, sendo que no grupo I não se verificou nenhuma diferença estatisticamente significativa neste parâmetro.
- Eritrócitos:** os indivíduos com os genótipos GG+AA apresentam valores mais elevados comparativamente com os indivíduos com o genótipo GA. Para os indivíduos do grupo II portadores do genótipo GA, em relação a este parâmetro, parece ser um fator de proteção para doença angiopática, independentemente dos anos de duração de diabetes.

4.8.3. Associação do polimorfismo -374 TA do RAGE com os parâmetros bioquímicos e celulares e os grupos estudados

Recorreu-se ao teste t-student para identificar possíveis associações entre os parâmetros bioquímicos e os diferentes modelos genéticos (Tabelas 25, 26).

Tabela 25. Associação do alelo T do polimorfismo -374 TA do RAGE com os parâmetros bioquímicos e os grupos estudados.

Parâmetros	Grupo I						p	OR [IC 95%]	p*	Grupo II						p	OR [IC 95%]	p*
	TT+TA			AA						TT+TA			AA					
	N	Média	DP	N	Média	DP				N	Média	DP	N	Média	DP			
Monócitos	7	344	64,3	6	454	75,6	0,016	1,023 [1,000-1,049]	0,064	9	466	124	10	421	84,1	0,361	-----	-----
Rácio Monócitos/ Linfócitos	7	0,17	0,04	6	0,23	0,05	0,029	4,017E+19 [0,000-6,516E+43]	0,112	9	0,22	0,10	10	0,19	0,06	0,429	-----	-----
Rácio Monócitos/ C-HDL	7	6,41	1,75	6	9,33	3,28	0,065	-----	-----	9	9,65	2,04	10	8,02	2,06	0,102	-----	-----
Homocisteína	10	11,6	4,11	13	8,34	3,84	0,067	-----	-----	10	10,3	4,50	12	8,72	1,53	0,271	-----	-----

Os resultados estão expressos em número de indivíduos, média e desvio-padrão. Grupo I – DMT2 com angiopatia; Grupo II – DMT2 sem angiopatia; C-HDL, colesterol das lipoproteínas de alta densidade plasmática; N, número de indivíduos analisados; DP, desvio-padrão; p* - ajustado para duração de diabetes.

No grupo I, observaram-se diferenças estatisticamente significativas para os parâmetros: monócitos e rácio monócitos/linfócitos, no entanto, os parâmetros rácio monócitos/C-HDL e homocisteína apresentam uma tendência para serem estatisticamente significativos.

- **Monócitos:** os indivíduos homozigóticos para o alelo A apresentam valores superiores aos indivíduos com os genótipos TT+TA. Para os indivíduos do grupo I portadores do genótipo AA, em relação a este parâmetro, parece ser um fator de risco para a evolução da doença angiopática nestes indivíduos que já a têm, independentemente dos anos de duração de diabetes.
- **Rácio monócitos/linfócitos:** os indivíduos homozigóticos para o alelo A apresentam valores superiores aos indivíduos com os genótipos TT+TA. Para os indivíduos do grupo I portadores do genótipo AA, em relação a este parâmetro, parece ser um fator de risco para a evolução da doença angiopática nestes indivíduos que já a têm, independentemente dos anos de duração de diabetes.

No grupo II, não se observaram diferenças estatisticamente significativas nos parâmetros analisados para os dois grupos.

Tabela 26. Associação do genótipo TA do polimorfismo -374 TA do RAGE com os parâmetros bioquímicos e os grupos estudados.

Parâmetros	Grupo I						p	OR [IC 95%]	p*	Grupo II						p	OR [IC 95%]	p*
	TT+AA			TA						TT+AA			TA					
	N	Média	DP	N	Média	DP				N	Média	DP	N	Média	DP			
HGM	7	29,8	1,64	6	28,7	1,23	0,194	-----	-----	12	28,7	1,20	7	30,1	1,90	0,051	-----	-----
Monócitos	7	443	74,9	6	339	68,6	0,024	0,973 [0,946-0,999]	0,055	12	435	98,6	7	454	121	0,718	-----	-----
Rácio Monócitos/ Linfócitos	7	0,23	0,04	6	0,16	0,03	0,006	NA	NA	12	0,22	0,09	7	0,19	0,05	0,539	-----	-----
Rácio Monócitos/ C-HDL	7	9,25	3,00	6	6,01	1,54	0,037	0,469 [0,195-0,988]	0,092	12	8,40	2,07	7	9,47	2,29	0,305	-----	-----
Triglicéridos	14	206	88,6	8	160	55,0	0,198	-----	-----	14	148	79,3	8	227	101	0,055	-----	-----

Os resultados estão expressos em número de indivíduos, média e desvio-padrão. Grupo I – DMT2 com angiopatia; Grupo II – DMT2 sem angiopatia; HGM, hemoglobina globular média; C-HDL, colesterol das lipoproteínas de alta densidade plasmática; N, número de indivíduos analisados; DP, desvio-padrão; p* - ajustado para duração de diabetes; NA – não aplicável.

No grupo I, observaram-se diferenças estatisticamente significativas para os parâmetros: monócitos, rácio monócitos/linfócitos e rácio monócitos/C-HDL, não se observando diferenças estatisticamente significativas nestes parâmetros no grupo II.

- **Monócitos:** os indivíduos com os genótipos TT+AA apresentam valores mais elevados em relação aos indivíduos com o genótipo TA. Para os indivíduos do grupo I portadores do genótipo TA, em relação a este parâmetro, parece ser um fator de proteção para a evolução da doença angiopática nestes indivíduos que já a têm, independentemente dos anos de duração de diabetes.
- **Rácio monócitos/linfócitos:** os indivíduos com os genótipos TT+AA apresentam valores mais elevados relativamente aos indivíduos com o genótipo TA. Não foi possível obter os valores de *odd ratio* e valor de *p* ajustado para a duração da diabetes *mellitus*, provavelmente devido ao tamanho reduzido da amostra.

- **Rácio monócitos/C-HDL:** os indivíduos com os genótipos TT+AA apresentam valores mais elevados em comparação com os indivíduos com o genótipo TA. Para os indivíduos do grupo I portadores do genótipo TA, em relação a este parâmetro, parece ser um fator de proteção para a evolução da doença angiopática nestes indivíduos que já a têm, independentemente dos anos de duração de diabetes.

No grupo II, não se observaram diferenças estatisticamente significativas nos parâmetros analisados para os dois grupos, contudo, os parâmetros HGM e triglicéridos apresentam uma tendência para serem estatisticamente significativos.

4.8.4. Associação do polimorfismo -413 TA da HMOX-1 com os parâmetros bioquímicos e celulares e os grupos estudados

Recorreu-se ao teste t-student para identificar possíveis associações entre os parâmetros bioquímicos e os diferentes modelos genéticos (Tabelas 27, 28).

Tabela 27. Associação do alelo T do polimorfismo -413 TA da HMOX-1 com os parâmetros bioquímicos e os grupos estudados.

Parâmetros	Grupo I						p	OR [IC 95%]	p*	Grupo II						p	OR [IC 95%]	p*
	TT+TA			AA						TT+TA			AA					
	N	Média	DP	N	Média	DP				N	Média	DP	N	Média	DP			
Monócitos	9	378	92,6	6	372	35,1	0,852	-----	-----	13	423	104	5	325	64,7	0,070	-----	-----
Rácio Monócitos/ Linfócitos	9	0,18	0,06	6	0,22	0,05	0,207	-----	-----	13	0,20	0,04	5	0,13	0,05	0,008	0,000 [0,000- 0,083]	0,038
Creatinina	9	0,94	0,14	7	1,32	0,36	0,030	491,4 [1,191- 202669]	0,044	15	1,07	0,21	5	0,92	0,14	0,151	-----	-----

Os resultados estão expressos em número de indivíduos, média e desvio-padrão. Grupo I – DMT2 com angiopatia; Grupo II – DMT2 sem angiopatia; N, número de indivíduos analisados; DP, desvio-padrão; p* - ajustado para duração de diabetes.

No grupo I, observou-se uma diferença estatisticamente significativa para o parâmetro creatinina, não se observando diferenças estatisticamente significativas neste parâmetro para o grupo II.

- **Creatinina:** os indivíduos homozigóticos para o alelo A apresentam valores mais elevados em relação aos indivíduos com os genótipos TT+TA. Para os indivíduos do grupo I portadores do genótipo AA, em relação a este parâmetro, parece ser um fator de risco para a evolução da doença angiopática nestes indivíduos que já a têm, dependente dos anos de duração de diabetes.

No grupo II, verificou-se uma diferença estatisticamente significativa para o parâmetro rácio monócitos/linfócitos, contudo, o parâmetro monócitos apresenta uma tendência para ser estatisticamente significativo.

- **Rácio monócitos/linfócitos:** os indivíduos com os genótipos TT+TA apresentam valores mais elevados relativamente aos indivíduos com o genótipo AA. Para os indivíduos do grupo II portadores do genótipo AA, em relação a este parâmetro, parece ser um fator de proteção para doença angiopática, independentemente dos anos de duração de diabetes.

Tabela 28. Associação do genótipo TA do polimorfismo -413 TA da HMOX-1 com os parâmetros bioquímicos e os grupos estudados.

Parâmetros	Grupo I						<i>p</i>	OR [IC 95%]	<i>p</i> *	Grupo II						<i>p</i>	OR [IC 95%]	<i>p</i> *
	TT+AA			TA						TT+AA			TA					
	N	Média	DP	N	Média	DP				N	Média	DP	N	Média	DP			
VGM	7	86,4	2,11	8	83,3	3,33	0,055	-----	-----	12	86,6	3,30	6	86,9	4,32	0,900	-----	-----
Creatinina	8	1,28	0,35	8	0,94	0,15	0,030	0,004 [0,000-0,895]	0,067	12	1,04	0,25	8	1,02	0,14	0,862	-----	-----
C-HDL	15	43,2	9,03	13	52,8	16,0	0,057	-----	-----	18	54,2	14,5	9	45,2	6,88	0,038	0,930 [0,847-0,998]	0,124

Os resultados estão expressos em número de indivíduos, média e desvio-padrão. Grupo I – DMT2 com angiopatia; Grupo II – DMT2 sem angiopatia; VGM, volume globular médio; C-HDL, colesterol das lipoproteínas de alta densidade plasmática; N, número de indivíduos analisados; DP, desvio-padrão; *p** - ajustado para duração de diabetes.

No grupo I, observou-se uma diferença estatisticamente significativa para o parâmetro creatinina, contudo, os parâmetros VGM e C-HDL apresentam uma tendência para serem estatisticamente significativos neste grupo.

- **Creatinina:** os indivíduos com os genótipos TT+AA apresentam valores mais elevados em relação aos indivíduos com o genótipo TA. Para os indivíduos do grupo I portadores do genótipo TA, em relação a este parâmetro, parece ser um fator de proteção para a evolução da doença angiopática nestes indivíduos que já a têm, independentemente dos anos de duração de diabetes.

No grupo II, verificou-se uma diferença estatisticamente significativa para o parâmetro C-HDL.

- **C-HDL:** os indivíduos com os genótipos TT+AA apresentam valores mais elevados relativamente aos indivíduos com o genótipo TA. Para os indivíduos do grupo II portadores do genótipo TA, em relação a este parâmetro, parece ser um fator de proteção para doença angiopática, independentemente dos anos de duração de diabetes.

4.9. Associação dos parâmetros bioquímicos e celulares com as variantes genéticas polimórficas por grupo estudado

Para cada um dos polimorfismos, agruparam-se os genótipos consoante os modelos dominante e recessivo para o grupo I e grupo II. São apresentados apenas os resultados estatisticamente significativos ou com tendência para serem estatisticamente significativos.

4.9.1. Associação do polimorfismo -174 GC da IL-6 com os parâmetros bioquímicos e celulares e os grupos estudados

Recorreu-se ao teste t-student para identificar possíveis associações entre os parâmetros bioquímicos com os grupos para os diferentes modelos genéticos (Tabelas 29, 30, 31).

Tabela 29. Associação dos parâmetros bioquímicos com a doença para o alelo G do polimorfismo -174 GC da IL-6.

Parâmetros	Grupo	IL-6												
		GG+GC					OR [IC 95%]	<i>p</i> *	CC				OR [IC 95%]	<i>p</i> *
		N	Média	DP	<i>p</i>	N			Média	DP	<i>p</i>			
VGM	GI	17	84,6	3,28	0,033	1,301 [1,022-1,657]	0,033	5	87,7	1,34	0,509	-----	-----	
	GII	28	87,2	4,02				3	88,4	1,33				
Leucócitos	GI	17	8,56	2,17	0,027	0,595 [0,397-0,891]	0,012	5	7,44	1,96	0,971	-----	-----	
	GII	28	7,21	1,73				3	7,48	1,11				
Monócitos	GI	17	365	75,0	0,007	1,008 [1,000-1,017]	0,045	5	430	102	0,658	-----	-----	
	GII	28	450	126				3	400	40,2				
Triglicéridos	GI	36	204	96,3	0,059	-----	-----	6	165	75,1	0,560	-----	-----	
	GII	40	164	86,2				3	199	91,2				

Os resultados estão expressos em número de indivíduos, média e desvio-padrão. Grupo I – DMT2 com angiopatia; Grupo II – DMT2 sem angiopatia; VGM, volume globular médio; N, número de indivíduos analisados; DP, desvio-padrão; *p** - ajustado para duração de diabetes.

Na coluna do genótipo GG+GC, observaram-se diferenças estatisticamente significativas para os parâmetros: VGM, leucócitos e monócitos. No entanto, o parâmetro triglicéridos apresenta uma tendência para ser estatisticamente significativo.

- **VGM:** os indivíduos do grupo II com os genótipos GG+GC apresentam valores mais elevados em relação aos indivíduos do grupo I. Para os indivíduos do grupo II portadores dos genótipos GG+GC, em relação a este parâmetro, parece ser um fator de risco para doença angiopática, independentemente dos anos de duração de diabetes.
- **Leucócitos:** os indivíduos do grupo I com os genótipos GG+GC apresentam valores mais elevados relativamente aos indivíduos do grupo II. Para os indivíduos do grupo II portadores dos genótipos GG+GC, em relação a este parâmetro, parece ser um fator de proteção para doença angiopática, independentemente dos anos de duração de diabetes.
- **Monócitos:** os indivíduos do grupo II com os genótipos GG+GC apresentam valores mais elevados em relação aos indivíduos do grupo I. Para os indivíduos do grupo II portadores dos genótipos GG+GC, em relação a este parâmetro, parece ser um fator de risco para doença angiopática, independentemente dos anos de duração de diabetes.

Na coluna do genótipo CC, não se verificaram diferenças estatisticamente significativas para os parâmetros estudados.

Tabela 30. Associação dos parâmetros bioquímicos com a doença para o alelo C do polimorfismo -174 GC da IL-6.

Parâmetros	Grupo	IL-6												
		GC+CC					OR [IC 95%]	<i>p</i> *	GG				OR [IC 95%]	<i>p</i> *
		N	Média	DP	<i>p</i>	N			Média	DP	<i>p</i>			
Leucócitos	GI	13	8,92	2,21	0,053	-----	-----	9	7,41	1,75	0,537	-----	-----	
	GII	18	7,41	1,95				13	7,01	1,23				
Monócitos	GI	13	375	90,2	0,243	-----	-----	9	386	78,6	0,041	1,007 [1,000-1,018]	0,247	
	GII	18	423	125				13	475	113				
Malondialdeído	GI	30	2,78	0,81	0,058	-----	-----	17	2,90	0,92	0,602	-----	-----	
	GII	25	2,39	0,65				20	2,76	0,77				

Os resultados estão expressos em número de indivíduos, média e desvio-padrão. Grupo I – DMT2 com angiopatia; Grupo II – DMT2 sem angiopatia; N, número de indivíduos analisados; DP, desvio-padrão; *p** - ajustado para duração de diabetes.

Na coluna do genótipo GC+CC, não se observaram diferenças estatisticamente significativas para os parâmetros estudados, contudo, é possível verificar uma tendência estatisticamente significativa para os parâmetros: leucócitos e malondialdeído.

Na coluna do genótipo GG, observou-se uma diferença estatisticamente significativa para o parâmetro monócitos.

- **Monócitos:** os indivíduos diabéticos do grupo sem angiopatia e com o genótipo GG apresentam valores mais elevados em relação aos indivíduos diabéticos do grupo com angiopatia. Para os indivíduos do grupo II portadores do genótipo GG, em relação a este parâmetro, parece ser um fator de risco para doença angiopática, independentemente dos anos de duração de diabetes.

Tabela 31. Associação dos parâmetros bioquímicos com a doença para o genótipo GC do polimorfismo -174 GC da IL-6.

Parâmetros	Grupo	IL-6												
		GG+CC					OR [IC 95%]	p*	GC				OR [IC 95%]	p*
		N	Média	DP	p	N			Média	DP	p			
VGM	GI	14	86,4	2,30	0,256	-----	-----	8	83,4	3,80	0,049	1,459 [1,277-2,177]	0,065	
	GII	16	87,9	4,24				15	86,7	3,42				
Leucócitos	GI	14	7,42	1,75	0,559	-----	-----	8	9,85	1,91	0,012	0,305 [0,097-0,962]	0,043	
	GII	16	7,10	1,19				15	7,39	2,11				
Rácio Monócitos/ C-HDL	GI	14	9,41	3,91	0,772	-----	-----	8	5,90	1,78	0,019	2,074 [1,112-3,865]	0,022	
	GII	16	9,06	2,48				15	8,22	2,23				
Malondialdeído	GI	23	2,91	0,84	0,628	-----	-----	24	2,74	0,85	0,048	0,430 [0,171-0,974]	0,072	
	GII	23	2,79	0,77				22	2,30	0,57				

Os resultados estão expressos em número de indivíduos, média e desvio-padrão. Grupo I – DMT2 com angiopatia; Grupo II – DMT2 sem angiopatia; VGM, volume globular médio; C-HDL, colesterol das lipoproteínas de alta densidade plasmática; N, número de indivíduos analisados; DP, desvio-padrão; p* - ajustado para duração de diabetes.

Na coluna dos genótipos GG+CC, não se observaram diferenças estatisticamente significativas para os parâmetros estudados.

Na coluna do genótipo GC, verificaram-se diferenças estatisticamente significativas para os parâmetros: VGM, leucócitos, rácio monócitos/C-HDL e malondialdeído.

- **VGM:** os indivíduos diabéticos do grupo sem angiopatia e com o genótipo GC apresentam valores mais elevados em comparação com os indivíduos diabéticos do grupo com angiopatia. Para os indivíduos do grupo II portadores do genótipo GC, em relação a este parâmetro, parece ser um fator de risco para doença angiopática, independentemente dos anos de duração de diabetes.

- **Leucócitos:** os indivíduos do grupo I com o genótipo GC apresentam valores mais elevados relativamente aos indivíduos do grupo II. Para os indivíduos do grupo II portadores do genótipo GC, em relação a este parâmetro, parece ser um fator de proteção para doença angiopática, independentemente dos anos de duração de diabetes.
- **Rácio monócitos/C-HDL:** os indivíduos do grupo II com o genótipo GC apresentam valores mais elevados em relação aos indivíduos do grupo I. Para os indivíduos do grupo II portadores do genótipo GC, em relação a este parâmetro, parece ser um fator de risco para doença angiopática, independentemente dos anos de duração de diabetes.
- **Malondialdeído:** os indivíduos diabéticos do grupo com angiopatia e com o genótipo GC apresentam valores mais elevados relativamente aos indivíduos do grupo II. Para os indivíduos do grupo II portadores do genótipo GC, em relação a este parâmetro, parece ser um fator de proteção para doença angiopática, independentemente dos anos de duração de diabetes.

4.9.2. Associação do polimorfismo -238 GA do TNF- α com os parâmetros bioquímicos e celulares e os grupos estudados

Recorreu-se ao teste t-student para identificar possíveis associações entre os parâmetros bioquímicos com os grupos para os diferentes modelos genéticos (**Tabelas 32, 33**).

Tabela 32. Associação dos parâmetros bioquímicos com a doença para o alelo A do polimorfismo -238 GA do TNF- α .

Parâmetros	Grupo	TNF- α											
		GA+AA				OR [IC 95%]	p^*	GG				OR [IC 95%]	p^*
		N	Média	DP	p			N	Média	DP	p		
CHGM	GI	3	34,6	2,45	0,454	-----	-----	13	34,4	0,67	0,024	0,141 [0,028-0,723]	0,019
	GII	4	33,4	1,38				21	33,7	1,12			
PCR	GI	2	9,69	1,83	0,006	NA	NA	11	4,17	2,38	0,971	-----	-----
	GII	3	1,50	0,84				19	4,22	3,88			

Os resultados estão expressos em número de indivíduos, média e desvio-padrão. Grupo I – DMT2 com angiopatia; Grupo II – DMT2 sem angiopatia; CHGM, concentração de hemoglobina globular média; PCR, proteína C-reativa; N, número de indivíduos analisados; DP, desvio-padrão; p^* - ajustado para duração de diabetes; NA – não aplicável.

Na coluna dos genótipos GA+AA, verificou-se uma diferença estatisticamente significativa para o parâmetro PCR.

- **PCR:** os indivíduos diabéticos do grupo com angiopatia e com os genótipos GA+AA apresentam valores mais elevados em comparação com os indivíduos diabéticos do grupo sem angiopatia. Não foi possível obter os valores de *odd ratio* e valor de p ajustado para a duração da diabetes *mellitus*, provavelmente devido ao tamanho reduzido da amostra.

Na coluna do genótipo GG, verificou-se uma diferença estatisticamente significativa para o parâmetro concentração de hemoglobina globular média.

- **Concentração de hemoglobina globular média:** os indivíduos diabéticos do grupo com angiopatia e com o genótipo GG apresentam valores mais elevados relativamente aos indivíduos do grupo II. Para os indivíduos do grupo II portadores do genótipo

GG, em relação a este parâmetro, parece ser um fator de proteção para doença angiopática, dependente dos anos de duração de diabetes.

Tabela 33. Associação dos parâmetros bioquímicos com a doença para o genótipo GA do polimorfismo -238 GA do TNF- α .

Parâmetros	Grupo	TNF- α												
		GG+AA					OR [IC 95%]	p^*	GA				OR [IC 95%]	p^*
		N	Média	DP	p	N			Média	DP	p			
CHGM	GI	13	34,4	0,67	0,024	0,141 [0,028-0,723]	0,019	3	34,6	2,45	0,454	-----	-----	
	GII	21	33,7	1,12				4	33,4	1,38				
PCR	GI	11	4,17	2,38	0,971	-----	-----	2	9,69	1,83	0,006	NA	NA	
	GII	13	4,22	3,88				3	1,50	0,84				

Os resultados estão expressos em número de indivíduos, média e desvio-padrão. Grupo I – DMT2 com angiopatia; Grupo II – DMT2 sem angiopatia; CHGM, concentração de hemoglobina globular média; PCR, proteína C-reativa; N, número de indivíduos analisados; DP, desvio-padrão; p^* - ajustado para duração de diabetes; NA – não aplicável.

Na coluna dos genótipos GG+AA, verificou-se uma diferença estatisticamente significativa para o parâmetro concentração de hemoglobina globular média.

- **Concentração de hemoglobina globular média:** os indivíduos diabéticos do grupo com angiopatia e com os genótipos GG+AA apresentam valores mais elevados relativamente aos indivíduos do grupo II. Para os indivíduos do grupo II portadores dos genótipos GG+AA, em relação a este parâmetro, parece ser um fator de proteção para doença angiopática, dependente dos anos de duração de diabetes.

Na coluna do genótipo GA, verificou-se uma diferença estatisticamente significativa para o parâmetro PCR.

- **PCR:** os indivíduos diabéticos do grupo com angiopatia e com o genótipo GA apresentam valores mais elevados em comparação com os indivíduos diabéticos do grupo sem angiopatia. Não foi possível obter os valores de *odd ratio* e valor de *p* ajustado para a duração da diabetes *mellitus*, provavelmente devido ao tamanho reduzido da amostra.

4.9.3. Associação do polimorfismo -374 TA do RAGE com os parâmetros bioquímicos e celulares e os grupos estudados

Recorreu-se ao teste t-student para identificar possíveis associações entre os parâmetros bioquímicos com os grupos para os diferentes modelos genéticos (**Tabelas 34, 35**).

Tabela 34. Associação dos parâmetros bioquímicos com a doença para o alelo T do polimorfismo -374 TA do RAGE.

Parâmetros	Grupo	RAGE												
		TT+TA					OR [IC 95%]	p*	AA				OR [IC 95%]	p*
		N	Média	DP	p	N			Média	DP	p			
CHGM	GI	7	34,3	1,23	0,474	-----	-----	6	34,6	1,33	0,020	0,099 [0,008-1,166]	0,066	
	GII	9	33,9	1,06				10	33,1	0,96				
Leucócitos	GI	7	8,97	1,26	0,033	0,283 [0,072-1,110]	0,070	6	8,38	3,30	0,347	-----	-----	
	GII	9	7,26	1,56				10	7,20	1,60				
Monócitos	GI	7	344	64,3	0,034	1,012 [0,996-1,029]	0,151	6	454	75,6	0,439	-----	-----	
	GII	9	466	124				10	421	84,1				
Rácio Monócitos/ C-HDL	GI	7	6,41	1,75	0,005	3,297 [0,942-11,533]	0,062	6	9,33	3,28	0,339	-----	-----	
	GII	9	9,65	2,04				10	8,02	2,06				
Triglicéridos	GI	9	156	52,5	0,109	-----	-----	13	212	89,2	0,065	-----	-----	
	GII	10	215	93,7				12	144	84,7				

Os resultados estão expressos em número de indivíduos, média e desvio-padrão. Grupo I – DMT2 com angiopatia; Grupo II – DMT2 sem angiopatia; CHGM, concentração de hemoglobina globular média; C-HDL, colesterol das lipoproteínas de alta densidade plasmática; N, número de indivíduos analisados; DP, desvio-padrão; p* - ajustado para duração de diabetes.

Na coluna dos genótipos TT+TA, verificaram-se diferenças estatisticamente significativas para os parâmetros: leucócitos, monócitos e rácio monócitos/C-HDL.

- **Leucócitos:** os indivíduos diabéticos do grupo com angiopatia e com os genótipos TT+TA apresentam valores mais elevados comparativamente aos indivíduos do grupo II. Para os indivíduos do grupo II portadores dos genótipos TT+TA, em relação a este parâmetro, parece ser um fator de proteção para doença angiopática, independentemente dos anos de duração de diabetes.

- **Monócitos:** os indivíduos diabéticos do grupo sem angiopatia e com os genótipos TT+TA apresentam valores mais elevados em comparação com os indivíduos diabéticos do grupo com angiopatia. Para os indivíduos do grupo II portadores dos genótipos TT+TA, em relação a este parâmetro, parece ser um fator de risco para doença angiopática, independentemente dos anos de duração de diabetes.
- **Rácio monócitos/C-HDL:** os indivíduos diabéticos do grupo com angiopatia e com os genótipos TT+TA apresentam valores mais baixos relativamente aos indivíduos do grupo II. Para os indivíduos do grupo II portadores dos genótipos TT+TA, em relação a este parâmetro, parece ser um fator de risco para doença angiopática, dependente dos anos de duração de diabetes.

Na coluna do genótipo AA, verificou-se uma diferença estatisticamente significativa para o parâmetro: concentração de hemoglobina globular média, contudo, o parâmetro triglicéridos apresenta uma tendência para ser estatisticamente significativo.

- **Concentração de hemoglobina globular média:** os indivíduos diabéticos do grupo com angiopatia e com o genótipo AA apresentam valores mais elevados em comparação com os indivíduos diabéticos do grupo sem angiopatia. Para os indivíduos do grupo II portadores do genótipo AA, em relação a este parâmetro, parece ser um fator de proteção para doença angiopática, independentemente dos anos de duração de diabetes.

Tabela 35. Associação dos parâmetros bioquímicos com a doença para o genótipo TA do polimorfismo -374 TA do RAGE.

Parâmetros	Grupo	RAGE											
		TT+AA				OR [IC 95%]	p*	TA				OR [IC 95%]	p*
		N	Média	DP	p			N	Média	DP	p		
VGM	GI	7	85,9	2,59	0,909	-----	-----	6	83,9	2,89	0,031	1,780 [0,822-3,853]	0,143
	GII	12	85,7	3,82				7	89,6	4,94			
CHGM	GI	7	34,7	1,22	0,040	0,246 [0,051-1,192]	0,082	6	34,2	1,31	0,356	-----	-----
	GII	12	33,4	1,15				7	33,6	0,95			
Leucócitos	GI	7	8,29	3,02	0,496	-----	-----	6	9,18	1,24	0,003	NA	NA
	GII	12	7,54	1,72				7	6,69	1,06			
Eosinófilos	GI	7	185	77,4	0,061	-----	-----	6	163	103	0,275	-----	-----
	GII	12	126	52,5				7	109	38,8			
Monócitos	GI	7	443	74,9	0,857	-----	-----	6	339	68,6	0,064	-----	-----
	GII	12	435	98,6				7	454	121			
Rácio Monócitos/ C-HDL	GI	7	9,25	3,00	0,470	-----	-----	6	6,01	1,54	0,009	2,946 [0,867-10,005]	0,083
	GII	12	8,39	2,07				7	9,47	2,29			

Os resultados estão expressos em número de indivíduos, média e desvio-padrão. Grupo I – DMT2 com angiopatia; Grupo II – DMT2 sem angiopatia; VGM, volume globular médio; CHGM, concentração de hemoglobina globular média; C-HDL, colesterol das lipoproteínas de alta densidade plasmática; N, número de indivíduos analisados; DP, desvio-padrão; p* - ajustado para duração de diabetes; NA – não aplicável.

Na coluna dos genótipos TT+AA, verificou-se uma diferença estatisticamente significativa para o parâmetro: concentração de hemoglobina globular média, contudo, o parâmetro eosinófilos apresenta uma tendência para ser estatisticamente significativo.

- **Concentração de hemoglobina globular média:** os indivíduos diabéticos do grupo com angiopatia e com os genótipos TT+AA apresentam valores mais elevados em comparação com os indivíduos diabéticos do grupo II. Para os indivíduos do grupo II

portadores dos genótipos TT+AA, em relação a este parâmetro, parece ser um fator de proteção para doença angiopática, independentemente dos anos de duração de diabetes.

Na coluna do genótipo TA, verificaram-se diferenças estatisticamente significativas para os parâmetros: VGM, leucócitos e rácio monócitos/C-HDL, no entanto, o parâmetro monócitos apresenta uma tendência para ser estatisticamente significativo.

- **VGM:** os indivíduos diabéticos do grupo II com o genótipo TA apresentam valores mais elevados comparativamente aos indivíduos do grupo I. Para os indivíduos do grupo II portadores do genótipo TA, em relação a este parâmetro, parece ser um fator de risco para doença angiopática, independentemente dos anos de duração de diabetes.
- **Leucócitos:** os indivíduos diabéticos do grupo com angiopatia e com o genótipo TA apresentam valores mais elevados relativamente aos indivíduos do grupo II. Não foi possível obter os valores de *odd ratio* e valor de *p* ajustado para a duração da diabetes *mellitus*, provavelmente devido ao tamanho reduzido da amostra.
- **Rácio monócitos/C-HDL:** os indivíduos diabéticos do grupo com angiopatia e com o genótipo TA apresentam valores mais baixos em relação aos indivíduos do grupo II. Para os indivíduos do grupo II portadores do genótipo TA, em relação a este parâmetro, parece ser um fator de risco para doença angiopática, independentemente dos anos de duração de diabetes.

4.9.4. Associação do polimorfismo -413 TA da HMOX-1 com os parâmetros bioquímicos e celulares e os grupos estudados

Recorreu-se ao teste t-student para identificar possíveis associações entre os parâmetros bioquímicos com os grupos para os diferentes modelos genéticos (**Tabelas 36, 37**).

Tabela 36. Associação dos parâmetros bioquímicos com a doença para o alelo T do polimorfismo -413 TA da HMOX-1.

Parâmetros	Grupo	HMOX-1											
		TT+TA				OR [IC 95%]	p*	AA				OR [IC 95%]	p*
		N	Média	DP	p			N	Média	DP	p		
CHGM	GI	9	34,9	1,07	0,021	0,127 [0,014-1,153]	0,067	6	34,1	1,56	0,767	-----	-----
	GII	13	33,7	1,16				5	33,8	1,53			
Plaquetas	GI	9	306	65,2	0,229	-----	-----	6	328	51,0	0,020	0,030 [0,000-1,861E+283]	0,992
	GII	13	271	63,0				5	251	36,4			
Leucócitos	GI	9	9,34	2,30	0,048	0,362 [0,126-1,045]	0,060	6	9,00	1,60	0,051	-----	-----
	GII	13	7,35	2,08				5	6,87	1,05			
Neutrófilos	GI	9	4055	628	0,790	-----	-----	6	4465	435	0,043	0,993 [0,973-1,013]	0,477
	GII	13	3984	581				5	3737	595			
Linfócitos	GI	9	2174	538	0,902	-----	-----	6	1721	331	0,011	1,286 [0,000-1,018E+24]	0,993
	GII	13	2200	459				5	2580	557			
Rácio Neutrófilos/ Linfócitos	GI	9	2,08	1,00	0,818	-----	-----	6	2,74	0,94	0,052	-----	-----
	GII	13	1,98	0,94				5	1,58	0,75			
Rácio Neutrófilos X Plaquetas/ Linfócitos	GI	9	678	464	0,564	-----	-----	6	888	258	0,013	0,492 [0,000-2,231E+42]	0,989
	GII	13	567	416				5	409	257			
Rácio Monócitos/ Linfócitos	GI	9	0,18	0,06	0,568	-----	-----	6	0,22	0,05	0,015	0,000 [0,000-5,708E+25]	0,202
	GII	13	0,20	0,04				5	0,13	0,05			
Creatinina	GI	9	0,94	0,14	0,120	-----	-----	7	1,32	0,36	0,038	NA	NA
	GII	15	1,07	0,21				5	0,92	0,14			

Os resultados estão expressos em número de indivíduos, média e desvio-padrão. Grupo I – DMT2 com angiopatia; Grupo II – DMT2 sem angiopatia; CHGM, concentração de hemoglobina globular média; N, número de indivíduos analisados; DP, desvio-padrão; p* - ajustado para duração de diabetes; NA – não aplicável.

Na coluna dos genótipos TT+TA, verificaram-se diferenças estatisticamente significativas para os parâmetros: CHGM e leucócitos.

- **Concentração de hemoglobina globular média:** os indivíduos diabéticos do grupo com angiopatia e com os genótipos TT+TA apresentam valores mais elevados em comparação com os indivíduos diabéticos do grupo II. Para os indivíduos do grupo II portadores dos genótipos TT+TA, em relação a este parâmetro, parece ser um fator de proteção para doença angiopática, dependente dos anos de duração de diabetes.
- **Leucócitos:** os indivíduos diabéticos do grupo I com os genótipos TT+TA apresentam valores mais elevados em relação aos indivíduos diabéticos do grupo II. Para os indivíduos do grupo II portadores dos genótipos TT+TA, em relação a este parâmetro, parece ser um fator de proteção para doença angiopática, dependente dos anos de duração de diabetes.

Na coluna do genótipo AA, verificaram-se diferenças estatisticamente significativas para os parâmetros: plaquetas, leucócitos, neutrófilos, linfócitos, rácio neutrófilos x plaquetas/linfócitos, rácio monócitos/linfócitos e creatinina, embora, o parâmetro rácio neutrófilos/linfócitos apresente uma tendência para ser estatisticamente significativo.

- **Plaquetas:** os indivíduos diabéticos do grupo I com o genótipo AA apresentam valores mais elevados em relação aos indivíduos diabéticos do grupo sem angiopatia. Para os indivíduos do grupo II portadores do genótipo AA, em relação a este parâmetro, parece ser um fator de proteção para doença angiopática, independentemente dos anos de duração de diabetes.
- **Neutrófilos:** os indivíduos diabéticos do grupo com angiopatia e com o genótipo AA apresentam valores mais elevados em comparação com os indivíduos diabéticos do grupo II. Para os indivíduos do grupo II portadores do genótipo AA, em relação a este parâmetro, parece ser um fator de proteção para doença angiopática, independentemente dos anos de duração de diabetes.

- **Linfócitos:** os indivíduos diabéticos do grupo com angiopatia e com o genótipo AA apresentam valores mais baixos comparativamente com os indivíduos diabéticos do grupo sem angiopatia. Para os indivíduos do grupo II portadores do genótipo AA, em relação a este parâmetro, parece ser um fator de risco para doença angiopática, independentemente dos anos de duração de diabetes.
- **Rácio neutrófilos x plaquetas/linfócitos:** os indivíduos diabéticos do grupo I com o genótipo AA apresentam valores mais elevados em relação aos indivíduos diabéticos do grupo sem angiopatia. Para os indivíduos do grupo II portadores do genótipo AA, em relação a este parâmetro, parece ser um fator de proteção para doença angiopática, independentemente dos anos de duração de diabetes.
- **Rácio monócitos/linfócitos:** os indivíduos diabéticos do grupo com angiopatia e com o genótipo AA apresentam valores mais elevados em comparação com os indivíduos do grupo II. Para os indivíduos do grupo II portadores do genótipo AA, em relação a este parâmetro, parece ser um fator de proteção para doença angiopática, independentemente dos anos de duração de diabetes.
- **Creatinina:** os indivíduos diabéticos do grupo I e com o genótipo AA apresentam valores mais elevados em relação aos indivíduos do grupo II. Não foi possível obter os valores de *odd ratio* e valor de *p* ajustado para a duração da diabetes *mellitus*, provavelmente devido ao tamanho reduzido da amostra.

Tabela 37. Associação dos parâmetros bioquímicos com a doença para o genótipo TA do polimorfismo -413 TA da HMOX-1.

Parâmetros	Grupo	HMOX-1											
		TT+AA				OR [IC 95%]	<i>p</i> *	TA				OR [IC 95%]	<i>p</i> *
		N	Média	DP	<i>p</i>			N	Média	DP	<i>p</i>		
Plaquetas	GI	7	309	67,3	0,194	-----	-----	8	319	55,0	0,065	-----	-----
	GII	12	269	59,0				6	258	56,1			
Leucócitos	GI	7	8,58	1,83	0,155	-----	-----	8	9,75	2,08	0,018	0,097 [0,001-9,945]	0,324
	GII	12	7,10	2,22				6	7,47	0,73			
Linfócitos	GI	7	1810	383	0,049	1,012 [0,995-1,029]	0,168	8	2152	571	0,662	-----	-----
	GII	12	2322	565				6	2274	392			
C-HDL	GI	15	43,2	9,03	0,012	1,136 [1,010-1,278]	0,034	13	52,8	16,0	0,147	-----	-----
	GII	18	54,2	14,5				9	45,2	6,88			
Triglicéridos	GI	15	208	89,5	0,020	0,989 [0,977-1,001]	0,071	13	188	90,9	0,824	-----	-----
	GII	17	140	68,0				9	179	89,9			
Malondialdeído	GI	15	3,00	0,84	0,015	0,341 [0,108-1,083]	0,068	14	2,57	0,79	0,551	-----	-----
	GII	18	2,34	0,64				10	2,76	0,69			

Os resultados estão expressos em número de indivíduos, média e desvio-padrão. Grupo I – DMT2 com angiopatia; Grupo II – DMT2 sem angiopatia; C-HDL, colesterol das lipoproteínas de alta densidade plasmática; N, número de indivíduos analisados; DP, desvio-padrão; *p** - ajustado para duração de diabetes.

Na coluna dos genótipos TT+AA, verificaram-se diferenças estatisticamente significativas para os parâmetros: linfócitos, C-HDL, triglicéridos e malondialdeído.

- **Linfócitos:** os indivíduos diabéticos do grupo com angiopatia e com os genótipos TT+AA apresentam valores mais baixos em comparação com os indivíduos diabéticos do grupo II. Para os indivíduos do grupo II portadores dos genótipos TT+AA, em relação a este parâmetro, parece ser um fator de risco para doença angiopática, independentemente dos anos de duração de diabetes.

- **C-HDL:** os indivíduos diabéticos do grupo com angiopatia e com os genótipos TT+AA apresentam valores mais baixos em relação aos indivíduos diabéticos do grupo sem angiopatia. Para os indivíduos do grupo II portadores dos genótipos TT+AA, em relação a este parâmetro, parece ser um fator de risco para doença angiopática, independentemente dos anos de duração de diabetes.
- **Triglicéridos:** os indivíduos diabéticos do grupo I e com os genótipos TT+AA apresentam valores mais elevados comparativamente com os indivíduos diabéticos do grupo II. Para os indivíduos do grupo II portadores dos genótipos TT+AA, em relação a este parâmetro, parece ser um fator de proteção para doença angiopática, dependente dos anos de duração de diabetes.
- **Malondialdeído:** os indivíduos diabéticos do grupo I com os genótipos TT+AA apresentam valores mais elevados relativamente aos indivíduos diabéticos do grupo sem angiopatia. Para os indivíduos do grupo II portadores dos genótipos TT+AA, em relação a este parâmetro, parece ser um fator de proteção para doença angiopática, dependente dos anos de duração de diabetes.

Na coluna do genótipo TA, verificou-se uma diferença estatisticamente significativa para o parâmetro leucócitos. Contudo, o parâmetro plaquetas apresenta uma tendência para ser estatisticamente significativo.

- **Leucócitos:** os indivíduos diabéticos do grupo com angiopatia e com o genótipo TA apresentam valores mais elevados em comparação com os indivíduos diabéticos do grupo sem angiopatia. Para os indivíduos do grupo II portadores do genótipo TA, em relação a este parâmetro, parece ser um fator de proteção para doença angiopática, independentemente dos anos de duração de diabetes.

5. DISCUSSÃO

Como já referido anteriormente neste trabalho, os indivíduos com DMT2 apresentam um risco aumentado de complicações vasculares (107). A inflamação crónica sistémica de baixo grau – característica da DMT2 – desempenha um papel importante nas complicações associadas à diabetes *mellitus* (42). A literatura científica tem indicado que o *stress* oxidativo, a inflamação vascular e a disfunção endotelial são fatores fisiopatológicos relacionados com a DMT2, podendo contribuir para o desenvolvimento de DCV (50). A disfunção das células endoteliais e musculares lisas levam a uma modificação da homeostase vascular, tornando-se numa condição pró-inflamatória (107). As células inflamatórias contribuem para o início e progressão da lesão aterosclerótica (42). Os macrófagos e os monócitos são considerados os tipos de células mais importantes na secreção de citocinas pró-inflamatórias e pró-oxidantes no local da inflamação (108).

Adicionalmente, a anemia está associada a um maior risco cardiovascular em indivíduos com DMT2, contribuindo para o desenvolvimento e progressão das complicações micro e macrovasculares da diabetes (56,57).

5.1. Frequências e distribuição dos genótipos na população diabética estudada

O presente trabalho mostrou que os pacientes com DMT2 e angiopatia apresentaram duração da doença significativamente maior, comparativamente com os pacientes com DMT2 sem angiopatia (GI: $19,4 \pm 9,33$ anos vs. GII: $13,6 \pm 7,92$ anos; $p=0,000$) (**Tabela 6**). Estes resultados vão de encontro ao verificado em Shawki HA, Elzehery R, Shahin M, *et al.*, cuja duração da doença foi significativamente superior no grupo dos pacientes diabéticos com retinopatia diabética ($21,3 \pm 10,9$ anos) relativamente ao grupo de indivíduos diabéticos sem complicações angiopáticas ($8,7 \pm 2,3$ anos) (109).

Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas nas frequências genóticas dos polimorfismos estudados IL-6 -174 GC, TNF- α -238 GA, RAGE -374 TA e HMOX-1 -413 TA, entre o grupo I e o grupo II (**Tabela 10**). Tendo-se

verificado a mesma situação para a comparação das frequências genóticas entre a população estudada e as populações europeia, espanhola e italiana (**Tabela 9**).

A **Tabela 10** apresenta os dados da frequência e distribuição dos polimorfismos estudados por grupos. Relativamente ao polimorfismo **IL-6 -174 GC**, os pacientes com DMT2 e angiopatia apresentaram maior frequência do genótipo GC (51,1%), tal como no grupo de pacientes com DMT2 sem angiopatia onde houve maior frequência do genótipo GC (48,9%). De seguida, observou-se maior prevalência em ambos os grupos do genótipo GG, sendo que o grupo I apresentou cerca de 36,2% e o grupo II 44,4%. Por último, o genótipo CC apresentou menor prevalência, cerca de 12,7% no grupo I e 6,70% no grupo II. Foi desenvolvido um estudo por Buraczynska M, Zukowski P, Drop B, *et al.* (73) numa população polaca incluindo 1.090 indivíduos com DMT2 dos quais 738 com uma ou uma combinação de vários estados patológicos, nomeadamente, doença cardíaca isquémica (doença coronária crónica e/ou síndrome coronária aguda), insuficiência cardíaca congestiva, acidente vascular cerebral isquémico ou arteriopatia, 352 indivíduos com DMT2 sem doença cardiovascular e ainda 612 controlos saudáveis. Observou-se que no grupo diabético com DCV havia 19% GG, 56% GC e 25% CC, e no grupo diabético sem DCV havia 51% GG, 34% GC e 15% CC (73). Verificam-se algumas diferenças na distribuição comparando com a população do presente estudo, que poderão ser justificadas pelo facto da população estudada no presente trabalho ser essencialmente constituída por indivíduos com microangiopatia, ao contrário deste estudo na população polaca que é composto por indivíduos com macroangiopatia, e além disso, o tamanho amostral do presente estudo é menor face ao estudo na população polaca. Ainda num outro estudo, os resultados do presente trabalho vão de encontro aos resultados obtidos por Lu QK, Zhang JT, Zhao N, *et al.* (77) num estudo realizado numa população chinesa em 215 pacientes com DMT2 e retinopatia diabética e em 207 pacientes com DMT2 sem retinopatia diabética. Onde as frequências genóticas observadas foram de 29,8% GG, 54,9% GC e 15,3% CC para o grupo com retinopatia diabética. E para o grupo sem retinopatia diabética, verificou-se que 37,7% GG, 42,0% GC e 20,3% CC (77). Tanto numa população caucasiana como numa população chinesa, os resultados obtidos são

bastante semelhantes. Os indivíduos com DMT2 apresentam níveis aumentados de IL-6 comparativamente a indivíduos sem DMT2 (74). Sugere-se que o facto de existirem níveis aumentados de IL-6 em pacientes com DMT2 e retinopatia diabética, que o processo inflamatório possa desempenhar um papel importante na patogénese da retinopatia diabética (77).

Em relação ao polimorfismo **TNF- α -238 GA**, as frequências genotípicas observadas foram de 85,7% GG, 14,3% GA e de 0,0% AA para o grupo I, e de 83,8% GG, 16,2% GA e de 0,0% AA para o grupo II (**Tabela 10**). Estes resultados corroboram os resultados obtidos num estudo desenvolvido por Sesti LFC, Crispim M, Canani LH, *et al.* (110) numa população brasileira que incluiu 228 indivíduos com DMT2 e retinopatia diabética e 308 indivíduos com DMT2 sem retinopatia diabética. Sendo que as frequências genotípicas observadas foram de 88,6% GG, 10,5% GA e 0,9% AA para o grupo com retinopatia diabética. E para o grupo sem retinopatia diabética, verificou-se que 89,9% GG, 9,1% GA e 1,0% AA (110). Os resultados do presente estudo corroboram igualmente os resultados obtidos num outro estudo desenvolvido por Fathy SA, Mohamed MR, Ali MAM, *et al.* (111) numa população do Kuwait que incluiu 67 indivíduos com DMT2 e nefropatia diabética e 50 indivíduos com DMT2 sem nefropatia diabética. Onde as frequências genotípicas observadas foram de 98,5% GG, 1,5% GA e 0,0% AA para o grupo com nefropatia diabética. E para o grupo sem nefropatia diabética, verificou-se que 98,0% GG, 2,0% GA e 0,0% AA. Também num outro estudo realizado por Paine SK, Sem A, Choudhuri S, *et al.* (112) numa população indiana com 253 indivíduos com DMT2 e retinopatia diabética e 240 indivíduos com DMT2 sem retinopatia, as frequências genotípicas foram semelhantes. No grupo com retinopatia diabética observou-se que houve 51,38% com o genótipo GG, 36,36% com o genótipo GA e 12,25% com o genótipo homocigótico AA. No grupo sem retinopatia diabética verificou-se que houve 70,83% com o genótipo GG, 26,25% com o genótipo GA e 2,91% com o genótipo AA (112). Nos quatro estudos, verifica-se que a distribuição e frequências genotípicas são semelhantes entre si.

As frequências genotípicas para o polimorfismo **RAGE -374 TA** para o grupo I foram de 4,40% TT, 39,1% TA e 56,5% AA. Para o grupo II, as frequências foram de 9,10%, 36,4% TA TT e 54,5% AA (**Tabela 10**). Num estudo desenvolvido por

Kirbis J, Milutinovic A, Steblovnik K, *et al.* (113) numa população eslovena com 409 indivíduos com DMT2, dos quais 168 indivíduos tinham doença arterial coronária e 241 indivíduos não sofriam desta patologia cardíaca, verificou-se que no grupo diabético com doença arterial coronária houve 44,1% TT, 48,2% TA e 7,7% AA. No grupo diabético sem doença arterial coronária houve 45,6% TT, 43,2% TA e 11,2% AA (113). Os resultados obtidos no presente trabalho não vão de encontro dos resultados do estudo realizado na população eslovena, podendo ser justificado através da predominância da doença microangiopática no caso no nosso estudo, ao contrário do estudo na população eslovena que é essencialmente constituída por indivíduos com macroangiopatia, para além disso, pode também ser justificado pelo tamanho amostral ou por diferenças na distribuição do gene na população.

Para a **HMOX-1 -413 TA**, as frequências genotípicas observadas para o grupo I foram de 13,8% TT, 48,3% TA e 37,9% AA. Para o grupo II foram de 35,7% TT, 35,7% TA e 28,6% AA (**Tabela 10**). Um estudo levado a cabo por Lee EY, *et al.* (97) teve como objetivo estudar a associação entre o polimorfismo rs2071746 da HMOX-1 e a nefropatia diabética numa população sul coreana, utilizando a presença de albuminúria como marcador de nefropatia diabética. Foram incluídos 536 indivíduos com DMT2, dos quais 239 com albuminúria e 297 sem albuminúria. Verificou-se que no grupo diabético com albuminúria houve 35,6% TT, 39,7% TA e 24,7% AA, e no grupo diabético sem albuminúria houve 25,9% TT, 51,5% TA e 22,6% AA (97). Os resultados obtidos neste trabalho não vão de encontro dos resultados do estudo realizado na população sul coreana, sendo que o tamanho amostral e a diferença de etnias poderão justificar a diferença na distribuição e frequências genotípicas, além de que a amostra da população sul coreana mostra ser mais homogénea do que a amostra do nosso trabalho.

5.2. Associação entre os parâmetros bioquímicos e celulares e os grupos estudados

De todos os parâmetros bioquímicos e celulares estudados, apenas foram observadas diferenças estatisticamente significativas para os parâmetros malondialdeído e homocisteína ($p=0,010$ e $p=0,022$, respetivamente).

Em ambos os grupos, verificou-se a existência de uma correlação direta entre a HbA1c e a glicémia ocasional (GI: $r=+0,361$; $p=0,039$ vs GII: $r=+0,326$; $p=0,046$) (**Tabela 38 e 40**). A concentração de HbA1c reflete a média da concentração de glucose plasmática durante as semanas antecedentes, sendo utilizada para avaliar o controlo metabólico da diabetes a longo prazo (3,26). O facto de nos dois grupos existirem correlações diretas entre estes dois parâmetros demonstra que a HbA1c está de acordo com as glicémias ocasionais mantidas, o que seria de esperar pois trata-se de indivíduos diabéticos.

Observou-se a existência de diferenças estatisticamente significativas para a homocisteína ($p=0,022$) entre o grupo com DMT2 e angiopatia e o grupo com DMT2 sem angiopatia, onde o grupo I apresentou níveis mais elevados de homocisteína em relação ao grupo II (GI: $11,0 \pm 4,90 \mu\text{mol/L}$ vs. GII: $9,26 \pm 4,62 \mu\text{mol/L}$). De ressaltar que, estes são valores médios e que apresentam diferenças estatisticamente significativas entre grupos, mas nenhum destes valores está classificado dentro da hiperhomocisteinémia, pois não estão acima de $15 \mu\text{mol/L}$. Existirão pessoas que estão acima ou abaixo de $15 \mu\text{mol/L}$ nestes dois grupos, mas os dados apresentados são valores médios. Vários estudos têm referido que a homocisteína é considerada um fator de risco independente para doenças cardiovasculares (114). Os efeitos adversos da homocisteína aumentada envolvem modificação da função endotelial devido ao stress oxidativo, redução da produção de óxido nítrico, diminuição da vasodilatação e aumento da proliferação de células musculares lisas (115). Estes resultados corroboram os resultados de um estudo realizado por Goldstein M, Leibovitch I, Yeffimov I, *et al.* (116) com 179 pacientes diabéticos tipo 2, sendo que 62 não tinham retinopatia diabética, 71 tinham retinopatia diabética não proliferativa e 46 tinha retinopatia diabética proliferativa, e um grupo controlo com 156 pacientes sem diabetes. Constatou-se que os níveis médios de homocisteína foram mais elevados nos grupos com retinopatia proliferativa ($15,86 \pm 1,34 \mu\text{mol/L}$) e não proliferativa ($14,56 \pm 0,64 \mu\text{mol/L}$), comparando com o grupo sem retinopatia diabética ($13,46 \pm 0,74 \mu\text{mol/L}$). A homocisteína é tóxica para o endotélio vascular e pode originar um agravamento do estado hipóxico na retina, como é observado na retinopatia diabética. Níveis plasmáticos elevados de homocisteína em indivíduos diabéticos podem acelerar as alterações

microvasculares da retina e contribuir para a gravidade da retinopatia diabética (116).

Também foi possível verificar a existência de diferenças estatisticamente significativas para o malondialdeído ($p=0,010$) entre o grupo com DMT2 e angiopatia e o grupo com DMT2 sem angiopatia, onde o grupo I apresentou níveis mais elevados de malondialdeído relativamente ao grupo II (grupo I: $2,92 \pm 0,76 \mu\text{mol/L}$ vs. grupo II: $2,58 \pm 0,72 \mu\text{mol/L}$). Existem diversos estudos que associam a diabetes *mellitus* com o aumento do processo inflamatório e níveis aumentados de *stress* oxidativo, e os níveis de malondialdeído costumam estar aumentados nestas pessoas, sendo este amplamente considerado como um bom biomarcador do *stress* oxidativo (109). Estes resultados obtidos estão de acordo com o descrito por Shawki HA, Elzebery R, Shahin M, *et al.* (109) num estudo realizado numa população do Egito que incluiu 110 indivíduos diabéticos, dos quais 70 indivíduos diabéticos com retinopatia diabética, 40 indivíduos diabéticos sem complicações angiopáticas e ainda 40 indivíduos saudáveis, em que se observou valores de malondialdeído superiores no grupo com retinopatia diabética ($18,6 \pm 3,67 \text{ nmol/mL}$) relativamente ao grupo sem retinopatia diabética ($12,0 \pm 4,99 \text{ nmol/mL}$) (109). Deve ser ressaltado que os valores de referência para os níveis de malondialdeído descritos na literatura apresentam grande variabilidade, devido a condições experimentais usadas nos estudos, daí existir diferenças nos valores obtidos no presente estudo e no estudo desenvolvido por Shawki HA, Elzebery R, Shahin M, *et al.* (117).

Observou-se também uma correlação direta entre malondialdeído e homocisteína em ambos os grupos (GI: $c=+0,327$; $p=0,004$ vs GII: $c=+0,448$; $p=0,000$). Sendo que a correlação direta no grupo II é mais forte do que a correlação do grupo I, o que poderá significar que no grupo com doença cardiovascular, existe menos homocisteína para dar origem a cisteína que por sua vez, origina o poderoso antioxidante glutatona, como tal, o grupo sem angiopatia terá menor processo oxidativo. O malondialdeído conduz ao aumento de homocisteína, e portanto, devido ao *stress* oxidante, haverá uma acumulação de homocisteína. Poderá também ser explicado pelo facto de a homocisteína acumular-se mais em função da falta de função da enzima metilenotetrahidrofolato redutase. Nestes grupos, grupo I e II, podem existir

proporções diferentes de indivíduos com o polimorfismo C677T da metilenotetrahidrofolato redutase (104). O facto de existir uma correlação direta superior no grupo de indivíduos com DMT2 sem angiopatia, é possivelmente justificado pelo facto de estes poderem ter mais a forma lenta da metilenotetrahidrofolato redutase. Provavelmente os níveis aumentados de homocisteína tem que ver com a relação com o *stress* oxidante que causa degradação do FAD (flavina adenina dinucleotídio, cofator de metilenotetrahidrofolato redutase) que inibe a metilenotetrahidrofolato redutase. Secundariamente ao *stress* oxidante, aumenta a homocisteína e este aumento está relacionado com o nível de *stress* oxidante que é medido pelo malondialdeído, daí a existência das correlações diretas entre malondialdeído e a homocisteína.

Verificou-se também uma correlação direta entre o parâmetro dos eritrócitos e malondialdeído no grupo I e uma correlação indireta entre o parâmetro dos eritrócitos e homocisteína no grupo II. Em relação à correlação do grupo I, estes parâmetros estão diretamente correlacionados, mas isso é um reflexo do facto de o *stress* oxidante afetar a produção de eritrócitos. No caso da correlação do grupo II, o aumento da homocisteína leva a uma menor produção de glóbulos vermelhos, ou seja, é concomitante com a redução da produção de eritrócitos. Isto poderá ser explicado por não existir reciclagem do ácido fólico, logo os indivíduos que têm mais acumulação de homocisteína, têm menor produção de eritrócitos.

5.3. Associação entre os parâmetros bioquímicos e celulares e os polimorfismos genéticos estudados por grupos

5.3.1. Polimorfismos pró-inflamatórios (RAGE, IL-6 e TNF- α)

Os polimorfismos pró-inflamatórios estudados foram o RAGE -374 TA, a IL-6 -174 GC e o TNF- α -238 GA.

A hiperglicemia crónica, característica da diabetes *mellitus* tipo 2, origina a formação e acumulação de AGEs que resultam em efeitos adversos, como alterações vasculares irreversíveis, mediados por recetores específicos (**RAGE**) que estão presentes na população não diabética, mas duas a cinco vezes

superiores em indivíduos diabéticos, sendo responsável pelo surgimento de complicações crônicas da diabetes. Devido aos efeitos pró-trombóticos e pró-inflamatórios, os polimorfismos de nucleotídeo único do RAGE (nomeadamente o polimorfismo em estudo, -374 TA) têm ganho importância como gene candidato para aterosclerose e outras patologias associadas (118).

Num estudo realizado por Picheth G, Costantini CO, Pedrosa FO, *et al.* (93) e também noutro estudo realizado por Yan SF, Ramasamy R, Schmidt AM (25), verificou-se que o alelo A do polimorfismo -374 TA do gene RAGE é protetor no desenvolvimento de doenças cardiovascular em pacientes diabéticos tipo 2 (25,93). Os resultados destes dois estudos corroboram os resultados do nosso estudo porque os indivíduos que obtiveram valores mais elevados de homocisteína, considerado fator de risco para doenças cardiovasculares, foram os indivíduos com o alelo T pertencentes ao grupo com angiopatia. Ao contrário do que seria de esperar, pois o alelo A do polimorfismo RAGE -374 TA está associado a maior expressão.

O parâmetro concentração de hemoglobina globular média parece ser um fator de proteção para doença angiopática, independentemente dos anos de duração de diabetes, para os indivíduos do grupo II portadores do genótipo AA, o que contradiz com o que seria esperado. Porque em teoria, os indivíduos com os genótipos TT+TA teriam mais proteção, pois o alelo A está associado a maior expressão, logo maior processo inflamatório. E os indivíduos do grupo I deveriam ter CHGM diminuída, porque têm maior processo inflamatório.

No que diz respeito ao parâmetro leucócitos, este parece ser um fator de proteção para doença angiopática, independentemente dos anos de duração de diabetes, para os indivíduos do grupo II portadores dos genótipos TT+TA, estando de acordo com o esperado. O alelo T está associado a expressão diminuída do polimorfismo RAGE -374 TA. Os indivíduos do grupo com angiopatia terão maior processo inflamatório e como tal valores de leucócitos superiores, indo ao encontro dos valores obtidos no presente trabalho.

Relativamente à **IL-6**, esta tem sido implicada no desenvolvimento da patogénese da DMT2, a desregulação da sinalização desta citocina tem sido envolvida na etiologia de diversas doenças autoimunes, nomeadamente, DMT2.

Indivíduos com DMT2 têm níveis significativamente mais elevados de IL-6 relativamente a indivíduos sem DMT2. Vários estudos têm associado a IL-6 a resistência à insulina, disfunção das células β e retinopatia diabética (119).

Parece existir um fator de risco para doença angiopática nos indivíduos sem angiopatia portadores do alelo G para os parâmetros glicémia ocasional, colesterol total e monócitos, independentemente dos anos de duração de diabetes. O alelo G está associado a maior expressão de IL-6, logo maior processo inflamatório. Um estudo de Papoikonomou S, Tousoulis D, Tentolouris N, *et al.* (74), que teve como objetivo avaliar a associação do polimorfismo rs1800795 da IL-6 na prevalência de alguma doença macrovascular em pacientes com DMT2, concluíram que os indivíduos portadores do alelo C do polimorfismo rs1800795 da IL-6 apresentaram menor probabilidade de sofrer complicações macrovasculares, comparando com os indivíduos portadores do alelo G. Deste modo, os nossos resultados estão de acordo com o esperado.

Observou-se uma relação estatisticamente significativa entre os indivíduos do grupo I com os genótipos GG+GC e valores mais elevados de leucócitos. A IL-6 é conhecida por ter ações pró-ateroscleróticas, nomeadamente, a promoção do recrutamento de leucócitos para o endotélio, contribuindo para uma resposta de fase aguda relacionada com a DMT2 (120). O alelo C do polimorfismo IL-6 -174 GC está associado a menor expressão/atividade de IL-6. Neste sentido, os indivíduos com angiopatia portadores do alelo G, terão valores mais elevados de leucócitos, corroborando com os resultados do presente estudo.

Verificou-se também que os indivíduos do grupo I com o genótipo GC estão associados a níveis mais baixos do rácio monócitos/colesterol HDL comparativamente com os indivíduos com o genótipo GG+CC. E este parâmetro aparenta funcionar como fator de proteção para maior progressão da doença angiopática nos indivíduos do grupo com angiopatia, independentemente dos anos de duração de diabetes. Os macrófagos e monócitos são o tipo de células mais importantes para a secreção de citocinas pró-inflamatórias e pró-oxidantes no local da inflamação (108). Pelo contrário, é sabido que o C-HDL é considerado protetor das células endoteliais porque estimula a libertação de óxido nítrico e aumenta a expressão de óxido nítrico sintase – enzima que cataliza a produção

de óxido nítrico – ao nível endotelial. Para além disso, o C-HDL interfere na oxidação de C-LDL e tem um efeito anti-trombótico pois reduz a expressão do fator tecidual em células endoteliais expostas a citocinas e diminui a ativação plaquetária. Também inibe a adesão de glóbulos brancos e reduz a expressão de moléculas de adesão, como molécula de adesão de células vasculares 1 (107). Recentemente, a razão monócito para C-HDL surgiu como um novo marcador prognóstico para doenças cardiovasculares (108) e por serem dados de fácil obtenção e de baixo custo (41,42). O aumento deste rácio monócito/C-HDL está associado à inflamação sistémica e à disfunção endotelial (121). Por outro lado, verificou-se também que, os indivíduos do grupo II portadores do genótipo GC, em relação a este parâmetro, parece ser um fator de risco para doença angiopática, independentemente dos anos de duração de diabetes. Neste caso, seria expectável que os indivíduos sem complicações cardiovasculares tivessem níveis mais baixos deste parâmetro, ao contrário do que é observado no presente estudo.

Para os indivíduos do grupo II portadores do genótipo GC, em relação a este parâmetro malondialdeído, parece ser um fator de proteção para doença angiopática, independentemente dos anos de duração de diabetes, além do mais, os indivíduos com angiopatia evidenciam valores mais elevados. O alelo G está associado a maior expressão de IL-6, logo maior processo inflamatório, como mostram os resultados do nosso trabalho.

No que diz respeito ao **TNF- α** , é uma citocina que promove o aumento de produção de moléculas de adesão, recrutamento de leucócitos, apoptose e quimioatração de monócitos. É responsável pela amplificação da resposta imune através da estimulação da expressão de diversos fatores de crescimento, de transcrição e outros mediadores inflamatórios. Os níveis de TNF- α costumam estar aumentados na retina de pacientes diabéticos, e também em indivíduos diabéticos com retinopatia diabética ou retinopatia diabética proliferativa, comparando com indivíduos saudáveis. Esta citocina está por isso correlacionada com a gravidade da retinopatia diabética em indivíduos com DMT2 (110).

Foi possível verificar que os indivíduos do grupo II com o genótipo GG estão associados a valores de eritrócitos ligeiramente mais elevados do que os

indivíduos com os genótipos GA+AA. O alelo G do polimorfismo TNF- α -238 GA está relacionado com menor atividade de TNF- α , por isso estes indivíduos terão menor processo inflamatório. Além disso, este parâmetro parece ser um fator de risco para doença angiopática nestes indivíduos, independentemente dos anos de duração de diabetes. Estes resultados são também explicados pela correlação direta que existe no grupo I entre malondialdeído e o parâmetro dos eritrócitos relacionado com a anemia, e que não existe no grupo II.

Os indivíduos do grupo I com o genótipo GG estão associados a valores ligeiramente mais elevados de concentração de hemoglobina globular média do que os indivíduos do grupo II, o que contradiz com o esperado, pois deveriam ser os indivíduos do grupo II a apresentar valores mais elevados deste parâmetro, por terem, à partida menor processo inflamatório. E os indivíduos do grupo I deveriam ter CHGM diminuída porque têm maior processo inflamatório, que prejudica o processo de hematopoiese, estando relacionado com a diminuição dos níveis séricos de ferro (122)

5.3.2. Polimorfismo anti-inflamatório (HMOX-1)

A **HMOX-1** é uma enzima microsossomal que limita a velocidade responsável pela oxidação e degradação do heme em metabolitos biologicamente ativos, nomeadamente, a biliverdina que é reduzida rapidamente a bilirrubina, monóxido de carbono e ferro (123). A HMOX-1 é ativada em condições de *stress* oxidativo. Num estudo realizado com um modelo animal com DMT2, é sugerido que ajuda a melhorar o controlo glicémico, reduz o *stress* oxidativo e aumenta o nível antioxidante. Como já referido, o controlo glicémico é um fator relevante a longo prazo para a DMT2 e pensa-se que o *stress* oxidativo seja a razão de algumas alterações a nível vascular que poderão levar a complicações diabéticas (124).

Verificou-se uma associação estatisticamente significativa entre os indivíduos do grupo I com os genótipos TT+TA e valores mais elevados de concentração de hemoglobina globular média, o que contradiz com o que seria esperado. Isto porque supostamente, os indivíduos com o genótipo AA têm mais proteção porque o alelo A do polimorfismo HMOX-1 -413 TA está associado a maior expressão/atividade de HMOX-1, logo menor processo inflamatório. E os

indivíduos do grupo I deveriam ter CHGM diminuída, porque têm maior processo inflamatório. Para além de que, como a CHGM está relacionada com a hematopoiese, e esta é dependente dos fatores inflamatórios, estes inibem a eritropoiese que está associada à produção de hepcidina que se encontra aumentada no processo inflamatório e que inibe o transporte de ferro dos enterócitos duodenais para o plasma, contribuindo para a diminuição dos níveis séricos de ferro (122). Nos resultados do presente estudo, existe uma contradição porque os indivíduos com o alelo T com angiopatia, que à partida teriam maior processo inflamatório, esta situação inversa poderá ser explicada por outro fator relacionado com a atividade da HMOX-1. A HMOX-1 produz mais monóxido de carbono e este pode diminuir a formação de hemoglobina. Outra explicação poderá ser que estes indivíduos reabsorvam menos glucose e sódio e terem uma melhor perfusão que levará a maior produção de eritropoietina, sendo que esta é anti-inflamatória, e por isso ter dado valores de CHGM mais elevados nos indivíduos portadores do alelo T do grupo I.

Os indivíduos do grupo II portadores do genótipo AA estão associados a níveis mais baixos de plaquetas do que os do grupo com angiopatia. Para além de que, nestes indivíduos, parece existir um fator de proteção para este parâmetro, independentemente dos anos de duração de diabetes. Indivíduos com DMT2 têm maior reatividade plaquetária comparando com indivíduos não diabéticos, que por sua vez, terão um risco elevado para o surgimento de complicações cardiovasculares (125). Os nossos dados estão de acordo com o esperado.

Também se observou que os indivíduos do grupo I portadores dos genótipos TT+AA estão associados a níveis mais elevados de malondialdeído do que os do grupo sem angiopatia. Para os indivíduos do grupo II portadores dos genótipos TT+AA parece existir um fator de proteção, relativamente a este parâmetro, para doença angiopática, dependente dos anos de duração de diabetes. Um estudo realizado por Goycheva P, Mikolova G, Ivanova M, *et al.* (126), teve como objetivo analisar os níveis de stress oxidativo, nomeadamente de malondialdeído, na DMT2 com complicações vasculares derivadas da diabetes. Foram incluídos 93 pacientes com DMT2 e complicações angiopáticas, 16 pacientes com DMT2 sem complicações angiopáticas e 94 controlos saudáveis. Os autores demonstraram que os grupos de DMT2 apresentaram

níveis significativamente mais elevados que no grupo controlo e que o grupo com níveis mais elevados foi o grupo com DMT2 e complicações vasculares. Os resultados do presente trabalho corroboram os resultados obtidos por estes autores. O malondialdeído é considerado um importante biomarcador utilizado na avaliação do stress oxidativo (117). Sugere-se que, juntamente com a dislipidemia primária, o dano oxidativo e as alterações químicas irreversíveis das lipoproteínas, estejam também envolvidas no estado de aceleração de aterosclerose na DMT2 (127).

O presente estudo teve algumas limitações, desde já o tamanho amostral, tendo limitado a existência de determinados dados com significância estatística, a falta de uma população controlo e uma certa falta de homogeneidade da amostra. O facto de não existirem informações sobre o número de indivíduos que estariam a ser medicados, quais as medicações em uso, e também a inexistência de informações sobre a alimentação dos mesmos, poderão ter interferido nos resultados e conclusões. Por outro lado, até onde se conhece da literatura, é o primeiro estudo que analisa o contributo destes quatro polimorfismos genéticos (RAGE -374 TA, IL-6 -174 GC, TNF- α -238 GA e HMOX-1 -413 TA) e de biomarcadores do processo inflamatório com a predisposição de indivíduos diabéticos tipo 2 a desenvolverem doença cardiovascular.

6. CONCLUSÃO

Nas últimas décadas, temos assistido a um crescimento acelerado da prevalência de diabetes *mellitus* tipo 2 em todo o mundo, em grande parte, fruto da globalização e sedentarismo, juntamente com o aumento da obesidade. Esta patologia pode resultar em diversas complicações de saúde, originando custos avultados para os sistemas de saúde dos países. É, por isso, de enorme relevância conduzir pesquisas nesta área, por forma a entender as etapas de desenvolvimento e complicações da DMT2, com o objetivo de prevenir, controlar, tratar ou reverter a fisiopatologia desta doença e as suas complicações.

Cada vez mais se aposta numa abordagem individualizada e personalizada como tratamento, para isso, a área da genética é essencial. A identificação de genótipos associados ao desenvolvimento e complicações derivadas da doença, a pesquisa de novos biomarcadores que ajudem a detetar precocemente a doença, que avaliem a sua progressão e a resposta a intervenções terapêuticas, é de enorme pertinência para tentar travar o incremento desta epidemia emergente.

O objetivo principal deste estudo foi avaliar o contributo da variação genética e de biomarcadores do processo inflamatório na progressão da doença cardiovascular em pessoas com diabetes *mellitus* tipo 2. Os polimorfismos estudados foram: IL-6 -174 GC, TNF- α -238 GA, RAGE -374 TA e HMOX-1 -413 TA. Procurou-se entender qual a importância de cada polimorfismo e de alguns biomarcadores do processo inflamatório na progressão da doença cardiovascular em pessoas com DMT2.

Os fatores genéticos ajudam a identificar os indivíduos diabéticos tipo 2 com maior risco para desenvolver doença angiopática e modulam diferencialmente os fenótipos intermédios (parâmetros bioquímicos e celulares) associados à progressão para doença cardiovascular.

Relativamente à associação genótipo e fenótipo intermédio, houve uma associação entre o polimorfismo da citocina pró-inflamatória (IL-6) com níveis mais elevados, no entanto, ainda dentro dos valores de referência, de parâmetros hematológicos e marcadores de processo inflamatório. E uma

associação do polimorfismo de RAGE com homocisteína. No caso do polimorfismo anti-inflamatório (HMOX-1), houve uma associação com o parâmetro monócitos, apesar de se encontrar dentro dos valores de referência, e com níveis elevados de um parâmetro relacionado com a extensão da inflamação e stress oxidativo (rácio monócitos/C-HDL).

Não foram encontradas associações entre os polimorfismos estudados e a progressão para a doença cardiovascular (associação genótipo – fenótipo distante). O facto do tamanho amostral ser pequeno e os indivíduos incluídos no estudo terem bastantes semelhanças entre si, por se tratar de indivíduos todos eles diabéticos e não existir uma população controlo, poderá ter levado à inexistência de resultados estatisticamente significativos.

Em relação à associação fenótipo intermédio – fenótipo distante, foram identificados dois parâmetros relacionados com a progressão da doença angiopática, são eles o malondialdeído e a homocisteína. Os resultados obtidos vão de encontro ao esperado porque quando existe a presença de doença cardiovascular, os valores destes parâmetros relacionados com o processo inflamatório e *stress oxidativo* vão estar aumentados nestes indivíduos. De realçar a correlação direta encontrada entre malondialdeído e o parâmetro dos eritrócitos apenas nos indivíduos com doença cardiovascular. E a correlação indireta encontrada entre homocisteína e os parâmetros dos eritrócitos nos indivíduos com e sem angiopatia. De referir também que a maioria dos indivíduos têm doença microangiopática e isso pode explicar as associações encontradas e a falta de relação com os parâmetros dos lípidos.

A importância destas análises é identificar os indivíduos que têm maior tendência para progredirem para a doença cardiovascular antes de terem um evento cardiovascular. A genética ajuda a subclassificar os indivíduos com determinadas variações nos fenótipos intermédios, de forma a identificar os indivíduos com DMT2 que tenham maior risco para desenvolverem doença cardiovascular.

Estes resultados poderão constituir um contributo para a definição de um perfil de risco cardiovascular em doentes com DMT2 baseado nos biomarcadores genéticos, bioquímicos e celulares. Ressalvando mais uma vez, o facto de não

existir neste trabalho informação sobre a medicação e a alimentação destes indivíduos.

Por este motivo, estudar os biomarcadores inflamatórios que estão associados ao desenvolvimento de complicações da DMT2 (como a doença cardiovascular), bem como a modulação por variantes polimórficas genéticas, pode ajudar a prever os riscos individuais do seu aparecimento e posteriormente, fazer o diagnóstico e determinar qual o tratamento mais adequado a cada indivíduo.

Perspetivas Futuras

O presente trabalho teve algumas limitações, tais como o pequeno tamanho amostral, o que limitou a significância de determinados dados e também a falta de uma população controlo.

Numa oportunidade futura, será interessante realizar um novo estudo com a mesma população, mas com um maior tamanho amostral e incluindo uma população controlo, que possibilite a comparação dos resultados entre indivíduos saudáveis, indivíduos com DMT2 sem angiopatia e indivíduos com DMT2 e angiopatia. Esta comparação irá permitir avaliar a possível presença de diferenças estatisticamente significativas entre os três grupos e estudar de forma mais detalhada a progressão do desenvolvimento da DMT2 e da doença angiopática nos indivíduos com DMT2.

7. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICAS

1. Goldstein BJ, Muller-Wieland D. Type 2 Diabetes: Principles and Practice. 2nd edition. Nova Iorque: Informa Healthcare USA, Inc; 2008.
2. Galicia-Garcia U, Benito-Vicente A, Jebari S, Larrea-Sebal A, Siddiqi H, Uribe KB, et al. Pathophysiology of type 2 diabetes mellitus. *Int J Mol Sci.* 2020;21(17):1–34. doi: 10.3390/ijms21176275.
3. Mahan LK, Escott-Stump S, Raymond JL. Krause: Alimentos, Nutrição e Dietoterapia. 13ª edição. Elsevier; 2013.
4. Spellman CW. Pathophysiology of Type 2 Diabetes: Targeting Islet Cell Dysfunction. *J Am Osteopath Assoc.* 2010;110(3 Suppl 2):S2-S7.
5. Chatterjee S, Khunti K, Davies MJ. Type 2 diabetes. *Lancet.* 2017;389(10085):2239–2251. doi: 10.1016/S0140-6736(17)30058-2.
6. Ahmed M, de Winther MPJ, Van den Bossche J. Epigenetic mechanisms of macrophage activation in type 2 diabetes. *Immunobiology.* 2017;222(10):937–943. doi: 10.1016/j.imbio.2016.08.011.
7. Rao X, Zhong J, Sun Q. The heterogenic properties of monocytes/macrophages and neutrophils in inflammatory response in diabetes. *Life Sci.* 2014;116(2):59–66. doi: 10.1016/j.lfs.2014.09.015.
8. American Diabetes Association. 2. Classification and diagnosis of diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes - 2019. *Diabetes Care.* 2019;42(Suppl. 1):S13–S28. doi: 10.2337/dc19-S002.
9. The British Diabetic Association. Diabetes UK – Know Diabetes, Fight Diabetes: What are the signs and symptoms of diabetes? [Internet]. Londres. nd. Available from: <https://www.diabetes.org.uk/diabetes-the-basics/diabetes-symptoms> (accessed April 2, 2021).
10. Chilelli NC, Burlina S, Lapolla A. AGEs, rather than hyperglycemia, are responsible for microvascular complications in diabetes: A "glycooxidation-centric" point of view. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2013;23(10):913–9. doi: 10.1016/j.numecd.2013.04.004.

11. Nowotny K, Jung T, Höhn A, Weber D, Grune T. Advanced glycation end products and oxidative stress in type 2 diabetes mellitus. *Biomolecules*. 2015;5(1):194–222. doi: 10.3390/biom5010194.
12. Monnier VM. Intervention against the Maillard reaction in vivo. *Arch Biochem Biophys*. 2003;419(1):1–15. doi: 10.1016/j.abb.2003.08.014.
13. Barbosa JHP, Oliveira SL, Seara LT e. O papel dos produtos finais da glicação avançada (AGEs) no desencadeamento das complicações vasculares do diabetes. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2008;52(6):940–950. doi: 10.1590/s0004-27302008000600005.
14. Hudson BI, Stickland MH, Futers TS, Grant PJ. Effects of novel polymorphisms in the RAGE gene on transcriptional regulation and their association with diabetic retinopathy. *Diabetes*. 2001;50(6):1505–1511. doi: 10.2337/diabetes.50.6.1505.
15. The British Diabetic Association. Diabetes UK – Know Diabetes, Fight Diabetes: Diabetes risk factors [Internet]. Londres. nd. Available from: <https://www.diabetes.org.uk/preventing-type-2-diabetes/diabetes-risk-factors> (accessed April 14, 2021).
16. Papatheodorou K, Banach M, Bekiari E, Rizzo M, Edmonds M. Complications of Diabetes 2017. *J Diabetes Res*. 2018;2018. doi: 10.1155/2018/3086167.
17. IDF. International Diabetes Federation. IDF Diabetes Atlas. Ninth edition. Brussels, Belgium: International Diabetes Federation; 2019.
18. Observatório Nacional da Diabetes. Diabetes: Factos e Números – Os Anos de 2016, 2017 e 2018 - Relatório Anual do Observatório Nacional da Diabetes - Edição de 2019. 2019. 64 p.
19. Saeedi P, Salpea P, Karuranga S, Petersohn I, Malanda B, Gregg EW, et al. Mortality attributable to diabetes in 20–79 years old adults, 2019 estimates: Results from the International Diabetes Federation Diabetes Atlas, 9th edition. *Diabetes Res Clin Pract*. 2020;162:108086. doi: 10.1016/j.diabres.2020.108086.
20. IDF. International Diabetes Federation. IDF Diabetes Atlas. Ten edition. Brussels, Belgium: International Diabetes Federation; 2021.
21. OCDE EU. Health at a Glance: Europe 2020: State of Health in the EU Cycle. Paris. 2020. 237 p.

22. Saeedi P, Petersohn I, Salpea P, Malanda B, Karuranga S, Unwin N, et al. Global and regional diabetes prevalence estimates for 2019 and projections for 2030 and 2045: Results from the International Diabetes Federation Diabetes Atlas, 9th edition. *Diabetes Res Clin Pract.* 2019;157:107843. doi: 10.1016/j.diabres.2019.107843.
23. Haldar SR, Chakrabarty A, Chowdhury S, Haldar A, Sengupta S, Bhattacharyya M. Oxidative Stress-Related Genes in Type 2 Diabetes: Association Analysis and Their Clinical Impact. *Biochem Genet.* 2015;53(4–6):93–119. doi: 10.1007/s10528-015-9675-z.
24. Tonyan ZN, Nasykhova YA, Danilova MM, Glotov AS. Genetics of macrovascular complications in type 2 diabetes. *World J Diabetes.* 2021;12(8):1200-1219. doi: 10.4239/wjd.v12.i8.1200.
25. Yan SF, Ramasamy R, Schmidt AM. The RAGE Axis A fundamental mechanism signaling danger to the vulnerable vasculature. *Circ Res.* 2010;106(5):842–853. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.109.212217.
26. Silva NR da, Costa CEM da. A hiperglicemia e os mecanismos envolvidos nas disfunções. *Arq Ciênc Saúde Unipar, Umuarama.* 2008;12(3):265–270.
27. Huebschmann AG, Regensteiner JG, Vlassara H, Reusch JEB. Diabetes and advanced glycoxidation end products. *Diabetes Care.* 2006;29(6):1420–1432. doi: 10.2337/dc05-2096.
28. Uribarri J, Woodruff S, Goodman S, Cai W, Chen XUE, Pyzik R, et al. Advanced Glycation End Products in Foods and Practical Guide to Their Reduction in the Diet. *J Am Diet Assoc.* 2010;110(6):911–916. doi: 10.1016/j.jada.2010.03.018.
29. Vlassara H, Uribarri J. Advanced glycation end products (AGE) and diabetes: Cause, effect, or both? *Curr Diab Rep.* 2014;14(1):453. doi: 10.1007/s11892-013-0453-1.
30. Yamagishi S ichi. Role of advanced glycation end products (AGEs) and receptor for AGEs (RAGE) in vascular damage in diabetes. *Exp Gerontol.* 2011;46(4):217–224. doi: 10.1016/j.exger.2010.11.007.

31. Rhee SY, Kim YS. The role of advanced glycation end products in diabetic vascular complications. *Diabetes Metab J*. 2018;42(3):188–195. doi: 10.4093/dmj.2017.0105.
32. Xu XH, Sun B, Zhong S, Wei DD, Hong Z, Dong AQ. Diabetic retinopathy predicts cardiovascular mortality in diabetes: a meta-analysis. *BMC Cardiovasc Disord*. 2020;20(1):478. doi: 10.1186/s12872-020-01763-z.
33. IDF. International Diabetes Federation. Care & prevention: Diabetes and the eye [Internet]. Brussels, Belgium: International Diabetes Federation; 2020. Available from: <https://www.idf.org/our-activities/care-prevention/eye-health.html> (accessed May 5, 2021).
34. IDF. International Diabetes Federation. Care & prevention: Diabetes and the kidneys [Internet]. Brussels, Belgium: International Diabetes Federation; 2021. Available from: <https://www.idf.org/our-activities/care-prevention/diabetes-and-the-kidney.html> (accessed May 5, 2021).
35. IDF. International Diabetes Federation. Care & prevention: The diabetic foot [Internet]. Brussels, Belgium: International Diabetes Federation; 2020. Available from: <https://www.idf.org/our-activities/care-prevention/diabetic-foot.html> (accessed May 5, 2021).
36. IDF. International Diabetes Federation. Care & prevention: Diabetes and cardiovascular disease [Internet]. Brussels, Belgium: International Diabetes Federation; 2021. Available from: <https://www.idf.org/our-activities/care-prevention/cardiovascular-disease.html> (accessed May 6, 2021).
37. M S, DR M. Inflammation and Diabetes. *Interdiscip J Microinflammation*. 2014;1(1):1–3.
38. Zozulinska D, Wierusz-Wysocka B. Type 2 diabetes mellitus as inflammatory disease. *Diabetes Res Clin Pract*. 2006;74(2 Suppl.):12–16. doi: 10.1016/j.diabres.2006.06.007.
39. Eguchi K, Manabe I. Macrophages and islet inflammation in type 2 diabetes. *Diabetes Obes Metab*. 2013;15(Suppl. 3):152-158. doi: 10.1111/dom.12168.
40. Donath MY, Shoelson SE. Type 2 diabetes as an inflammatory disease. *Nat Rev Immunol*. 2011;11(2):98–107. doi: 10.1038/nri2925.

41. Yue S, Zhang J, Wu J, Teng W, Liu L, Chen L. Use of the monocyte-to-lymphocyte ratio to predict diabetic retinopathy. *Int J Environ Res Public Health*. 2015;12(8):10009–10019. doi: 10.3390/ijerph120810009.
42. Cardoso CRL, Leite NC, Salles GF. Importance of hematological parameters for micro- and macrovascular outcomes in patients with type 2 diabetes: the Rio de Janeiro type 2 diabetes cohort study. *Cardiovasc Diabetol*. 2021;20(1):1–13. doi:10.1186/s12933-021-01324-4.
43. Dec AT dos S, Maciel MAS, Borato DCK, Simionatto M. Avaliação Das Relações Triglicérido/HDL-C, Neutrófilos/Linfócitos E Monócitos/HDL-C Em Pacientes Com Diabetes Mellitus / Evaluation of Triglyceride / HDL-C, Neutrophils/ Lymphocytes and Monocytes / HDL-C Ratios in Patients With Diabetes Mellitus. *Brazilian J Dev*. 2021;7(1):10063–10083. doi: 10.34117/bjdv7n1-682.
44. Ya G, Qiu Z, Tianrong P. Relation of Monocyte/High-Density Lipoprotein Cholesterol Ratio with Coronary Artery Disease in Type 2 Diabetes Mellitus. *Clin Lab*. 2018;64(6):901-906. doi: 10.7754/Clin.Lab.2018.171022.
45. Oguntibeju OO. Type 2 diabetes mellitus, oxidative stress and inflammation: examining the links. *Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol*. 2019;11(3):45–63.
46. Halim M, Halim A. The effects of inflammation, aging and oxidative stress on the pathogenesis of diabetes mellitus (type 2 diabetes). *Diabetes Metab Syndr Clin Res Rev*. 2019;13(2):1165–1172. doi: 10.1016/j.dsx.2019.01.040.
47. Graßmann S, Wirsching J, Eichelmann F, Aleksandrova K. Association Between Peripheral Adipokines and Inflammation Markers: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Obesity*. 2017;25(10):1776–1785. doi: 10.1002/oby.21945.
48. Feijóo-Bandín S, Aragón-Herrera A, Moraña-Fernández S, Anido-Varela L, Tarazón E, Roselló-Lletí E, et al. Adipokines and inflammation: Focus on cardiovascular diseases. *Int J Mol Sci*. 2020;21(20):1–34. doi: 10.3390/ijms21207711.
49. Herder C, Dalmas E, Böni-Schnetzler M, Donath MY. The IL-1 Pathway in Type 2 Diabetes and Cardiovascular Complications. *Trends Endocrinol Metab*. 2015;26(10):551–563. doi: 10.1016/j.tem.2015.08.001.

50. Aguiar C, Duarte R, Carvalho D. Nova abordagem para o tratamento da diabetes: da glicemia à doença cardiovascular. *Rev Port Cardiol.* 2019;38(1):53–63. doi: 10.1016/j.repc.2018.03.013.
51. Einarson TR, Acs A, Ludwig C, Panton UH. Prevalence of cardiovascular disease in type 2 diabetes: A systematic literature review of scientific evidence from across the world in 2007-2017. *Cardiovasc Diabetol.* 2018;17(1):1–19. doi: 10.1186/s12933-018-0728-6.
52. Abraham TM, Pencina KM, Pencina MJ, Fox CS. Trends in Diabetes Incidence: The Framingham Heart Study. *Diabetes Care.* 2015;38(3):482–487. doi: 10.2337/dc14-1432.
53. Roberts AC, Porter KE. Cellular and molecular mechanisms of endothelial dysfunction in diabetes. *Diab Vasc Dis Res.* 2013;10(6):472–482. doi: 10.1177/1479164113500680.
54. Kampoli A-M, Tousoulis D, Briasoulis A, Latsios G, Papageorgiou N, Stefanadis C. Potential Pathogenic Inflammatory Mechanisms of Endothelial Dysfunction Induced by Type 2 Diabetes Mellitus. *Curr Pharm Des.* 2011;17(37):4147–4158. doi: 10.2174/138161211798764825.
55. Bekele A, Roba KT, Egata G, Gebremichael B. Anemia and associated factors among type-2 diabetes mellitus patients attending public hospitals in Harari Region, Eastern Ethiopia. *PLOS One.* 2019;14(12):1–17. doi: 10.1371/journal.pone.0225725.
56. Thomas MC, Cooper ME, Tsalamandris C, MacIsaac R, Jerums G. Anemia with impaired erythropoietin response in diabetic patients. *Arch Intern Med.* 2005;165(4):466–469.
57. Craig KJ, Williams JD, Riley SG, Owens DR, Worthing D, Cavil I, et al. Anemia and Diabetes in the Absence of Nephropathy. *Diabetes Care.* 2005;28(5):1118-1123. doi: 10.2337/diacare.28.5.1118.
58. Adane T, Getaneh Z, Asrie F. Red blood cell parameters and their correlation with renal function tests among diabetes mellitus patients: A comparative cross-sectional study. *Diabetes, Metab Syndr Obes: Targets Ther.* 2020;13:3937–3946. doi: 10.2147/DMSO.S275392.

59. Barbieri J, Fontela PC, Winkelmann ER, Zimmermann CEP, Sandri YP, Mallet EKV, et al. Anemia in Patients with Type 2 Diabetes Mellitus. *Anemia*. 2015;2015. doi: 10.1155/2015/354737.
60. Adane T, Getawa S. Anaemia and its associated factors among diabetes mellitus patients in Ethiopia: A systematic review and meta-analysis. *Endocrinol Diabetes Metab*. 2021;4(3):1–10. doi: 10.1002/edm2.260.
61. Cai L, Wen J, Yao J, Li L, Lin W, Liang J, et al. RAGE Gly82ser polymorphism in patients with type 2 diabetes with comorbid depression. *J Pak Med Assoc*. 2019;69(6):828–833.
62. Camp KM, Trujillo E. Position of the academy of nutrition and dietetics: Nutritional genomics. *J Acad Nutr Diet*. 2014;114(2):299–312. doi: 10.1016/j.jand.2013.12.001.
63. Marcum JA. Nutrigenetics/Nutrigenomics, Personalized Nutrition, and Precision Healthcare. *Curr Nutr Rep*. 2020;9(4):338–345. doi: 10.1007/s13668-020-00327-z.
64. Ortega Á, Berná G, Rojas A, Martín F, Soria B. Gene-Diet interactions in type 2 diabetes: The chicken and egg debate. *Int J Mol Sci*. 2017;18(6):1188. doi: 10.3390/ijms18061188.
65. Franzago M, Santurbano D, Vitacolonna E, Stuppia L. Genes and diet in the prevention of chronic diseases in future generations. *Int J Mol Sci*. 2020;21(7):2633. doi: 10.3390/ijms21072633.
66. Karki R, Pandya D, Elston RC, Ferlini C. Defining “mutation” and “polymorphism” in the era of personal genomics. *BMC Med Genomics*. 2015;8:37. doi: 10.1186/s12920-015-0115-z.
67. DeRijk RH, de Kloet ER. *Encyclopedia of Stress: Mineralocorticoid Receptor Polymorphisms*. 2nd edition. George Fink - Academic Press; 2007. 744-748. Available from: <https://www.sciencedirect.com/topics/biochemistry-genetics-and-molecular-biology/genetic-divergence> (accessed October 26, 2021).
68. Keats BJB, Sherman SL. *Emery and Rimoin’s Principles and Practice of Medical Genetics: Chapter 13 – Population Genetics*. 6th edition. David Rimoin, Reed Pyeritz, Bruce Korf – Academic Press; 2013. 1-12. Available from:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B978012383834600015X>
(accessed October 29, 2021).

69. NCBI. IL6 interleukin [*Homo sapiens* (human)] - Gene n.d. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?cmd=Retrieve&dopt=Graphics&list_uids=3569 (accessed November 11, 2021).
70. Tanaka T, Narazaki M, Masuda K, Kishimoto T. Regulation of IL-6 in Immunity and Diseases. *Adv Exp Med Biol.* 2016;941:79–88. doi: 10.1007/978-94-024-0921-5_4.
71. Curti MLR, Jacob P, Borges MC, Rogero MM, Ferreira SRG. Studies of gene variants related to inflammation, oxidative stress, dyslipidemia, and obesity: Implications for a nutrigenetic approach. *J Obes.* 2011;2011:497401. doi: 10.1155/2011/497401.
72. Rehman K, Akash MSH, Liaqat A, Kamal S, Qadir MI, Rasul A. Role of interleukin-6 in development of insulin resistance and type 2 diabetes mellitus. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr.* 2017;27(3):229–236. doi: 10.1615/CritRevEukaryotGeneExpr.2017019712.
73. Buraczynska M, Zukowski P, Drop B, Baranowicz-Gaszczyk I, Ksiazek A. Effect of G(-174)C polymorphism in interleukin-6 gene on cardiovascular disease in type 2 diabetes patients. *Cytokine.* 2016;79:7–11. doi: 10.1016/j.cyto.2015.12.004.
74. Papaoikonomou S, Tousoulis D, Tentolouris N, Miliou A, Papageorgiou N, Synetos A, et al. Assessment of the effects of 174G/C polymorphism on interleukin 6 gene on macrovascular complications in patients with type 2 diabetes mellitus. *Int J Cardiol.* 2014;172(1):e190–191. doi.org/10.1016/j.ijcard.2013.12.135.
75. rs1800795 | SelfDecode | Genome Analysis n.d. Available from: <https://www.selfdecode.com/snp/rs1800795/> (accessed November 8, 2021).
76. Huth C, Heid IM, Vollmert C, Gieger C, Grallert H, Wolford JK, et al. IL6 gene promoter polymorphisms and type 2 diabetes: Joint analysis of individual participants' data from 21 studies. *Diabetes.* 2006;55(10):2915–2921. doi: 10.2337/db06-0600.

77. Lu QK, Zhang JT, Zhao N, Wang HY, Tong QH, Wang SL. Association of IL-6 Gene (-174 and -572 G/C) Polymorphisms with Proliferative Diabetic Retinopathy of Type 2 Diabetes in a Chinese Population. *Ophthalmic Res.* 2017;58(3):162–167. doi: 10.1159/000475670.
78. Chen B, Wu M, Zang C, Li Y, Xu Z. Association Between IL-6 Polymorphisms and Diabetic Nephropathy Risk: A Meta-analysis. *Am J Med Sci.* 2019;358(5):363–373. doi: 10.1016/j.amjms.2019.07.011.
79. Cui ZH, Lu XT, Xiao KL, Chen Y, Li HQ. Association of Interleukin-6 -174G/C Polymorphism with the Risk of Diabetic Nephropathy in Type 2 Diabetes: A Meta-analysis. *Curr Med Sci.* 2019;39(2):250–258. doi: 10.1007/s11596-019-2027-1.
80. Salari N, Mansouri K, Hosseinian-Far A, Ghasemi H, Mohammadi M, Jalali R, et al. The effect of polymorphisms (174G>C and 572C>G) on the Interleukin-6 gene in coronary artery disease: a systematic review and meta-analysis. *Genes Environ.* 2021;43(1):1–16. doi: 10.1186/s41021-021-00172-8.
81. Rai H, Colleran R, Cassese S, Joner M, Kastrati A, Byrne RA. Association of interleukin 6 -174 G/C polymorphism with coronary artery disease and circulation IL-6 levels: a systematic review and meta-analysis. *Inflamm Res.* 2021;70(10-12):1075-1087. doi: 10.1007/s00011-021-01505-7.
82. NCBI. TNF tumor necrosis factor [*Homo sapiens* (human)] - Gene n.d. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/7124> (accessed November 12, 2021).
83. Domingueti CP, Dusse LMSA, Carvalho MDG, de Sousa LP, Gomes KB, Fernandes AP. Diabetes mellitus: The linkage between oxidative stress, inflammation, hypercoagulability and vascular complications. *J Diabetes Complications.* 2016;30(4):738–745. doi: 10.1016/j.jdiacomp.2015.12.018.
84. rs361525 | SelfDecode | Genome Analysis n.d. Available from: <https://selfdecode.com/snp/rs361525/> (accessed November 11, 2021).
85. Feng R, Li Y, Zhao D, Wang C, Niu Y, Sun C. Lack of association between TNF 238 G/A polymorphism and type 2 diabetes: A meta-analysis. *Acta Diabetol.* 2009;46(4):339–343. doi: 10.1007/s00592-009-0118-3.

86. Elmarakby AA, Sullivan JC. Relationship between oxidative stress and inflammatory cytokines in diabetic nephropathy. *Cardiovasc Ther.* 2012;30(1):49–59. doi: 10.1111/j.1755-5922.2010.00218.x.
87. Guo X, Li C, Wu J, Mei Q, Liu C, Sun W, et al. The association of TNF- α -308G/A and -238G/A polymorphisms with type 2 diabetes mellitus: A meta-analysis. *Biosci Rep.* 2019;39(12):BSR20191301. doi: 10.1042/BSR20191301.
88. NCBI. AGER advanced glycosylation end-product specific receptor [*Homo sapiens* (human)] - Gene n.d. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?cmd=Retrieve&dopt=Graphics&list_uids=1777 (accessed November 13, 2021).
89. Vazzana N, Santilli F, Cuccurullo C, Davì G. Soluble forms of RAGE in internal medicine. *Intern Emerg Med.* 2009;4(5):389–401. doi: 10.1007/s11739-009-0300-1.
90. Lu W, Feng B. The -374A allele of the RAGE gene as a potential protective factor for vascular complications in type 2 diabetes: A meta-analysis. *Tohoku J Exp Med.* 2010;220(4):291–297. doi: 10.1620/tjem.220.291.
91. rs1800624 | SelfDecode | Genome Analysis n.d. Available from: <https://selfdecode.com/snp/rs1800624/> (accessed November 12, 2021).
92. Ager | SelfDecode | Genome Analysis n.d. Available from: <https://selfdecode.com/gene/ager/> (accessed November 12, 2021).
93. Picheth G, Costantini CO, Pedrosa FO, Leme da Rocha Martinez T, Maltempi de Souza E. The -374A allele of the receptor for advanced glycation end products (RAGE) gene promoter is a protective factor against cardiovascular lesions in type 2 diabetes mellitus patients. *Clin Chem Lab Med.* 2007;45(10):1268–1272. doi: 10.1515/CCLM.2007.273.
94. Tao D, Mai X, Zhang T, Mei Y. Association between the RAGE (receptor for advanced glycation end-products) -374T/A gene polymorphism and diabetic retinopathy in T2DM. *Rev Assoc Med Bras.* 2017;63(11):971–977. doi: 10.1590/1806-9282.63.11.971.
95. NCBI. HMOX1 heme oxygenase 1 [*Homo sapiens* (human)] - Gene n.d. Available from:

- https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?cmd=Retrieve&dopt=Graphics&list_uids=3162 (accessed November 13, 2021).
96. HMOX1 | SelfDecode | Genome Analysis n.d. Available from: <https://selfdecode.com/gene/hmox1/> (accessed November 13, 2021).
97. Lee EY, Lee YH, Kim SH, Jung KS, Kwon O, Kim BS, et al. Association between Heme Oxygenase-1 promoter polymorphisms and the development of albuminuria in type 2 diabetes: A case-control study. *Medicine*. 2015;94(43):1–8. doi: 10.1097/MD.0000000000001825.
98. rs2071746 | SelfDecode | Genome Analysis n.d. Available from: <https://selfdecode.com/snp/rs2071746/> (accessed November 14, 2021).
99. Bao W, Song F, Li X, Rong S, Yang W, Wang D, et al. Association between heme oxygenase-1 gene promoter polymorphisms and type 2 diabetes mellitus: A HuGE review and meta-analysis. *Am J Epidemiol*. 2010;172(6):631–636. doi: 10.1093/aje/kwq162.
100. RefSNPReport - dbSNP - NCBI - NIH. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs1800795> (accessed December 2, 2021).
101. RefSNPReport - dbSNP - NCBI - NIH. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs361525> (accessed December 2, 2021).
102. RefSNPReport - dbSNP - NCBI - NIH. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs1800624> (accessed December 2, 2021).
103. RefSNPReport - dbSNP - NCBI - NIH. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs2071746> (accessed December 2, 2021).
104. Valente AMS. Hábitos alimentares, hiperhomocisteinemia e doença cardiovascular na diabetes do tipo 2. 2013;283.
105. WMA Declaration of Helsinki - Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects [Internet]. Brasil; 2013. Available from: <https://www.wma.net/policies-post/wma-declaration-of-helsinki-ethical-principles-for-medical-research-involving-human-subjects/> (accessed October 24, 2021).

106. Lahiri DK, Numberger JI. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucleic Acids Res* 1991;19:5444. doi:10.1093/nar/19.19.5444.
107. Mayasari DS, Taufiq N, Hariawan H. Association of monocyte-to-high density lipoprotein ratio with arterial stiffness in patients with diabetes. *BMC Cardiovasc Disord*. 2021;21(1):1–10. doi:10.1186/s12872-021-02180-6.
108. Akboga MK, Balci KG, Maden O, Ertem AG, Kirbas O, Yayla C, et al. Usefulness of monocyte to HDL-cholesterol ratio to predict high SYNTAX score in patients with stable coronary artery disease. *Biomark Med*. 2016;10(4):375–383. doi: 10.2217/bmm-2015-0050.
109. Shawki HA, Elzehery R, Shahin M, Abo-hashem EM, Youssef MM. Evaluation of some oxidative markers in diabetes and diabetic retinopathy. *Diabetol Int*. 2020;12(1):108–117. doi: 10.1007/s13340-020-00450-w.
110. Sesti LFC, Crispim D, Canani LH, Polina ER, Rheinheimer J, Carvalho PS, et al. The -308G>A polymorphism of the TNF gene is associated with proliferative diabetic retinopathy in Caucasian Brazilians with type 2 diabetes. *Investig Ophthalmol Vis Sci*. 2015;56(2):1184–1190. doi: 10.1167/iovs.14-15758.
111. Fathy SA, Mohamed MR, Ali MAM, El-Helaly AE, Alattar AT. Influence of IL-6, IL-10, IFN- γ and TNF- α genetic variants on susceptibility to diabetic kidney disease in type 2 diabetes mellitus patients. *Biomarkers*. 2019;24(1):43-55. doi: 10.1080/1354750X.2018.1501761.
112. Paine SK, Sen A, Choudhuri S, Mondal LK, Chowdhury IH, Basu A, et al. Association of tumor necrosis factor α , interleukin 6, and interleukin 10 promoter polymorphism with proliferative diabetic retinopathy in type 2 diabetic subjects. *Retina*. 2012;32(6):1197–1203. doi: 10.1097/IAE.0b013e31822f55f3.
113. Kirbis J, Milutinovic A, Steblovnik K, Teran N, Terzic R, Zorc M. The -429 T/C and -374 T/A gene polymorphisms of the receptor of advanced glycation end products gene (RAGE) are not risk factors for coronary artery disease in Slovene population with type 2 diabetes. *Coll Antropol*. 2004;28(2):611-616.
114. Ganguly P, Alam SF. Role of homocysteine in the development of cardiovascular disease. *Nutr J*. 2015;14(6):1–10. doi: 10.1186/1475-2891-14-6.

115. Sahu A, Gupta T, Kavishwar A, Singh RK. Cardiovascular diseases risk prediction by homocysteine in comparison to other markers: A study from Madhya Pradesh. *J Assoc Physicians India*. 2015;63(10):37–40.
116. Goldstein M, Leibovitch I, Yeffimov I, Gavendo S, Sela BA, Loewenstein A. Hyperhomocysteinemia in patients with diabetes mellitus with and without diabetic retinopathy. *Eye*. 2004;18(5):460–465. doi: 10.1038/sj.eye.6700702.
117. Antunes MV, Lazzaretti C, Gamaro GD, Linden R. Estudo pré-analítico e de validação para determinação de malondialdeído em plasma humano por cromatografia líquida de alta eficiência, após derivatização com 2,4-dinitrofenilhidrazina. *Rev Bras Ciencias Farm J Pharm Sci*. 2008;44(2):279–287.
118. Kucukhuseyin O, Aydogan HY, Isbir CS, Isbir T. Associations of –374T/A Polymorphism of Receptor for Advanced Glycation End Products (RAGE) Gene in Turkish Diabetic and Non-diabetic Patients with Coronary Artery Disease In Vivo. 2009;23(6):949–954.
119. Cui J, Zhang X, Guo C, Zhang L. The association of interleukin-6 polymorphism (rs1800795) with microvascular complications in Type 2 diabetes mellitus. *Biosci Rep*. 2020;40(10):1–9. doi: 10.1042/BSR20201105.
120. Pickup JC. Inflammation and Activated Innate Immunity in the Pathogenesis of Type 2 Diabetes. *Diabetes Care*. 2004;27(3):813–23.
121. Enhos A, Cosansu K, Huyut MA, Turna F, Karacop E, Bakshaliyev N, et al. Assessment of the relationship between monocyte to high-density lipoprotein ratio and myocardial bridge. *Arq Bras Cardiol*. 2019;112(1):12–17. doi: 10.5935/abc.20180253.
122. Price EA, Schrier SL. Unexplained aspects of anemia of inflammation. *Adv Hematol*. 2010;2010:1-5. doi: 10.1155/2010/508739.
123. Song F, Li X, Zhang M, Yao P, Yang N, Sun X, et al. Association between heme oxygenase-1 gene promoter polymorphisms and type 2 diabetes in a Chinese population. *Am J Epidemiol*. 2009;170(6):747–756. doi: 10.1093/aje/kwp196.
124. Choi SW, Fai Yeung VT, Benzie IFF. Heme oxygenase microsatellite polymorphism, oxidative stress, glycemic control, and complication development

- in type 2 diabetes patients. *Free Radic Biol Med.* 2012;53(1):60–63. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2012.04.017.
125. Angiolillo DJ, Bernardo E, Sabaté M, Jimenez-Quevedo P, Costa MA, Palazuelos J, et al. Impact of Platelet Reactivity on Cardiovascular Outcomes in Patients With Type 2 Diabetes Mellitus and Coronary Artery Disease. *J Am Coll Cardiol.* 2007;50(16):1541–1547. doi: 10.1016/j.jacc.2007.05.049.
126. Goycheva P, Nikolova G, Ivanova M, Kundurdzhiev T, Gadjeva V. Predictive value of some pro-oxidants in type 2 diabetes mellitus with vascular complications. *Biosci Trends.* 2019;13(2):168–175. doi: 10.5582/bst.2019.01020.
127. Jenkins AJ, Best JD, Klein RL, Lyons TJ. “Lipoproteins, glycooxidation and diabetic angiopathy.” *Diabetes Metab Res Rev.* 2004;20(5):349–368. doi: 10.1002/dmrr.491.

8. ANEXOS

Tabela 38. Correlação de Pearson entre os parâmetros bioquímicos para o grupo I (com angiopatia).

Grupo I (com angiopatia)

		HbA1c	Glicemia Ocasional	Eritrócitos	Hemoglobina	Hematócrito	VGM	HGM	CHGM	Plaquetas	Leucócitos	Neutrófilos	Eosinófilos	Basófilos	Linfócitos	Monócitos	Rácio N/L	Rácio Neutrófilos X P/L	Monócitos/Linfócitos	Monócitos/HDL	Creatinina	C-Total	C-HDL	C-LDL	Triglicéridos	PCR	Malondialdeído	Homocisteína			
HbA1c	C. de Pearson		0,361																											-0,280	
	<i>p</i>		0,039																											0,017	
	N		33																											72	
Eritrócitos	C. de Pearson				0,813	0,870					0,364																			0,360	
	<i>p</i>				0,000	0,000					0,016																			0,003	
	N				64	64					43																			64	
Hemoglobina	C. de Pearson					0,972		0,326	0,340																					0,324	-0,312
	<i>p</i>					0,000		0,033	0,026																					0,009	0,012
	N					64		43	43																					64	64
Hematócrito	C. de Pearson																													0,321	-0,315
	<i>p</i>																													0,010	0,011
	N																													64	64
VGM	C. de Pearson							0,847			-0,318																			-0,338	-0,418
	<i>p</i>							0,000			0,038																			0,027	0,005
	N							43			43																			43	43
HGM	C. de Pearson								0,450		-0,349					0,320															-0,429
	<i>p</i>								0,002		0,022					0,037															0,004
	N								43		43					43															43
CHGM	C. de Pearson												-0,335																		
	<i>p</i>												0,028																		
	N												43																		
Plaquetas	C. de Pearson										0,483							0,590													
	<i>p</i>										0,001							0,000													
	N										43							43													
Leucócitos	C. de Pearson														-0,306			0,595													
	<i>p</i>														0,046			0,000													
	N														43			43													
Neutrófilos	C. de Pearson												-0,375	-0,386	-0,949		0,924	0,729	0,622												
	<i>p</i>												0,013	0,011	0,000		0,000	0,000	0,000												
	N												43	43	43		43	43	43												

Tabela 40. Correlação de Pearson entre os parâmetros bioquímicos para o grupo II (sem angiopatia).

		Grupo II (sem angiopatia)																											
		HbA1c	Glicemia Ocasional	Eritrócitos	Hemoglobina	Hematócrito	VGM	HGM	CHGM	Plaquetas	Leucócitos	Neutrófilos	Eosionófilos	Basófilos	Linfócitos	Monócitos	Rácio N/L	Rácio Neutrófilos X P/L	Monócitos/Linfócitos	Monócitos/HDL	Creatinina	C-Total	C-HDL	C-LDL	Triglicéridos	PCR	Malondialdeído	Homocisteína	
HbA1c	C. de Pearson		0,326																				0,321				0,370		
	<i>p</i>		0,046																				0,006				0,011		
	N		38																				72				46		
Glicemia Ocasional	C. de Pearson															0,336													
	<i>p</i>															0,045													
	N															36													
Eritrócitos	C. de Pearson				0,851	0,886																			0,278				-0,286
	<i>p</i>				0,000	0,000																		0,024				0,020	
	N				66	66																		66				66	
Hemoglobina	C. de Pearson					0,953	0,276	0,430	0,345																				-0,366
	<i>p</i>					0,000	0,046	0,001	0,011																			0,003	
	N					66	53	53	53																			66	
Hematócrito	C. de Pearson						0,306	0,272																					-0,360
	<i>p</i>						0,026	0,049																				0,003	
	N						53	53																				66	
VGM	C. de Pearson							0,806																					
	<i>p</i>							0,000																					
	N							53																					
HGM	C. de Pearson								0,591					0,273															
	<i>p</i>								0,000					0,048															
	N								53					53															
CHGM	C. de Pearson												0,299																
	<i>p</i>												0,030																
	N												53																
Plaquetas	C. de Pearson										0,371																		
	<i>p</i>										0,006																		
	N										53																		
Leucócitos	C. de Pearson																0,287	0,447										0,452	
	<i>p</i>																0,037	0,001									0,001		
	N																53	53									53		
Neutrófilos	C. de Pearson													-0,330	-0,922		0,937	0,775	0,357								-0,302		
	<i>p</i>													0,016	0,000		0,000	0,000	0,009							0,028			
	N													53	53		53	53	53							53			

