

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

VANESSA CARLA DE SOUZA PEREIRA

Avaliação das alterações nucleares e cromatínicas em linfócitos do sangue  
periférico de portadores de diabetes

Uberlândia

2017

VANESSA CARLA DE SOUZA PEREIRA

Avaliação das alterações nucleares e cromatínicas em linfócitos do sangue  
periférico de portadores de diabetes

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas da Universidade Federal de Uberlândia como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Biologia Celular.

Orientador: Prof. Dr. Alberto da Silva Moraes

Uberlândia

2017



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL  
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
Instituto de Ciências Biomédicas

Programa de Pós Graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas



Ata da defesa de DISSERTAÇÃO DE MESTRADO ACADÊMICO junto ao Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal de Uberlândia.

Defesa de: Dissertação de Mestrado Acadêmico

Número:006/2017 do PPGBC

Data: **31 de Maio de 2017**

Discente: **Vanessa Carla de Souza Pereira**

Matrícula nº 11422BCE003

Título do Trabalho: "**Avaliação das alterações nucleares e cromatínicas em linfócitos do sangue periférico de diabéticos**"

Área de concentração: Biologia Celular

Linha de Pesquisa: Mecanismos de Reparo e Plasticidade Tecidual

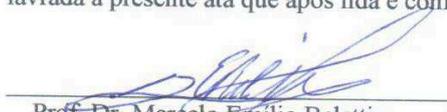
Projeto de Pesquisa vinculado: Pesquisa de alterações na organização da cromatina de células mononucleares do sangue periférico de pacientes diabéticos

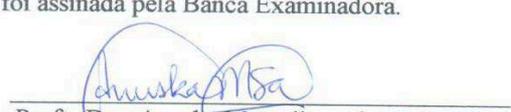
Às quatorze horas do dia trinta e hum de maio do ano de 2017 no Auditório do Bloco 4K - Campus Umuarama da Universidade Federal de Uberlândia, reuniu-se a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas, assim composta: Professores Doutores: Anuska Marcelino Alvares Saraiva – UNIP; Marcelo Emílio Beletti – UFU e Alberto da Silva Moraes orientador da candidata. Iniciando os trabalhos o presidente da mesa Prof. Dr. Alberto da Silva Moraes - apresentou a Comissão Examinadora e a candidata, agradeceu a presença do público, e concedeu ao Discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação do Discente e o tempo de arguição e resposta foram conforme as normas do Programa. A seguir o senhor presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, às examinadoras, que passaram a arguir a candidata. Ultimada a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu os conceitos finais.

Em face do resultado obtido, a Banca Examinadora considerou a candidata **Vanessa Carla de Souza Pereira** Aprovada. Sugerindo, (se couber) o novo título para o trabalho: Avaliação das Alterações nucleares e cromatínicas em linfócitos do sangue periférico de pacientes portadores de diabetes

Esta defesa de Dissertação de Mestrado Acadêmico é parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre. O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, legislação e regulamentação internas da UFU, em especial do artigo 55 da resolução 12/2008 do Conselho de Pós-graduação e Pesquisa da Universidade Federal de Uberlândia.

Nada mais havendo a tratar foram encerrados os trabalhos às 17 horas e 30 minutos. Foi lavrada a presente ata que após lida e conferida foi assinada pela Banca Examinadora.

  
Prof. Dr. Marcelo Emílio Beletti  
UFU

  
Prof. Dra. Anuska Marcelino Alvares Saraiva  
UFTM

  
Prof. Dr. Alberto da Silva Moraes - **Orientador**  
UFU

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

---

P436a  
2017      Pereira, Vanessa Carla de Souza, 1987  
            Avaliação das alterações nucleares e cromatínicas em linfócitos do  
            sangue periférico de portadores de diabetes [recurso eletrônico] /  
            Vanessa Carla de Souza Pereira. - 2017.

Orientador: Alberto da Silva Moraes.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia,  
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas.

Modo de acesso: Internet.

Disponível em: <http://dx.doi.org/10.14393/ufu.di.2018.855>

Inclui bibliografia.

Inclui ilustrações.

1. Citologia. 2. Diabetes. 3. Linfócitos. 4. Cromatina. I. Moraes,  
Alberto da Silva, (Orient.) II. Universidade Federal de Uberlândia.  
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas.  
III. Título.

CDU: 576.3

---

Angela Aparecida Vicentini Tzi Tziboy – CRB-6/947

*Ao meu querido e amado filho João Lucas,  
presente de Deus para mim.*

## AGRADECIMENTOS

*A Deus, primeiramente, porque em todos os momentos, e principalmente nos mais difíceis me amparou e me sustentou.*

*Aos meus pais, Erenita e Antônio Márcio, pelas orações, amor incondicional e incentivo constante. Por estarem sempre muito perto de mim, em meu coração, me ajudando a concretizar meus sonhos e projetos.*

*Ao meu querido filho, João Lucas, pela companhia tão preciosa durante este tempo, que mesmo ainda sem compreender, me deu a força que eu precisava para continuar.*

*Ao meu esposo, Samuel, por me ajudar, apoiar e incentivar sempre.*

*Aos meus queridos irmãos, Everton e Diego, por sempre se fazerem presentes, mesmo longe geograficamente. Quero agradecer o carinho, a força, amizade e companheirismo de uma vida toda.*

*À minha madrinha Ângela por me amar e cuidar de mim.*

*Ao professor Dr. Alberto por ter me orientado neste trabalho, por todos os ensinamentos, apoio e compreensão. Com certeza foi o melhor orientador que eu poderia ter.*

*À minha querida amiga-irmã, Débora, que não mediu esforços para me ajudar em todos os momentos, que cuidou do João Lucas durante as reuniões e me animou nos momentos que pensei em desistir.*

*À minha querida amiga, Andriele, que foi sempre tão solícita em me ajudar, agradeço também pelas conversas, conselhos... enfim agora somos mais que amigas.*

*Às minhas queridas amigas Tamires e Alininha, agradeço o carinho, atenção e auxílio.*

*Aos participantes da pesquisa, obrigada por terem aceitado e contribuído grandemente para concretização deste trabalho.*

*Aos professores, Dra. Maria Luiza e Dr. Paulo, pela triagem dos participantes da pesquisa.*

*À Dra. Maira agradeço a atenção na triagem dos participantes.*

*Aos meus colegas de trabalho do Laboratório de Análises Clínicas agradeço o carinho.*

*Ao Programa de Pós Graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas, pelos professores, pela estrutura e auxílio de todo o corpo técnico-administrativo.*

*À coordenadora do Programa de Pós Graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas, Dra. Tatiana quero agradecer a atenção especial, que fez toda diferença neste mestrado para que eu pudesse concluí-lo.*

*E, por fim, a todos que de perto ou longe, foram acalento nesta etapa da minha vida, meu muito obrigada!*



“Aqueles que se sentem satisfeitos sentam-se e nada fazem.

Os insatisfeitos são os únicos benfeitores do mundo.”

(Walter S. Landor)

## RESUMO

O diabetes *mellitus* (DM) é considerado um grupo heterogêneo de distúrbios metabólicos que apresentam em comum a hiperglicemia decorrente de defeitos na secreção ou ação da insulina, ou ainda quando ambos ocorrem. A condição hiperglicêmica oriunda da instalação do DM pode desempenhar um papel importante na alteração da homeostasia celular, como resultado de alterações funcionais e estruturais em vários componentes celulares, por exemplo, na cromatina. Algumas alterações cromatínicas podem estar diretamente relacionadas a mudanças na expressão gênica em células de defesa do organismo como os linfócitos, cuja disfunção pode ser relacionada à alteração da função imune no diabetes *mellitus*. Portanto, nosso objetivo foi pesquisar mudanças na organização da cromatina de linfócitos do sangue periférico de indivíduos portadores de diabetes 1 e 2, quando comparados a indivíduos não portadores. No presente estudo, foram incluídos 20 participantes, homens e mulheres, com idade entre 18 e 55 anos, sendo casos *versus* controles pareados por sexo e idade. Os participantes foram divididos em três grupos: Grupo 1, portadores de DM tipo 1, Grupo 2, portadores de DM tipo 2, e o Grupo Controle, não portadores de diabetes *mellitus*. Amostras de sangue periférico foram coletadas de todos os indivíduos pela manhã após um período de jejum de 8 horas, seguida de dosagem de glicemia e hemoglobina glicada. As células mononucleares das amostras heparinizadas de cada participante foram isoladas usando o método do Ficoll. As células isoladas foram citocentrugadas em lâminas para microscopia, fixadas e coradas pela reação de Feulgen. Para avaliação de parâmetros morfométricos de organização nuclear e da cromatina, imagens digitais de núcleos corados foram submetidas a análise de imagem e os resultados foram correlacionados com os resultados das dosagens bioquímicas. Alterações semelhantes na organização da cromatina foram encontradas em linfócitos para ambos os tipos de diabetes, incluindo o aumento da compactação e reorganização da cromatina, mas com evidências muito mais pronunciadas de aneuploidia em linfócitos de indivíduos com DM1. Os níveis de hemoglobina glicada foram correlacionados positivamente com os níveis de glicose no sangue em DM1 e DM2. No entanto, para o grupo 1, a única correlação estatisticamente significativa encontrada foi entre glicemia, hemoglobina glicada e conteúdo de DNA. Para o grupo 2, a glicemia, mesmo mostrando valores menores quando comparados com aqueles para DM1, correlacionou-se bem com todos os parâmetros nucleares, exceto as alterações no conteúdo de DNA, que foram mais discretas para este grupo. Pelos resultados obtidos pode-se inferir que ambos os tipos de diabetes, pela condição hiperglicêmica induzida pelo DM, estão associados a importantes alterações estruturais nos núcleos de linfócitos humanos, as quais, acreditamos, possam ser a causa para alterações funcionais neste tipo celular, com conseqüente prejuízo nas funções imunes dos indivíduos.

**Palavras-chave:** diabetes *mellitus*, linfócitos, cromatina, núcleo celular.

## ABSTRACT

Diabetes *mellitus* (DM) is considered an heterogeneous group of metabolic disorders with hyperglycemia as a common event, because of defects in insulin secretion and/or action. Hyperglycemic condition resultant of DM can have a key role in changing cellular homeostasis, as a result of functional and structural alterations in several cellular components, being chromatin and example. Some changes in chromatin may be associated with changes in gene expression in immune cells as lymphocytes, which can lead to the dysfunction immune response on diabetes *mellitus* . Therefore, our aim was to screen for changes in chromatin organization of peripheral blood lymphocytes of both types 1 and 2 diabetic and non-diabetic subjects. In the present study, 20 men and women, with age range between 18 to 55 years old, have participated. Subjects were divided into three groups: Group 1, DM1 subjects, Group 2, DM2 subjects, and Group3, non-diabetic subjects or control group, paired with the other two groups by age and gender. Peripheral blood samples were collected from all subjects in the morning after an 8 hours fasting period, followed by dosage of glycaemia and glycated hemoglobin. Peripheral blood mononuclear cells from heparinized samples were isolated using the Ficoll method. Isolated cells were cytocentrifuged onto microscopy slides, fixed and Feulgen-stained. For evaluation of morphometric parameters of nuclear and chromatinic organization, digital images of stained nuclei were subjected to image analysis, and the results were correlated with results from blood dosages. Similar changes in chromatin organization were found in blood lymphocytes for both types of diabetes, including increased chromatin packaging and reorganization in diabetic subjects, but with a much more pronounced evidence of aneuploidy on lymphocytes of DM1 subjects. Glycated hemoglobin levels were positively correlated with blood glucose levels in both types of diabetes. However, for group1 the only statistical significant correlation found was between glycaemia, glycated hemoglobin and DNA content. For the group 2, glycaemia, even showing smaller values when compared with those for DM1, correlated well with all nuclear parameters, except changes in DNA content, which were more discrete for this group. According to present results, it is clear that both types of diabetes, as a consequence of hyperglycemia, are associated with important structural alterations in nuclei of human lymphocytes, which, we believe, may be causative agents of functional changes in this cell type, with consequent decline in immune functions of individuals.

**Key words:** diabetes *mellitus*, lymphocytes, chromatin, cell nucleus.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APCs - Células Apresentadoras de Antígenos

DM - Diabetes *mellitus*

DM1 - Diabetes *mellitus* tipo 1

DM2 - Diabetes *mellitus* tipo 2

HbA1c - Hemoglobina glicada

HC-UFU - Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia

ICBIM - Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal de Uberlândia

IDF - International Diabetes Federation

IOD - densidade óptica integrada

IL - Interleucina

IFN- $\gamma$  - Interferon-gama

Treg- Linfócitos T reguladores

LTh - Linfócitos T auxiliares

MPTs - modificações pós traducionais

MHC - Complexo principal de histocompatibilidade

NK - células *natural killer*

OD - densidade óptica média

PBMCs - células mononucleares do sangue periférico

SBD - Sociedade Brasileira de Diabetes

SIH - Sistema de Informação Hospitalar

TNF- $\alpha$  - fator de necrose tumoral  $\alpha$

WHO - World Health Organization

## LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Dosagens da glicemia de jejum dos participantes do Grupo 1 e Controle .....	40
Gráfico 2. Dosagens da HbA1c dos participantes do Grupo 1 e Controle .....	41
Gráfico 3. Dosagens da glicemia de jejum dos participantes do Grupo 2 e Controle.....	50
Gráfico 4. Dosagens da HbA1c dos participantes do Grupo 2 e Controle.....	51

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Comparativo da área nuclear <i>versus</i> OD de núcleos de linfócitos do Grupo 1 <i>versus</i> Controle.....	43
Figura 2. Histogramas de parâmetros nucleares dos linfócitos analisados para Grupo 1 (DM1) e seus respectivos controles (Controle) .....	44
Figura 3. Imagens de núcleos de linfócitos do Grupo 1 e Controle em escala de cinza....	46
Figura 4. Histogramas comparativos do Conteúdo Feulgen-DNA (IOD) e das Densidades ópticas médias (OD).....	46
Figura 5. Correlação entre absorvância média por núcleo (OD) e Densidade óptica intergrada - Conteúdo Feulgen-DNA (IOD) para o Grupo 1 e Controle.....	47
Figura 6. Histogramas de parâmetros nucleares dos linfócitos analisados para Grupo 2 (DM2) e seus respectivos controles (Controle).....	53
Figura 7. Imagens de núcleos de linfócitos do Grupo 2 e Controle em escala de cinza....	55
Figura 8. Correlação entre absorvância média por núcleo (OD) e Densidade óptica intergrada - Conteúdo Feulgen-DNA (IOD) para o Grupo 2 e Controle.....	55

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Dados clínicos dos participantes do Grupo 1.....	41
Tabela 2. Comparação intragrupo Linfócitos do Grupo 1 para parâmetros nucleares.....	42
Tabela 3. Comparação intragrupo Linfócitos Controle para parâmetros nucleares.....	42
Tabela 4. Efeitos do DM1 em parâmetros nucleares de linfócitos humanos.....	43
Tabela 5. Média individual de glicemia de jejum e de hemoglobina glicada (HbAc1) e média geral por Grupos (DM1 e Controle).....	48
Tabela 6. Correlações de Pearson entre parâmetros nucleares e bioquímicos para DM1..	49
Tabela 7. Dados clínicos dos participantes do Grupo 2 .....	51
Tabela 8. Comparação intragrupo Linfócitos do Grupo 2 para parâmetros nucleares.....	52
Tabela 9. Comparação intragrupo Linfócitos Controle para parâmetros nucleares.....	52
Tabela 10. Efeitos do DM2 em parâmetros nucleares de linfócitos humanos.....	53
Tabela 11. Média individual de glicemia de jejum e de hemoglobina glicada (HbAc1) e média geral por Grupos (DM2 e Controle).....	56
Tabela 12. Correlações de Pearson entre parâmetros nucleares e bioquímicos para DM2	57

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	14
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	16
2.1. O Diabetes <i>mellitus</i> .....	16
2.2. A Cromatina: organização e alterações .....	21
2.3. Linfócitos: características gerais e funções .....	23
2.3.1. O papel dos linfócitos na fisiopatogenia do Diabetes <i>mellitus</i> tipo 1.....	27
2.3.2. O papel dos linfócitos na fisiopatogenia do Diabetes <i>mellitus</i> tipo 2 .....	29
2.4. Memória metabólica .....	30
3. OBJETIVOS.....	32
3.1. Objetivo Geral.....	32
3.2. Objetivos Específicos.....	32
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	33
4.1. Aspectos Éticos e Legais .....	33
4.2. Participantes da Pesquisa.....	33
4.3. Critérios de Inclusão e Exclusão .....	34
4.4. Amostras.....	34
4.5. Técnicas Empregadas.....	34
4.5.1. Dosagem glicemia de jejum.....	34
4.5.2. Dosagem hemoglobina glicada (HbA1c).....	35
4.5.3. Isolamento das células mononucleares (PBMCs).....	35
4.5.4. Citoquímica.....	36
4.6. Análise de imagem.....	36
4.7. Análise estatística.....	38
5. RESULTADOS .....	39
5.1. Análises comparativas do Grupo 1 <i>versus</i> Controle para parâmetros bioquímicos e citoquímicos .....	39
5.1.1. Glicemia de jejum e hemoglobina glicada do Grupo 1 e de seus respectivos controles .....	39
5.1.2. Perfil das análises citoquímicas para linfócitos do Grupo 1 e seus respectivos controles .....	42
5.1.3. Correlação dos parâmetros bioquímicos <i>versus</i> parâmetros nucleares para DM1.....	48
5.2. Análises comparativas do Grupo 2 <i>versus</i> Controle para parâmetros bioquímicos e citoquímicos .....	49
5.2.1. Glicemia de jejum e hemoglobina glicada do Grupo 2 e de seus respectivos controles.....	49
5.2.2. Perfil das análises citoquímicas para linfócitos do Grupo 2 e seus respectivos controles.....	52
5.2.3. Correlação dos parâmetros bioquímicos <i>versus</i> parâmetros nucleares para DM2 .....	55
6. DISCUSSÃO .....	58
7. CONCLUSÃO .....	63
REFERÊNCIAS.....	64
ANEXO A - Parecer Consubstanciado do CEP.....	76
ANEXO B – Instrumento de coleta de dados.....	77
ANEXO C – Termos de Consentimento Livre e Esclarecido.....	80

## 1. INTRODUÇÃO

O diabetes é sem dúvida um dos problemas de saúde mais relevantes da atualidade, traduzindo-se em grande desafio para os sistemas de saúde de todo o mundo (BRASIL, 2013). Segundo os dados da International Diabetes Federation, em 2015, 415 milhões de adultos com idades entre 20 e 79 anos tinham diabetes em todo o mundo. No entanto, estima-se que este número chegue a 642 milhões em 2040 (IDF, 2015).

O termo diabetes *mellitus* (DM) é usado para denominar um grupo de distúrbios metabólicos provocados pela deficiência na produção da insulina pelo pâncreas, ou quando a ação deste hormônio está prejudicada, ocasionando um aumento na concentração de glicose no sangue (WHO, 2017). O DM é decorrente da interação entre fatores ambientais e predisposição genética do indivíduo (McCARTHY; MENZEL, 2001; ATKINSON, 2012).

Atualmente a classificação do diabetes *mellitus* é baseada na etiologia e não no tipo de tratamento da doença. De acordo com a World Health Organization (WHO) (2006), American Diabetes Association (ADA) (2014) e Sociedade Brasileira de Diabetes (SBD) (2015-2016) essa classificação inclui quatro classes clínicas: o diabetes *mellitus* tipo 1 (DM1), o diabetes *mellitus* tipo 2 (DM2), outros tipos específicos de diabetes *mellitus* e o diabetes *mellitus* gestacional. As duas primeiras classes serão abordadas no presente trabalho.

O DM gera complicações macrovasculares e microvasculares que diminuem consideravelmente a qualidade de vida dos portadores da doença (MELENDEZ-RAMIREZ; RICHARDS; CEFALU, 2010). Também provoca alterações no sistema imune, que se reflete em um número aumentado de infecções (CALVET; YOSHIKAWA, 2001; PELEG et al., 2007). Além disso, os custos elevados com tratamentos dos doentes geram um grande impacto nos serviços de saúde (BRASIL, 2013).

A hiperglicemia ocasionada pelo DM pode estar vinculada a alterações na estrutura da cromatina (MIAO et al., 2004; MIAO et al., 2007; SCHONES; LEUNG; NATARAJAN, 2015). A cromatina é uma estrutura dinâmica formada pela associação da molécula de DNA com proteínas nucleares, em especial as histonas. A subunidade funcional e estrutural da cromatina é o nucleossomo, que é composto por oito proteínas histonas, que formam um octâmero, ligadas a aproximadamente 147 pares de bases de DNA (ácido desoxirribonucléico) (SEXTON et al, 2007). Essa estrutura é importante para organizar funcionalmente o DNA no núcleo celular (BAUER; MARTIN, 2017).

O remodelamento da cromatina é um processo ativo, no qual a cromatina compacta, inacessível, e em seu estado repressivo é convertida para um estado aberto e acessível à

transcrição gênica ou vice-versa (JENUWEIN; ALLIS, 2001). Este processo de remodelamento da cromatina é influenciado pela integração de sinais intra e extracelulares (BADEAUX; SHI, 2013).

As mudanças na estrutura da cromatina podem ser controladas por mecanismos epigenéticos. Estes promovem mudanças na expressão gênica em face de diversos estímulos, porém sem ocorrer mudanças na sequência de DNA (BOLLATI; BACCARELLI, 2010). Portanto, a epigenética estuda as alterações que vão além da sequência gênica, incluindo: modificações de histonas; metilação do DNA; e atuação de RNAs não codificantes, que são os RNAs de interferência (EGGER et al., 2004). As alterações epigenéticas podem estar presentes em várias patologias, incluindo o DM (ARAKI; MIMURA, 2017).

Já foram descritas também alterações no funcionamento do sistema imunológico no DM (CALVET; YOSHIKAWA, 2001). Neste contexto, há que se considerar que os linfócitos, células pertencentes a esse sistema, morfologicamente classificados como leucócitos mononucleares, e fundamentais para a resposta imune celular e humoral (ALBERTS et al., 2010; MURPHY; TRAVERS; WALPORT, 2010) devem ser estudados a fim de compreender os mecanismos moleculares envolvidos nas possíveis alterações no nível celular, em consequência da perturbação da homeostasia da glicose no organismo.

Visto que alterações nos níveis de glicose no organismo, característica do diabetes *mellitus*, pode provocar alterações na estrutura da cromatina em diferentes populações celulares, o presente trabalho teve por objetivo analisar alterações cromatínicas em linfócitos de pacientes com DM1 e DM2, que possam contribuir para a compreensão dos mecanismos subjacentes às alterações no sistema imune no DM.

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1. O Diabetes *mellitus*

O Diabetes *mellitus* refere-se a um grupo de distúrbios metabólicos multifatoriais que ocorrem quando o pâncreas produz pouca ou nenhuma insulina, ou ainda quando o corpo não consegue utilizá-la de forma eficaz. Esta condição leva a um aumento da concentração de glicose no sangue (hiperglicemia) (GUYTON; HALL, 2006; WHO, 2015<sub>a</sub>; IDF, 2017).

Atualmente o DM é considerado um dos maiores problemas de saúde pública em todo o mundo, e sua incidência é crescente (BRASIL, 2013). A doença causou 4,9 milhões de mortes em 2014 (IDF, 2014). Em 2015, o Brasil ocupava a 4<sup>a</sup> posição entre os países com maior prevalência da doença, configurando 14,3 milhões de pessoas portadoras (IDF, 2015). E, de acordo com WHO, a doença será a 7<sup>a</sup> principal causa de morte em 2030 (WHO, 2015<sub>b</sub>).

Existem dois tipos principais de diabetes *mellitus*: tipo 1 e tipo 2. O DM1 é geralmente de origem autoimune, neste caso ocorre a destruição das células beta pancreáticas, responsáveis pela produção de insulina no organismo, levando à perda total da produção deste hormônio ao longo do tempo (PALMER et al., 1983; ATKINSON, 2012; ADA, 2014). O DM2 resulta de uma combinação da deficiência na ação da insulina e disfunção das células beta pancreáticas (RAZ et al., 2013; ZANG et al., 2017). O diabetes *mellitus* tipo 2 responde por 90% dos casos diagnosticados (McCARTHY; MENZEL, 2001; ADA, 2014).

O diabetes *mellitus* tipo 1 apresenta fisiopatogenia complexa, que envolve a participação de vários fatores, dentre estes estão a susceptibilidade imunogenética que está associada fortemente aos genes de histocompatibilidade (ONENGUT-GUMUSCU; CONCANNON, 2002), fatores ambientais (SALMINEN et al., 2004), resposta autoimune que pode ser detectada pela presença de autoanticorpos (LIU; EISENBARTH, 2002; BARKER et al., 2004) e desequilíbrio nos mecanismos de tolerância imunológica aos antígenos próprios (ATKINSON, 2012).

O processo de destruição das células beta das ilhotas é ocasionado pela agressão imunológica mediada por células, sendo caracterizada pela presença de infiltrado inflamatório predominantemente linfomononuclear, configurando o quadro de insulite. Os linfócitos T CD8 são as células predominantes neste processo, porém também estão presentes os linfócitos T CD4, linfócitos B, macrófagos e células *natural killer* (SESTERHEIN; SAITOVITCH; STAUB, 2007; IN'T VELD, 2011). O processo de insulite parece ocorrer com maior intensidade em ilhotas onde existam células beta metabolicamente ativas, ou seja, que

secretam insulina. Ao longo do tempo as células beta vão diminuindo em número, assim como a intensidade do processo inflamatório (SESTERHEIN; SAITOVITCH; STAUB, 2007). A resposta celular é acompanhada por uma resposta humoral que corresponde à produção de auto-anticorpos contra uma ampla gama de antígenos das células beta (IN'T VELD, 2011).

Em ambos os tipos de diabetes, o efeito final mais importante é a hiperglicemia. Por conseguinte, a hiperglicemia persistente ocasiona uma toxicidade ao organismo por três mecanismos distintos: promove a glicação de proteínas, hiperosmolalidade e aumento dos níveis de sorbitol intracelular (LANG, 2000).

Enquanto que no DM1 os níveis de insulina estão drasticamente diminuídos, no DM2 um aumento da insulina plasmática pode ser observado. Isto ocorre porque as células beta pancreáticas promovem uma resposta compensatória a uma sensibilidade diminuída deste hormônio nos tecidos-alvos. Esta condição é denominada de resistência à insulina, a qual prejudica a utilização e o armazenamento dos carboidratos. Assim, conseqüentemente há um aumento do nível da glicose sanguínea que estimula um acréscimo compensatório na secreção da insulina (GUYTON; HALL, 2006; RAZ et al., 2013).

Para que ocorra a captação de glicose pelas células, a insulina por meio de sua ligação com seu receptor estimula a translocação de vesículas contendo transportadores de glicose (GLUTs) do conteúdo intracelular para a superfície celular, permitindo assim a entrada de glicose na célula. No entanto, a resistência à insulina é caracterizada, entre outros fatores, por uma redução na capacidade de captação da glicose pelos tecidos sensíveis à insulina (ZHOU; SHENTU; XU, 2017). O mecanismo preciso envolvido na causa da resistência à insulina ainda não se encontra totalmente elucidado. No entanto, muitos estudos têm demonstrado que está relacionado com alterações moleculares na via de sinalização da insulina, principalmente na ativação da translocação dos transportadores de glicose à membrana plasmática das células (ZAID et al., 2008; ZHOU; SHENTU; XU, 2017).

Enquanto as células beta secretam quantidades suficientes de insulina para compensar a resistência à insulina, a tolerância à glicose permanece normal. Com o tempo, no entanto, pode ocorrer falha progressiva na função das células beta, o que leva ao desenvolvimento da condição clínica conhecida como tolerância à glicose diminuída e eventualmente, do diabetes *mellitus* tipo 2 (RAZ et al., 2013).

O DM2 é desencadeado pela interação de fatores genéticos e ambientais (McCARTHY; MENZEL, 2001). A inflamação do pâncreas também foi apontada como contribuinte na fisiopatologia do DM2, pois um elevado número de macrófagos foi detectado

em ilhotas pancreáticas de pacientes com a doença, e um aumento dos níveis de quimiocinas e citocinas (EHSES et al., 2007).

A obesidade tem sido considerada um fator de risco para DM2. Estudos recentes constataram a presença de um infiltrado de macrófagos, linfócitos B e T no tecido visceral adiposo em humanos obesos. Assim como em modelos murinos, o número elevado destas células e o estado inflamatório estavam diretamente relacionados ao grau de resistência à insulina. Além disso, alterações em algumas subclasses de IgGs são observadas na resistência à insulina relacionada à obesidade (WINER et al., 2011). DeFuria e colaboradores (2013) também mostraram que os linfócitos B promovem a inflamação na obesidade e no DM2 por meio da secreção de citocinas inflamatórias e da regulação da função dos linfócitos T.

Dentre os fatores que estão envolvidos na expansão da prevalência do DM2 no mundo estão o aumento da expectativa de vida da população mundial. Também estão envolvidos o aumento do sobrepeso e obesidade, resultantes da adoção de estilos de vida pouco saudáveis como sedentarismo e dieta inadequada (ZIMMET; ALBERTI; SHAW, 2001; BRASIL, 2013; WHO, 2015<sub>b</sub>). O DM1 se manifesta com maior proporção na infância e adolescência, e sua incidência varia muito entre países e entre diferentes populações étnicas (CRAIG et al., 2014). Além dos fatores genéticos, uma variedade de fatores ambientais, incluindo a exposição a agentes infecciosos no início da vida, a quantidade e a composição dos alimentos, a quantidade de exercício físico e alterações nos padrões de sono e também obesidade foram relacionados à crescente incidência de diabetes tipo 1 (FOURLANOS et al., 2008).

Em ambos os tipos de DM, as complicações debilitantes da doença causam perda significativa da qualidade de vida e geram altos custos com tratamentos (BRASIL, 2013; IDF, 2017). Dentre as complicações estão as doenças macrovasculares como aterosclerose, acidente vascular cerebral e doença vascular periférica. E as microvasculares como retinopatia, neuropatia periférica e nefropatia (YEBOAH et al., 2011; VILLENEUVE, REDDY, NATARAJAN, 2011, WHO, 2016).

Há também uma maior incidência de infecções em portadores de diabetes, bem como apresentam maior complicação quando comparados a não portadores (GEERLINGS; HOEPELMAN, 1999; MULLER et al., 2005; GUPTA et al., 2007). Korbel e Spencer (2015) realizaram um estudo de análise retrospectiva sobre pacientes portadores de diabetes que buscaram atendimento médico em departamentos de emergência ou foram hospitalizados para tratamento de infecção nos Estados Unidos entre 2006 e 2011. O estudo mostrou que portadores de diabetes estão comumente presentes em departamentos de emergência e requerem hospitalização para o tratamento de infecções. A infecção do trato urinário

apresentou-se como a mais comum, porém outras infecções comuns incluíram sepse, pneumonia, infecções cutâneas e de tecidos moles. Os portadores de diabetes apresentaram mais de duas vezes maior propensão à hospitalização para tratamento de infecção do que pacientes não portadores.

A questão então surge sobre quais mecanismos seriam responsáveis por esta alta taxa de infecção em pacientes com DM. As possíveis causas incluem alterações na resposta imune, presença de micro e macroangiopatia ou neuropatia e o elevado número de intervenções médicas neste grupo de pacientes. Além disso, um ambiente hiperglicêmico também foi apontado como propício para aumento da virulência de certos microrganismos (GEERLINGS; HOEPELMAN, 1999).

As alterações na resposta imune no DM parecem ocorrer principalmente na imunidade mediada por células, com anormalidades nos leucócitos polimorfonucleares, monócitos e linfócitos, em face das alterações na adesão, quimiotaxia, fagocitose e morte celular (CALVET; YOSHIKAWA, 2001). Além disso, estudos demonstram os efeitos adversos que a hiperglicemia causa em várias células do organismo incluindo as beta pancreáticas, endoteliais (VILLENEUVE et al., 2008), monócitos (MIAO et al., 2007) e linfócitos (MIAO et al., 2008).

Atualmente os critérios aceitos para o diagnóstico do DM de acordo com a WHO, ADA e SBD são: Glicemia de jejum, após período de ausência de ingesta calórica no mínimo de 8 horas, com resultado maior ou igual a 7.0 mmol /L (126 mg/dL); ou dosagem da glicemia 2 horas após a administração de 75 gramas de glicose durante um teste oral de tolerância à glicose (TOTG) obtendo resultado maior ou igual 11.1mmol/L (200 mg/dL); ou no caso de sintomas clássicos de hiperglicemia, poliúria, polidipsia e perda ponderal de peso deve ser considerado o resultado de glicemia casual maior ou igual a 11.1mmol/L (200 mg/dL), compreendendo-se por glicemia casual aquela obtida a qualquer hora do dia, independentemente do horário das refeições; ou dosagem da hemoglobina glicada (HbA1c) maior ou igual a 6,5% (WHO, 2011; ADA, 2014; Diretrizes SBD, 2015-2016).

Para estabelecer o diagnóstico do DM, o teste de escolha sempre deve ser repetido em outro dia, salvo quando há hiperglicemia inquestionável com descompensação metabólica aguda ou sintomas claros de DM. (Diretrizes SBD, 2015-2016).

O termo hemoglobina glicada define um grupo de substâncias formadas a partir da reação entre a hemoglobina A (HbA) e um açúcar. A ligação entre a HbA e a glicose é o produto de uma reação não enzimática definida como glicação. A A1C é um componente menor da hemoglobina A, na qual há um resíduo de glicose ligado ao grupo amino terminal

(resíduo de valina) de uma ou de ambas as cadeias beta da HbA (CHANDALIA; KRISHNASWAMY, 2002; SUMITA; ANDRIOLO, 2008). O percentual de A1C está diretamente relacionado à concentração de glicose sanguínea e ao tempo de exposição da hemoglobina à glicose (SUMITA; ANDRIOLO, 2008).

Os valores normais de referência da HbA1c em indivíduos não portadores de diabetes vão de 4% a 6%. A dosagem da HbA1c reflete a concentração glicêmica média do plasma ao longo de 2 a 3 meses anteriores (GRUPO INTERDISCIPLINAR DE PADRONIZAÇÃO DA HEMOGLOBINA GLICADA – A1C, 2009). A coleta da amostra para análise pode ser realizada em qualquer hora do dia e não requer qualquer preparação especial, como jejum. Estas propriedades definiram esta dosagem como padrão ouro para avaliar o controle glicêmico em indivíduos portadores de diabetes (THE INTERNATIONAL EXPERT COMMITTEE, 2009).

O resultado de HbA1c de 6,5% é recomendado como o ponto de corte para o diagnóstico de diabetes, porém um valor inferior não exclui o diabetes diagnosticado usando testes de glicose anteriormente mencionados. Quando o resultado da HbA1c for maior que 6,5% o diagnóstico deve ser confirmado com um teste de repetição, a menos que o indivíduo apresente sintomas clínicos e níveis de glicose do plasma maiores que 11.1mmol/L (200 mg/dL) não são necessários novos testes (WHO, 2011).

A dosagem da HbA1c é útil no acompanhamento dos pacientes já diagnosticados com DM (SUMITA; ANDRIOLO, 2008; Diretrizes SBD, 2015-2016), pois as doenças cardiovasculares, incluindo o acidente vascular cerebral, doença arterial coronariana e doença arterial periférica, são significativas causas de mortalidade em portadores de diabetes, bem como em toda a população. Com efeito, entre os indivíduos com diabetes, um aumento de 1% nos níveis da hemoglobina glicada está associado com um aumento de 31% em eventos cardiovasculares (DCCT/EDIC, 2016).

O tratamento do diabetes inclui o controle da glicemia por meio da adoção de alimentação saudável aliada à prática de atividade física (WHO, 2016). O portador de DM1 torna-se dependente da administração de insulina exógena ao longo da vida, a fim de controlar os níveis de glicemia (ZIMMET, ALBERTI, SHAW, 2001; WEDGWOOD et al., 2016). Os tratamentos para o DM2 são indicados de acordo com as características clínicas do paciente, visando manter o controle glicêmico adequado. Dentre os tratamentos podem ser adotados o uso de medicamento oral (hipoglicemiantes, anti-hiperglicemiantes e sensibilizadores da ação da insulina), medicamento oral associado à insulina ou somente insulina (Diretrizes SBD, 2015-2016). A via usualmente utilizada para a aplicação diária de insulina é a subcutânea,

pois a extensa rede de capilares proporciona a absorção paulatina da insulina e garante o perfil farmacocinético da mesma (Diretrizes SBD, 2014-2015).

## **2.2. A Cromatina: organização e alterações**

O DNA nos eucariotos encontra-se associado a proteínas, que são divididas em duas classes gerais: as histonas e as não histonas, formando a cromatina. As histonas são responsáveis pelo primeiro nível fundamental de compactação do DNA, o nucleossomo (ALBERTS et al., 2010).

A estrutura do nucleossomo consiste em um octâmero de histonas, formado por duas cópias de cada uma das histonas H2A, H2B, H3 e H4, que é circundado por uma dupla fita de DNA com 147 pares de nucleotídeos. Este arranjo é auxiliado por uma quinta histona, a H1 que interage predominantemente com o DNA de ligação. As bases nitrogenadas do DNA ligam-se às argininas das histonas através de pontes de hidrogênio (DECHASSA; LUGER, 2012).

A cromatina possui uma estrutura dinâmica e o controle da expressão gênica está diretamente relacionado ao grau de compactação e organização da mesma (ALBERTS et al., 2010; MEDA et al., 2011). A estrutura da cromatina pode ser dividida em duas categorias distintas baseado na perspectiva da associação com transcrição de genes: a eucromatina e a heterocromatina. A eucromatina é uma região na qual cromatina apresenta-se mais aberta, o que permite a acessibilidade dos fatores de transcrição para o DNA, resultando em ativação de genes. Já a heterocromatina é uma estrutura de cromatina fechada, na qual o material genético geralmente não está envolvido na transcrição (ARAKI; MIMURA, 2017).

As mudanças na estrutura da cromatina, que influenciam na expressão gênica, podem ser controladas por padrões epigenéticos (ARAKI; MIMURA, 2017). A epigenética estuda algo que está “acima da genética”, como remete o próprio significado da palavra (HOLLIDAY, 2006). Portanto, a epigenética não estuda as alterações na sequência de pares de bases do DNA, mas as alterações que vão além da sequência gênica (EGGER et al., 2004). Os dois mecanismos principais envolvidos nestas alterações são as modificações de histonas e metilação do DNA. Esses mecanismos atuam modificando a acessibilidade da cromatina para a regulação da transcrição gênica, localmente ou globalmente, pelas modificações no DNA e pelas modificações ou rearranjos dos nucleossomos (EGGER et al., 2004).

A regulação epigenética da expressão gênica é, pelo menos em parte, mediada por modificações pós traducionais (MPTs) de histonas (BANNISTER; KOUZARIDES, 2011).

Cada uma das histonas possui uma "cauda" N-terminal de aminoácidos que se projeta para fora do octâmero, e são essas caudas que estão sujeitas a diferentes tipos de modificações covalentes (ALBERTS et al., 2010). Tais como metilação, acetilação, fosforilação, e ubiquitinação, que atuam na regulação da expressão de genes e controlam a condensação da cromatina, além de remodelar sua estrutura altamente organizada. Isto indica que as MPTs das histonas contribuem para alterar a cromatina tanto funcionalmente como estruturalmente (KOUZARIDES, 2007; WANG, H. et al, 2001).

Estudos recentes têm sugerido que as mudanças na estrutura da cromatina possam explicar parcialmente as mudanças nas funções celulares e desempenhem um papel no desenvolvimento de muitas doenças, incluindo doenças cardiovasculares, neurológicas, câncer e também distúrbios metabólicos (BAUER; MARTIN, 2017; SUNG et al., 2017; HAUSER; HENSHALL; LUBIN, 2017).

As alterações na estrutura da cromatina também têm sido estudadas na patogênese do diabetes *mellitus*. Miao e colaboradores (2004) observaram que condições de hiperglicemia e diabetes poderiam induzir uma remodelação da cromatina e modificações de histonas. Os autores concluíram que estes eventos proporcionavam uma maior interação entre os principais fatores de transcrição que regulam o processo inflamatório e genes relacionados com o diabetes.

Miao e colaboradores (2007), utilizando a técnica de imunoprecipitação de cromatina, acoplada a DNA microarrays, demonstraram que a remodelação da cromatina, em cultura de monócitos tratados com alta concentração de glicose e monócitos de pacientes portadores de diabetes, pode permitir uma maior ativação de genes relacionados a processos inflamatórios. Os resultados mostraram que a acetilação de histonas em genes específicos de monócitos em condições hiperglicêmicas representa um importante marcador do estado inflamatório aumentado nos portadores de DM.

Outro estudo que analisou monócitos e linfócitos de pacientes com DM1 *versus* controles saudáveis, utilizando a mesma técnica anteriormente mencionada, revelou um subconjunto de genes em linfócitos do grupo de portadores de diabetes exibindo aumento de metilação de histonas e ativação de genes-alvo vinculados a respostas imunes e inflamatórias muitas vezes associadas com DM1 e suas complicações (MIAO et al., 2008).

### 2.3. Linfócitos: características gerais e funções

Os linfócitos fazem parte de uma população heterogênea que difere entre si em estruturas de superfície, em suas funções, origem, tempo de vida médio e localização anatômica. Porém, apresentam algumas características morfológicas como tamanho, granularidade e relação núcleo-citoplasma que permitem distinguir os linfócitos de qualquer outra população de células, mas estas características não fornecem qualquer informação que permita identificar linhagem ou função celular (WEINBERG, 1998; BAEHNER, 2005; ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008).

Em relação à morfologia nuclear os linfócitos apresentam núcleos que não sofrem lobulação, geralmente permanecem esféricos ou adquirem uma pequena reentrância. Por isso são denominados leucócitos mononucleares (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008; ALBERTS et al., 2010).

A maioria dos linfócitos maduros do sangue periférico humano é pequena, medindo 10  $\mu\text{m}$  ou menos de diâmetro, embora formas maiores sejam comuns. Quando observados à microscopia de luz, os linfócitos possuem um núcleo geralmente arredondado ou ligeiramente indentado composto de densos agregados de cromatina e o citoplasma em relação ao núcleo apresenta-se escasso (WEINBERG, 1998; BAEHNER, 2005).

Sabe-se que, as células-tronco pluripotentes da medula óssea dão origem às células progenitoras mielóides e linfóides. Os linfócitos B, T e células NK se originam dos progenitores linfóides. As células que vão se diferenciar em linfócitos B permanecem na medula óssea e quando maduras entram na circulação se direcionando aos órgãos linfóides secundários. Já as células que se diferenciarão em linfócitos T migram para o timo, onde ocorrem os processos de diferenciação, seleção, maturação celular e o estabelecimento da tolerância aos autoantígenos, somente os linfócitos T maduros entram na circulação. Nos órgãos linfóides periféricos os antígenos estranhos ativam as células T e B (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008; ALBERTS et al., 2010; MURPHY; TRAVERS; WALPORT, 2010).

As funções desempenhadas pelos linfócitos apresentam como principais características, a especificidade e diversidade de reconhecimento, memória, especialização de resposta e tolerância a componentes do próprio organismo. Portanto, os linfócitos fazem parte da imunidade adaptativa do organismo que também é conhecida como imunidade adquirida ou específica. Já que o sistema imune adaptativo reconhece e reage a um grande número de substâncias microbianas e não microbianas (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008).

A imunidade adaptativa se subdivide em imunidade humoral e imunidade celular ou mediada por células. A imunidade humoral é mediada pelos linfócitos B, também denominados células B, por meio da secreção de anticorpos. Já os linfócitos T, ou células T, medeiam a imunidade celular promovendo a destruição de microrganismos que residem nos fagócitos ou morte de células infectadas. Alguns linfócitos T também promovem a eliminação de patógenos extracelulares recrutando leucócitos que irão destruí-los ou auxiliarão os linfócitos B na produção de anticorpos (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008; MURPHY; TRAVERS; WALPORT, 2010).

Os linfócitos B e T podem ser distinguidos morfológicamente um do outro somente após terem sido ativados pelo antígeno, pois são muito similares quando ainda não foram ativados, mesmo quando analisados por microscopia eletrônica. O linfócito B efetor na sua forma mais diferenciada possui um extenso retículo endoplasmático que está ativo na produção de anticorpos. Em contrapartida, o linfócito T efetor contém um retículo endoplasmático pouco desenvolvido e não secreta anticorpos, mas uma variedade de proteínas sinalizadoras denominadas citocinas, as quais atuam como mediadoras (ALBERTS et al., 2010).

Estas populações de células possuem proteínas de membrana que são marcadores fenotípicos para distingui-las entre si, assim os linfócitos B e T, expressam as moléculas CD19 e CD3, respectivamente (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008; MURPHY; TRAVERS; WALPORT, 2010).

O CD19 de membrana é um dos marcadores mais precoces da linhagem B que continua a ser expresso em todas as fases da maturação dos linfócitos B (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008; MURPHY; TRAVERS; WALPORT, 2010). Além desse marcador fenotípico, há na superfície de membrana dos linfócitos B o denominado complexo do receptor de LB (BCR) que inclui, além da imunoglobulina de membrana, duas cadeias peptídicas,  $Ig\alpha$  e  $Ig\beta$ , que têm função de dar início à sinalização intracelular após o encontro com o antígeno. Os linfócitos B também atuam como células apresentadoras de antígeno, após interiorizarem e processarem o antígeno que foi ligado ao BCR (RUDIN; THOMPSON, 1998; MCHEYZER-WILLIAMS, 2003; MURPHY; TRAVERS; WALPORT, 2010).

A ativação dos linfócitos B por meio da ligação de um antígeno ao seu receptor de superfície irá desencadear um processo de proliferação e diferenciação dessas células em plasmócitos que produzirão imunoglobulinas com alta afinidade para o epítipo do antígeno que originou a resposta. No entanto, os linfócitos B por vezes dependem de uma interação com o linfócito T CD4 para produzir anticorpos específicos a antígenos peptídicos, por isso,

denominados “antígenos T dependentes”. Já os denominados “antígenos T independentes” são os antígenos usualmente não protéicos, com epítomos repetitivos que não necessitam da cooperação dos linfócitos T (PARKIN e COHEN, 2001; ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008).

Os mecanismos de atuação dos anticorpos são variados e desempenham funções efetoras importantes contra os patógenos como a neutralização, opsonização seguido de fagocitose, ativação da via clássica do sistema complemento e participação no processo da ADCC (citotoxicidade celular dependente de anticorpo) (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008; MURPHY; TRAVERS; WALPORT, 2010).

Os linfócitos T só reconhecem antígenos processados que são apresentados por moléculas de MHC na superfície de uma célula apresentadora de antígeno. No seu processo de maturação celular há a expressão de um receptor de células T (TCR) funcional e de co-receptores CD4 e/ou CD8. A interação com moléculas MHC de classe I ou II é que determina a diferenciação em LT CD8+ ou CD4+, respectivamente. Juntamente à expressão do TCR na membrana dos linfócitos T vem associado o complexo CD3, já citado anteriormente, composto por cinco diferentes proteínas da família das imunoglobulinas. O reconhecimento do complexo peptídeo-molécula de MHC é uma função do TCR, e a sinalização celular subsequente, do CD3 (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008).

Há três classes principais de linfócitos T: citotóxicos, auxiliares (Th) e os reguladores.

Os linfócitos T citotóxicos apresentam um receptor TCR  $\alpha\beta$  e a molécula correceptora CD8. Essas células são responsáveis por reconhecer antígenos intracitoplasmáticos apresentados por moléculas MHC de classe I. Os LT CD8 exercem atividade citotóxica matando células infectadas, pois induzem a via de morte celular programada, apoptose, na célula alvo. Portanto, os linfócitos T citotóxicos participam principalmente das respostas antivirais e antitumorais (PARKIN e COHEN, 2001).

Os linfócitos T auxiliares apresentam um receptor TCR  $\alpha\beta$  e a molécula correceptora CD4. Estas células desempenham o papel de coordenar outras células do sistema imune na erradicação de patógenos. Sendo assim capazes de ativar linfócitos B, macrófagos e linfócitos T citotóxicos por meio da secreção de uma variedade de citocinas e da apresentação de uma variedade de proteínas coestimuladoras em sua superfície (PARKIN e COHEN, 2001).

Os linfócitos CD4 auxiliares são subdivididos funcionalmente pelo padrão de citocinas que produzem. Em decorrência do estímulo fornecido por uma APC e na dependência do ambiente de citocinas presentes, um linfócito precursor Th0 pode se tornar um linfócito Th1,

Th2 ou Th17. Assim estas células apresentarão diferentes padrões de citocinas secretadas e, portanto, desempenharão distintas respostas efetoras (PARKIN e COHEN, 2001).

A resposta Th1 tem papel importante no controle de patógenos intracelulares. Os LTh1 produzem grandes quantidades de IL-2 que induz proliferação de linfócitos e possui também um papel relevante na ativação de linfócitos T CD8. Há também a produção de INF- $\gamma$  que é uma citocina muito importante na ativação de macrófagos a fim de promover a fagocitose de patógenos intracelulares como protozoários, micobactérias e fungos (PARKIN e COHEN, 2001).

Já as respostas Th2, estão associadas com doenças alérgicas e infecções causadas por helmintos. Os LTh2 produzem IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10, favorecendo a proliferação e diferenciação de células B, produção de anticorpos, ativação de eosinófilos (PARKIN e COHEN, 2001; BRADLEY, 2003).

A subpopulação de linfócitos Th17 parece estar envolvida na proteção contra infecções causadas por patógenos extracelulares devido à sua capacidade de secretar citocinas efetoras pró-inflamatórias, como IL-21, IL-22 e IL-26, bem como menores quantidades de IL-6 e TNF- $\alpha$ . Os LTh17 também produzem citocinas da família IL-17 que são potentes indutoras da inflamação, induzindo à infiltração celular e produção de outras citocinas pró-inflamatórias. A produção desregulada de IL-17 tem sido associada a várias condições autoimunes (CHEN et al., 2007; MESQUITA JR et al., 2009).

As diferentes populações de LT reguladores (Treg) estão envolvidas na manutenção da autotolerância imunológica e no controle das respostas autoimunes. Por meio de uma complexa rede de mecanismos reguladores asseguram a modulação das respostas imunológicas frente aos diversos antígenos provenientes de agentes infecciosos, alérgenos, tumores, aloantígenos, e autoantígenos (CRUVINEL et al., 2008).

Há também as células T *natural killer* (NKT) que parecem surgir do mesmo precursor que origina linfócitos T convencionais, portanto essas células são uma classe de células T que regula a resposta imune inata e adaptativa. As células NKT são estimuladas por glicolipídios apresentados via MHC classe I não clássico, que está presente em células B, células dendríticas, macrófagos e tímócitos imaturos (GODFREY et al., 2000; KRONENBERG e GAPIN, 2002). Após sofrerem interações de alta avidéz com glicolipídeos associados a moléculas CD1d expressas por células epiteliais ou medulares do tecido tímico, as NKT são selecionadas positivamente (HU; GIMFERRER; ALBEROLA-ILA, 2011).

Dentre as funções efetoras desempenhadas pelas células NKT estão a secreção de citocinas como IFN- $\gamma$ , IL-4 e IL-13 e atividade citolítica (GODFREY et al., 2000; DIELI et

al., 2003). Estas células apresentam fenótipo de célula T ativada e têm a capacidade de resposta rápida a diferentes estímulos. Por exemplo, durante infecções as NKT secretam citocinas pró-inflamatórias estimulando assim a resposta inata e adaptativa a fim de eliminar o patógeno (KAWAKAMI et al., 2003) Porém, as células NKT também podem desempenhar função anti-inflamatória com secreção de citocinas para limitar certas respostas patogênicas (DIELI et al., 2003).

### **2.3.1. O papel dos linfócitos na fisiopatogenia do Diabetes *mellitus* tipo 1**

Evidências apontam que os linfócitos têm participação na fisiopatogenia dos dois tipos de diabetes estudados neste trabalho, porém com perfis de atuação diferentes. Estas células são extremamente sensíveis com seus receptores de superfície e podem ser consideradas verdadeiros “patrulheiros”. Pois, viajam por todo o organismo verificando todas as ocorrências como inflamações, injúrias e traumas físicos.

A maioria das doenças autoimunes está atrelada a um desequilíbrio entre as células autorreativas T efectoras e as células T reguladoras, portanto um ponto crítico na gênese da autoimunidade é a perda de tolerância central e/ou periférica (APOSTOLOU et al., 2002; HOGQUIST; BALDWIN; JAMESON, 2005; GOMEZ-TOURINO et al., 2016).

Diferentes subpopulações de linfócitos e células apresentadoras de antígenos estão envolvidas no processo de doenças autoimunes, como o DM1. Dentre as células que desempenham um importante papel neste processo estão os linfócitos CD4 e CD8, linfócitos B, células NK, macrófagos e células dendríticas. Estas células atuam sinergicamente no processo de destruição das células beta pancreáticas (SZABLEWSKI, 2014).

Os linfócitos T têm um papel importante na patogênese do diabetes *mellitus* tipo 1. Os autoanticorpos têm sido utilizados na prática clínica como marcadores robustos da progressão da doença. Em contrapartida, o rastreamento de células T autorreativas que medeiam a destruição das células beta pancreáticas está em fase inicial de estudos (JACOBSEN et al., 2017). Há evidências que os linfócitos T CD8 com potencial autorreativo são reduzidos, mas não eliminados durante a educação tímica, acontecendo o mesmo com o repertório de linfócitos T CD4 autorreativos (ESTORNINHO et al., 2013; YU et al., 2015; GOMEZ-TOURINO et al., 2016).

As células apresentadoras de antígenos (APCs) residentes no pâncreas desempenham um papel fundamental na homeostase deste tecido, sendo importantes para a manutenção da função normal das ilhotas, bem como ajudando na remodelação de processos de lesão e

inflamação (CALDERON; UNANUE, 2012; BOLDISON; WONG, 2016). Estas células ficam em íntimo contato com as células beta e com as paredes dos vasos lançando pequenas projeções no lúmen dos mesmos (VOMUND et al., 2015).

As APCs também participam de eventos iniciais no processo de auto-imunidade que ocorre no DM1. Pois atuam na apresentação de autoantígenos, como, por exemplo, antígenos de ilhotas e expressam complexos peptídeos-MHC classe II derivados de proteínas de células beta (CALDERON et al., 2008), sendo bastante eficientes em apresentar esses complexos peptídeos aos linfócitos T CD4 (CALDERON et al., 2008; VOMUND et al., 2015). Isso só é possível por meio da interação que ocorre entre as células beta pancreáticas que transferem grânulos de secreção para as APCs residentes de ilhotas permitindo o reconhecimento de antígenos de células beta por T CD4 autoreativas (VOMUND et al., 2015).

A quebra da tolerância e o processo de iniciação das vias mediadas por linfócitos T não está restrita a um único antígeno. Existem vários estudos que demonstram auto-reatividade contra vários autoantígenos já associados ao diabetes tipo 1. A saber, podem ser citados, a descarboxilase do ácido glutâmico (GAD 65), proteína relacionada à subunidade catalítica da 6-fosfatase de glicose específica das ilhotas (IGRP), transportador de zinco 8 (ZnT8) e tirosina fosfatase (IA-2) (MALLONE; BREZAR; BOITARD, 2011; KNIGHT et al., 2015).

Os linfócitos T CD4 ativados, por meio da secreção de várias citocinas promovem a proliferação e diferenciação de linfócitos T, B e macrófagos. As citocinas pró-inflamatórias liberadas pelas APCs e linfócitos, como TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e IL-1 $\beta$  contribuem para o desencadeamento e a persistência da resposta inflamatória e autoimune no DM1 (MATARESE et al., 2002).

Recentemente os achados de Coppieters e colaboradores (2012) mostraram a presença de linfócitos T CD8 em tecidos de ilhotas humanas de pacientes recém diagnosticados com DM1, bem como nos de maior tempo de diagnóstico. Esse tipo celular é predominante nos infiltrados leucocitários que ocorrem nas ilhotas, insulite, ocorrendo também hiperexpressão do MHC de classe I (COPPIETERS et al., 2012). Os LT CD8 após adquirirem um fenótipo de memória efetora passam a exibir um aumento da expressão de IFN $\gamma$ , perforinas e granzimas. Participando assim da destruição das células beta, e promovendo também a indução de apoptose (BOLDISON; WONG, 2016).

Os linfócitos B desempenham um papel importante na patogênese do DM1, que inclui a apresentação do antígeno específico da insulina para os linfócitos T CD4 e a produção de citocinas pró-inflamatórias, ambos os processos contribuem para a destruição das células

beta das ilhotas (BOLDISON; WONG, 2016). Os linfócitos B também atuam como plasmócitos secretores de autoanticorpos. Estes podem estar presentes no soro de indivíduos portadores de diabetes recém-diagnosticados e de indivíduos que posteriormente irão desenvolver o DM1, vários anos antes das manifestações clínicas da doença (BARKER et al., 2004).

### **2.3.2. O papel dos linfócitos na fisiopatogenia do Diabetes *mellitus* tipo 2**

O desenvolvimento do diabetes *mellitus* tipo 2 está relacionado com uma série de fatores genéticos e ambientais. Essa forma de manifestação do diabetes resulta de efeitos duplos de ação defeituosa e diminuição da secreção da insulina (McCARTHY; MENZEL, 2001). A resistência à insulina, como mencionado anteriormente, atualmente tem sido abordada como um prelúdio ao diabetes *mellitus* tipo 2 (RAZ et al., 2013).

Há que se considerar que a inflamação desempenha um papel crucial no desenvolvimento das doenças metabólicas. Assim, a inflamação de baixo grau pode ser considerada a principal força motriz no DM2 e nas complicações associadas (HOTAMISLIGIL, 2006; HARFORD et al., 2011; XIA; RAO; ZHONG, 2017). Em particular, a inflamação altera a função do tecido adiposo, uma das conseqüências dessa alteração é o desenvolvimento da resistência sistêmica à insulina (XU, et al., 2003).

A participação das células que fazem parte do sistema imunológico nos processos de inflamação e de resistência à insulina não se restringe aos macrófagos que secretam citocinas pró-inflamatórias que prejudicam a via de sinalização da insulina. Os linfócitos B e T também são contribuintes importantes no processo inflamatório e na resistência à insulina nos tecidos metabolicamente ativos e, em particular no tecido adiposo (WINER et al., 2011; SIMAR et al., 2014).

Cada vez mais, estudos estão apontando a participação crítica das células T na patogênese do diabetes tipo 2 (XIA; RAO; ZHONG, 2017). Nishimura e colaboradores (2009) forneceram evidências significativas de que as células T desempenham um papel importante na inflamação do tecido adiposo. Descobriram que, com a obesidade, há um aumento dos linfócitos T CD8 no tecido adiposo e estas células precedem a infiltração de macrófagos. Eles mostraram também com a depleção imunológica e genética de CD8 a diminuição do acúmulo de macrófagos e a melhora da inflamação preestabelecida no tecido adiposo.

Foi demonstrado por Deng e colaboradores (2013) que a obesidade induz à expressão de classe MHC II nos adipócitos e, assim, ocorre a ativação das células T CD4 que contribuem para o início da inflamação no tecido adiposo.

De acordo com Harford e colaboradores (2011) há um aumento significativo de linfócitos T CD4 (Th1) e CD8 no tecido adiposo em resposta a uma dieta hiperlipídica, e em contrapartida, uma diminuição das células com perfil anti-inflamatório (Th2 e Treg).

Os resultados de Jagannathan-Bogdan e colaboradores (2011) indicam que os linfócitos T em pacientes com DM2 são naturalmente distorcidos para subconjuntos pró-inflamatórios que provavelmente promovem inflamação crônica no DM2 através da produção elevada de citocinas. Pois, observaram no sangue periférico de pacientes portadores de diabetes *mellitus* tipo 2 um aumento de linfócitos Th17 circulantes, enquanto que a quantidade de linfócitos CD4 Treg diminuiu nesses pacientes.

Os linfócitos B contribuem para a resistência à insulina através da modulação de células T e produção de anticorpos IgG de perfil patogênico (WINER et al., 2011). Ainda de acordo com Zimering e Pan (2009) quase um terço dos pacientes com DM2 avançada possui autoanticorpos que inibem a função das células endoteliais, induzindo a formação de fibras de stress e até mesmo apoptose dependente de caspase nestas células. Esse fenômeno contribui para complicações vasculares que portadores de diabetes costumam apresentar.

## **2.4. Memória metabólica**

Medicação, modificação da dieta e atividade física podem ser adotados para controle do DM1 e DM2, porém indivíduos portadores de diabetes muitas vezes continuam sofrendo com as complicações da doença (VILLENEUVE; REDDY; NATARAJAN, 2011). Mesmo após a manutenção do controle glicêmico estas complicações podem permanecer, esse fenômeno sugere uma “memória metabólica”. Portanto, a exposição prévia a altos níveis de glicose pode estar vinculada a alterações na estrutura da cromatina, com mudanças de longa duração para níveis de expressão de genes associados às complicações micro e macrovasculares do DM (EL-OSTA et al., 2008, MIAO et al., 2014; BEREZIN, 2016).

Ensaio clínico e com modelos experimentais em animais têm demonstrado que as complicações do portador de diabetes podem persistir apesar do controle da glicemia, indicando uma memória do estado glicêmico prévio (EL-OSTA et al., 2008; VILLENEUVE et al., 2008)

A hiperglicemia e o estresse oxidativo estão diretamente relacionados e podem também aumentar o acúmulo de produtos finais de glicação avançada que potencializam a inflamação local e o estresse oxidativo por meio da glicação irreversível de proteínas e lipídeos, promovendo danos vasculares em longo prazo, assim esses processos desempenham um papel fundamental nas complicações relacionadas ao diabetes (CERIELLO; IHNAT; THORPE, 2009).

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Objetivo Geral**

O objetivo geral deste trabalho consistiu em identificar se há diferenças na organização da cromatina de linfócitos do sangue periférico de indivíduos portadores de diabetes tipo 1 e 2 quando comparados a indivíduos não portadores.

#### **3.2. Objetivos Específicos**

- Avaliar, se ambos, diabetes tipo 1 e 2 induzem alterações nucleares e cromatínicas em linfócitos de sangue periférico;
- Analisar se as possíveis alterações causadas pelo diabetes são comuns aos dois tipos da doença;
- Verificar se há correlação entre os níveis de glicemia de jejum e hemoglobina glicada e as possíveis alterações nucleares e cromatínicas.

## **4. MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1. Aspectos Éticos e Legais**

Este estudo faz parte do projeto intitulado: “Pesquisa de alterações na organização da cromatina de células mononucleares do sangue periférico de pacientes diabéticos”, aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisas com Seres Humanos da Universidade Federal de Uberlândia (CEP/UFU), CAAE: 47655615.6.0000.5152, Número do Parecer: 1.227.701 (ANEXO A).

Trata-se de um estudo transversal que foi desenvolvido no Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal de Uberlândia (ICBIM) e no Hospital de Clínicas de Uberlândia (HC-UFU).

As informações foram coletadas por meio de artigos científicos, livros, e dados do Sistema de Informação Hospitalar (SIH) do HC-UFU. Mediante a aplicação do Instrumento de coleta de dados ANEXO B, foram obtidas informações sobre os participantes da pesquisa, as quais foram correlacionadas com os resultados obtidos após análise das amostras, estas informações não foram usadas como critério de inclusão ou exclusão.

### **4.2. Participantes da Pesquisa**

Foram incluídos neste estudo homens e mulheres, sem distinção de grupo étnico ou grupos sociais, residentes na cidade de Uberlândia ou região. Os participantes portadores de DM foram divididos em dois grupos: Grupo 1 - DM tipo 1; Grupo 2 - DM tipo 2. No momento em que este estudo foi realizado os participantes faziam acompanhamento no ambulatório de Endocrinologia do HC-UFU.

Para participar do Grupo Controle foram recrutados indivíduos saudáveis, que trabalham ou estagiam no Laboratório de Análises Clínicas do HC-UFU e no Hospital de Clínicas UFU, utilizando os critérios de inclusão idade e sexo correspondentes aos participantes dos Grupos 1 e 2, sendo um controle para cada caso.

Todos os participantes convidados foram previamente informados sobre o objetivo do trabalho e os procedimentos envolvidos, também foram informados sobre os riscos mínimos no momento da coleta de sangue que consistiam em incômodo, ou hematoma no local da punção e tiveram como benefício a dosagem da glicemia atual e estimada há três meses, o que é muito importante para a qualidade de vida.

A privacidade do participante foi respeitada em todos os momentos da pesquisa, e sua participação foi consentida após a leitura e assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (ANEXO C), e depois de responder o Instrumento de coleta de dados (ANEXO B).

O presente estudo investigou alterações nos núcleos das células, portanto, ponderou-se para o experimento: 5 participantes do Grupo 1, 5 participantes do Grupo 2 e o Grupo Controle composto em proporção de um para cada caso. Casos *versus* controles foram pareados por sexo e idade, pois em termos cromatínicos e epigenéticos esses dois fatores podem introduzir outra variável, a qual se pretendia evitar nesta pesquisa.

### **4.3. Critérios de Inclusão e Exclusão**

Os critérios de inclusão foram: pacientes com idade entre 18 e 55 anos, sexo masculino ou feminino que foram diagnosticados com Diabetes tipo 1 ou tipo 2 e que fazem acompanhamento no HC-UFU.

Os critérios de exclusão para todos os Grupos foram: a) portadores de doenças autoimunes; b) portadores de neoplasias e c) portadores de doenças debilitantes.

### **4.4. Amostras**

Os participantes da pesquisa ficaram 8 horas em jejum antecedente ao horário da coleta que para todos foi o mesmo, pela manhã. De cada um foram coletados 25 mL de sangue periférico, dos quais 3 mL em tubo com gel separador sem anticoagulante para dosagem da glicemia de jejum, 2 mL em tubo com anticoagulante ácido etilenodiaminotetracético dipotássico (EDTA K<sub>2</sub>) para dosagem da hemoglobina glicada, e 20 mL em tubos com anticoagulante heparina de sódio para isolamento das células mononucleares a fim de proceder às análises citoquímicas.

### **4.5. Técnicas Empregadas**

#### **4.5.1. Dosagem glicemia de jejum**

Os tubos com gel separador sem anticoagulante, contendo as amostras, foram encaminhados ao setor de Bioquímica do Laboratório de Análises Clínicas do HC-UFU logo

após a coleta. Depois da completa formação do coágulo, os tubos foram centrifugados utilizando a centrífuga Celm Combate 3500 rpm (2200 X g) durante 15 minutos. Depois deste processo foi realizada a dosagem da glicose no soro, por método enzimático de referência com Hexoquinase no sistema de automação *Cobas c501* com kit comercializado pela fabricante *Roche Diagnóstica*.

#### **4.5.2. Dosagem hemoglobina glicada (HbA1c)**

Os tubos com anticoagulante EDTA K<sub>2</sub>, contendo as amostras, foram encaminhados ao setor de Bioquímica do Laboratório de Análises Clínicas do HC-UFU logo após a coleta, e em seguida foi realizada a dosagem da hemoglobina glicada pelo método de Cromatografia Líquida de Alta Performance (HPLC) no sistema de automação *Bio-Rad D-10™ Hemoglobin Testing System* com kit comercializado pela fabricante *Biorad Laboratories*.

#### **4.5.3. Isolamento das células mononucleares (PBMCs)**

A obtenção de PBMCs foi padronizada no laboratório, seguindo o protocolo descrito por Kanof, Smith, Zola (2001), o qual foi realizado, conforme descrito a seguir, para as amostras de cada participante separadamente.

Logo após a coleta, o volume total do sangue fresco heparinizado (20mL) foi colocado em um tubo cônico tipo Falcon de 50 mL e adicionado igual volume de tampão fosfato salino (PBS) 1X (20mL), (1:1 sangue/PBS), ambos em temperatura ambiente. Depois, foram homogeneizados por inversão e a mistura foi reservada. Em 4 tubos cônicos tipo Falcon de 15 mL foram pipetados 3,0 mL de Ficoll-Paque PLUS em cada um. Em seguida, 10 mL da mistura (sangue/PBS) foram adicionados lentamente sobre o Ficoll com o auxílio de uma seringa para que a interface Ficoll/mistura fosse preservada. Esse procedimento foi repetido nos 4 tubos, os quais foram tampados e centrifugados na Eppendorf 5403R com rotor de balanço livre, por 30 minutos a 2340 rpm (900 X g), em temperatura controlada entre 18 a 20 °C, sem frenagem.

Após a centrifugação, o plasma e PBS (parte superior) foram retirados com o auxílio de uma pipeta graduada. Em seguida, utilizando uma pipeta Pasteur foi retirada cuidadosamente a camada de PBMCs que se apresentava sobre o Ficoll. As PBMCs foram transferidas para 2 tubos cônicos tipo Falcon de 15 mL. Foi adicionado PBS (3x o volume da camada de células) em cada tubo a fim de realizar a lavagem. Centrifugou-se durante 10

minutos a 1560 rpm (400 X g). O sobrenadante foi aspirado e descartado e foi repetida a lavagem 1 vez, sendo novamente aspirado e descartado o sobrenadante. O sedimento resultante da centrifugação (precipitado de PBMCs) foi novamente ressuspensionado para 2 mL de PBS, homogeneizado e separado em duas alíquotas de 1 mL cada. Depois da confecção das lâminas, conforme descrito no tópico 4.5.4, foi adicionado DMSO (10%) nas alíquotas e logo após foram congeladas a -20 °C.

#### **4.5.4. Citoquímica**

Para análise de parâmetros morfométricos nucleares e avaliação da organização cromatínica, foram confeccionadas lâminas da suspensão das PBMCs isoladas (tópico 4.5.3) das amostras biológicas de cada participante individualmente. Procedeu-se à citrocentrifugação utilizando a centrífuga citológica Fanem modelo 248. A montagem da lâmina no equipamento seguiu a ordem: lâmina previamente identificada (externamente) + papel filtro + acrílico (voltado para o centro do rotor). Depois foram pipetados 250 µL da suspensão de PBMCs/PBS em dois cito funis opostos do equipamento, centrifugando por 5 minutos a 1200 rpm (129 X g) em temperatura ambiente.

Após esse processo as lâminas foram deixadas a temperatura ambiente durante 15 minutos para secar. As quais foram posteriormente submetidas à fixação em etanol absoluto-ácido acético glacial 3:1 (v/v) durante 1 minuto, seguida de lavagem em etanol 70% por 5 minutos e secagem ao ar.

Depois de fixadas, todas as lâminas foram submetidas ao mesmo tempo, à reação de Feulgen (SCHULTE; WITTEKIND, 1989) para evidenciação de DNA. Inicialmente, foram hidrolisadas em (HCl 4 M) à temperatura de 24-25 °C, durante 55 minutos. Em seguida foram lavadas rapidamente em solução ácida (HCl 0,1 M) gelada, coradas em reativo de Schiff que foi pingado sobre as lâminas, onde permaneceu sobre as mesmas em câmara úmida e escura por no mínimo 45 minutos. Posteriormente as lâminas passaram por três banhos de 5 minutos cada vez, em água sulfurosa (1 parte de HCl 1M, 1 parte de metabissulfito de sódio 10%, e 18 partes de água). E depois, lavadas com água, secas ao ar e montadas em bálsamo do Canadá. As lâminas foram mantidas protegidas da luz para evitar oxidação da coloração.

#### **4.6. Análise de imagem**

Após a Reação de Feulgen, as imagens dos núcleos corados foram obtidas em um microscópio Leica DM500 equipado com objetiva planocromática 100/1,25, condensadora

pré-focalizada e pré-centralizada, iluminação LED (3 W, temperatura de 6000 K). A intensidade da iluminação foi mantida sempre ao máximo e o diafragma da condensadora na posição 100x. As imagens foram capturadas por uma câmera digital Leica ICC50 HD acoplada ao microscópio e *software* de captura Leica LAS EZ (versão 1.8.1, Leica Microsystems Limited – Suíça). Para todos os núcleos analisados as condições de iluminação e configurações de captura foram mantidas constantes: tempo de exposição 8,0 ms, ganho 1,6x, gamma 2,00 e saturação 60,00. Sob as condições ópticas utilizadas, 1  $\mu\text{m}$  corresponde a 15,6 pixels.

O *software* “open source” ImageJ foi utilizado para a análise das imagens capturadas. Por meio da ferramenta “Optical Density Calibration” do ImageJ foi realizada a conversão dos níveis de cinza em absorbância utilizando a barra de escala calibrada No. 3 da Kodak, conforme as instruções obtidas no *website* do *software* (<http://rsbweb.nih.gov/ij/docs/examples/calibration/index.html>).

Para a análise de imagem, no presente trabalho, foram avaliados somente os núcleos dos linfócitos. Foram selecionados aproximadamente 160 núcleos de linfócitos de cada participante da pesquisa. Sendo cerca de 800 núcleos avaliados para cada um dos grupos. A seleção dos núcleos a partir das imagens capturadas foi realizada de forma aleatória, e foi automatizada no *software* após uma análise prévia de dados como absorbância de fundo (background) e eliminação por *threshold*, que é capaz de separar os núcleos do fundo da imagem com base em um limiar de intensidade de níveis de cinza.

Foram obtidas informações relativas à área nuclear ( $\mu\text{m}^2$ ), média dos níveis de cinza por núcleo, convertida em densidade óptica (OD) que é igual à absorbância, e densidade óptica integrada (IOD) que representa o conteúdo Feulgen-DNA, pois é o produto da integração da OD pela área nuclear. Também foram avaliados o contraste e a entropia que são parâmetros de textura nuclear baseados em matrizes de correlação de escala de cinza (GLCM) (HARALICK et al, 1973; PANTIC, I. et al. 2012). O contraste mostra a variação local de escala de cinza presente na imagem (núcleo), por isso representa a variação no estado médio da compactação da cromatina por núcleo. Portanto, quanto maior for a variação de compactação entre diferentes áreas nucleares, maior o contraste. Quando um valor de contraste maior é observado nota-se maior diferença entre áreas de maior compactação e áreas de menor compactação da cromatina. Os valores de entropia representam a quantidade de informação em bits necessária para armazenar as informações de cada núcleo. A entropia quantifica o grau de desordem espacial dos diferentes níveis de cinza na GLCM, refletindo assim a heterogeneidade do núcleo. Os núcleos com maior quantidade de regiões mais e

menos compactas são os mais entrópicos, enquanto os que mostram uma morfologia mais homogênea são os com menor entropia.

#### **4.7. Análise estatística**

Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o software Minitab™ 14. A análise dos dados morfométricos e dos dados bioquímicos foi feita utilizando ANOVA simples para a análise intergrupos ou multifatorial com pós-teste de Tukey para a análise intragrupos. Para as correlações, foi sempre utilizada a Correlação de Pearson. Em todos os casos, as diferenças foram consideradas significativas para  $p < 0,05$ .

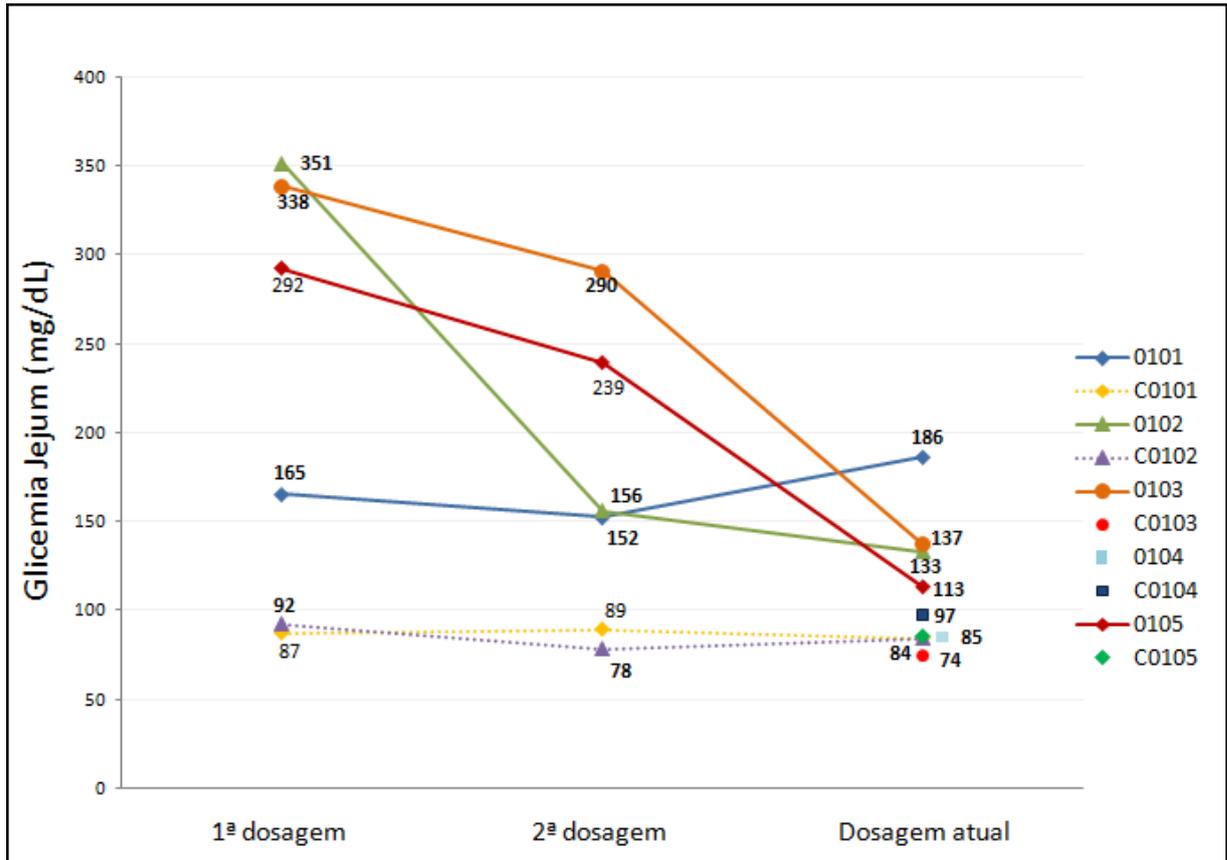
## 5. RESULTADOS

### 5.1. Análises comparativas do Grupo 1 *versus* Controle para parâmetros bioquímicos e citoquímicos

#### 5.1.1. Glicemia de jejum e hemoglobina glicada do Grupo 1 e de seus respectivos controles

Com o intuito de obter um antecedente das dosagens de glicemia de jejum e HbA1c dos participantes da pesquisa, além de coletar as amostras para realizar as dosagens destes testes e proceder as análises citoquímicas, foi realizada uma busca por dois resultados anteriores no Sistema de Informação Hospitalar HC-UFU. Os dados mostram que os resultados obtidos de todas as amostras que foram coletadas para este estudo não ultrapassaram 200 mg/dL para glicemia de jejum (Gráfico1), porém há participantes com resultados anteriores bastante alterados. Observa-se também que o resultado da HbA1c (Gráfico 2) reflete as glicemias anteriores, conforme observado nos resultados do participante 0105, que mesmo apresentando glicemia de jejum atual de 113mg/dL, obteve um resultado de 11,3% para HbA1c.

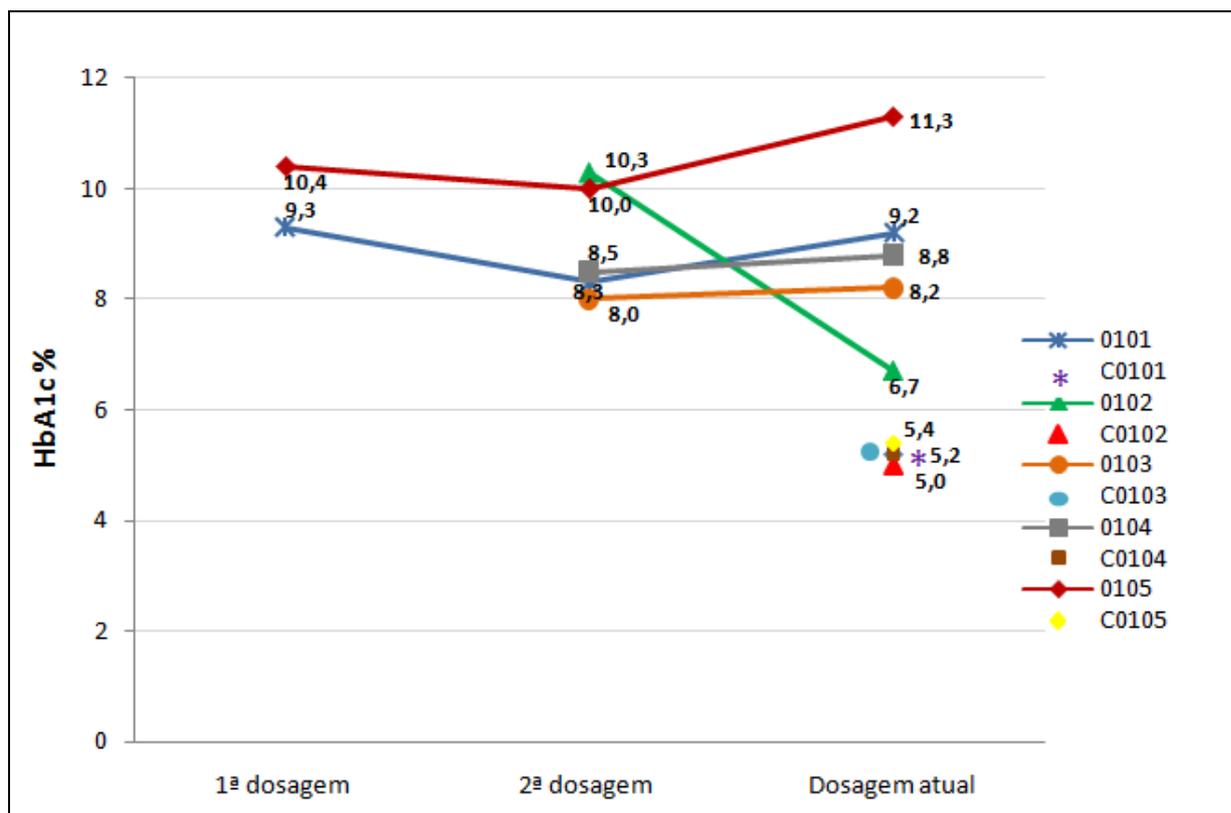
Os participantes do Grupo Controle (Gráficos 1 e 2) não apresentaram, conforme esperado, resultados alterados para os testes mencionados anteriormente. A maioria dos participantes incluídos neste grupo não possuía resultados anteriores registrados no Sistema de Informação Hospitalar HC-UFU, pois não realiza estes exames rotineiramente. Portanto, para estes indivíduos, além de não termos o diagnóstico clínico de diabetes, temos valores de hemoglobina glicada compatíveis com normoglicemia, pelo menos no que diz respeito aos três últimos meses. Assim, temos evidência convincente de que os pacientes do grupo controle realmente não são portadores de diabetes e não apresentam condição clínica de hiperglicemia intermediária.



**Gráfico 1. Dosagens da glicemia de jejum dos participantes do Grupo 1 e Controle**

Foram usados códigos numéricos para identificação de cada participante do Grupo 1 = 0101; 0102; 0103; 0104; 0105. Para cada respectivo controle foi usado um código alfa numérico (acrescido da letra “C”) = C0101; C0102; C0103; C0104; C0105. As dosagens atuais de glicemia dos indivíduos C0101; C0102 foram iguais a 84mg/dl; de 0104; C0105 foram iguais a 85mg/dl. Dados das dosagens diferem entre os participantes. Dosagem atual compreende a do dia em que foi coletada a amostra para o presente trabalho.

De acordo com as informações coletadas por meio do Instrumento de coleta de dados (Tabela1), nenhum paciente do Grupo 1, no momento do estudo, apresentava comorbidades (hipertensão arterial, obesidade, entre outros) ou complicações decorrentes do diabetes (retinopatia, nefropatia, pé diabético, doença aterosclerótica: coronariopatia ou infarto agudo do miocárdio prévio, acidente vascular encefálico, doença arterial periférica).



**Gráfico 2. Dosagens da HbA1c dos participantes do Grupo 1 e Controle.**

Foram usados códigos numéricos para identificação de cada participante do Grupo 1 = 0101; 0102; 0103; 0104; 0105. Para cada respectivo controle foi usado um código alfa numérico (acrescido da letra “C”) = C0101; C0102; C0103; C0104; C0105. As dosagens de HbA1c para os indivíduos C0101; C0103; C0104 foram iguais a 5,2%. Datas das dosagens diferem entre os participantes. Dosagem atual compreende a do dia em que foi coletada a amostra para o presente trabalho.

**Tabela 1. Dados clínicos dos participantes do Grupo 1**

Identificação – Sexo - Idade	Tempo de Diagnóstico	História Familiar de DM	Comorbidades	Complicações do Diabetes	Tratamento do DM1
0101 - F - 30a	11 anos	SIM	NÃO	NÃO	Insulina glargina
0102 - F - 31a	1 ano e 7 meses	SIM	NÃO	NÃO	Insulina NPH e Ultrarrápida
0103 - F - 18a	16 anos	SIM	NÃO	Nefropatia diabética durante 5 anos	Insulina glargina e Ultrarrápida
0104 - M - 31a	12 anos	SIM	NÃO	NÃO	Insulina NPH e Ultrarrápida
0105 - M - 18a	10 anos	SIM	NÃO	NÃO	Insulina NPH e insulina glulisina

F = sexo feminino; M = sexo masculino; a = idade em anos

Foram usados códigos numéricos para identificação de cada participante do Grupo 1 = 0101; 0102; 0103; 0104; 0105.

### 5.1.2. Perfil das análises citoquímicas para linfócitos do Grupo 1 e seus respectivos controles

Apesar da escolha do grupo controle que respeitasse as características de idade e sexo dos portadores de diabetes a análise intragrupo (portadores de diabetes e não portadores de diabetes) mostra que há variação individual em todos os parâmetros nucleares estudados, não havendo influência evidente do sexo ou da idade nos resultados obtidos.

Conforme os dados (Tabela 2) pode-se observar uma variação intragrupo dos parâmetros nucleares para linfócitos de indivíduos portadores de diabetes tipo 1. O mesmo acontece quando são analisados tais parâmetros para o Grupo Controle (Tabela 3).

**Tabela 2. Comparação intragrupo Linfócitos do Grupo 1 para parâmetros nucleares**

Participante	n	Área nuclear ( $\mu\text{m}^2$ )	OD	IOD	Contraste	Entropia
0101	145	45,8 $\pm$ 0,528 a	0,24 $\pm$ 0,002 a	10,9 $\pm$ 0,103 a	12,4 $\pm$ 0,207 a	6,87 $\pm$ 0,009 a
0102	180	44,2 $\pm$ 0,538 a	0,32 $\pm$ 0,003 b	14,0 $\pm$ 0,103 b	16,5 $\pm$ 0,349 b	7,23 $\pm$ 0,010 b
0103	172	41,7 $\pm$ 0,450 b	0,31 $\pm$ 0,003 c	12,7 $\pm$ 0,103 c	17,2 $\pm$ 0,516 b	7,18 $\pm$ 0,008 c
0104	166	57,9 $\pm$ 0,510 c	0,24 $\pm$ 0,002 a	14,1 $\pm$ 0,149 b	13,9 $\pm$ 0,212 c	6,96 $\pm$ 0,009 d
0105	169	52,2 $\pm$ 0,577 d	0,22 $\pm$ 0,002 d	11,5 $\pm$ 0,098 d	12,9 $\pm$ 0,219 ac	6,92 $\pm$ 0,011 e

n = número de células analisadas; OD = densidade óptica média; IOD = Conteúdo Feulgen-DNA; valores expressos em média  $\pm$  erro padrão da média; Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística para  $p < 0,05$ .

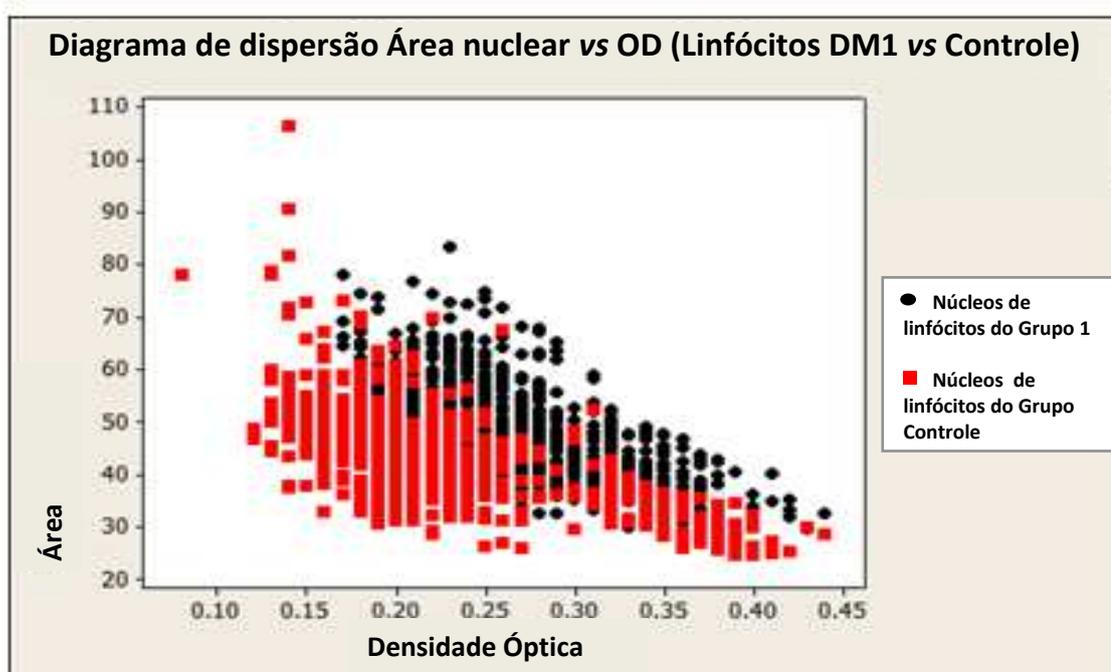
**Tabela 3. Comparação intragrupo Linfócitos Controle para parâmetros nucleares**

Participante	n	Área nuclear ( $\mu\text{m}^2$ )	OD	IOD	Contraste	Entropia
C0101	172	46,8 $\pm$ 0,749 a	0,21 $\pm$ 0,002 a	9,5 $\pm$ 0,092 a	11,4 $\pm$ 0,112 a	6,74 $\pm$ 0,010 a
C0102	167	47,8 $\pm$ 0,440 a	0,20 $\pm$ 0,002 b	9,3 $\pm$ 0,083 a	12,4 $\pm$ 0,190 b	6,33 $\pm$ 0,023 b
C0103	146	34,4 $\pm$ 0,590 b	0,34 $\pm$ 0,004 c	11,6 $\pm$ 0,097 b	21,1 $\pm$ 0,364 c	7,31 $\pm$ 0,013 c
C0104	149	50,9 $\pm$ 0,521 c	0,17 $\pm$ 0,002 d	8,6 $\pm$ 0,145 c	11,1 $\pm$ 0,126 a	6,31 $\pm$ 0,030 b
C0105	175	39,2 $\pm$ 0,465 d	0,20 $\pm$ 0,002ab	7,9 $\pm$ 0,091 d	12,4 $\pm$ 0,112 b	6,77 $\pm$ 0,013 a

n = número de células analisadas; OD = densidade óptica média; IOD = Conteúdo Feulgen-DNA; valores expressos em média  $\pm$  erro padrão da média; Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística para  $p < 0,05$ .

Agrupando-se todos os dados em duas populações, portadores de diabetes tipo 1, Grupo 1, e não portadores de diabetes, Grupo Controle foi possível constatar que em ambas as populações há uma correlação negativa entre as variáveis área e OD, sendo os núcleos maiores geralmente possuidores de cromatina menos compacta (menor OD), o que é esperado (Figura 1). Essa correlação, entretanto, apesar de estatisticamente significativa para ambos os grupos é razoavelmente fraca.

Interessantemente, os dados da Tabela 4 mostram que os núcleos de linfócitos do Grupo 1 possuem áreas significativamente maiores, aumento este acompanhado por aumento nas absorbâncias médias (OD), indicando que há núcleos de linfócitos de portadores de diabetes tipo 1 maiores (Figura 2-A) e mais compactos (Figura 2-B). A análise da Figura 1 também confirma essa observação, pois deixa claro que apesar dos linfócitos de portadores de diabetes também apresentarem uma correlação negativa entre áreas nucleares e densidades ópticas médias, os núcleos que possuem áreas nucleares similares entre as duas populações são em geral mais compactos (maior OD) nos portadores de diabetes, e núcleos de mesmos valores de OD nas duas populações, são visivelmente maiores nos portadores de diabetes, o que também pode ser visto na Figura 3.

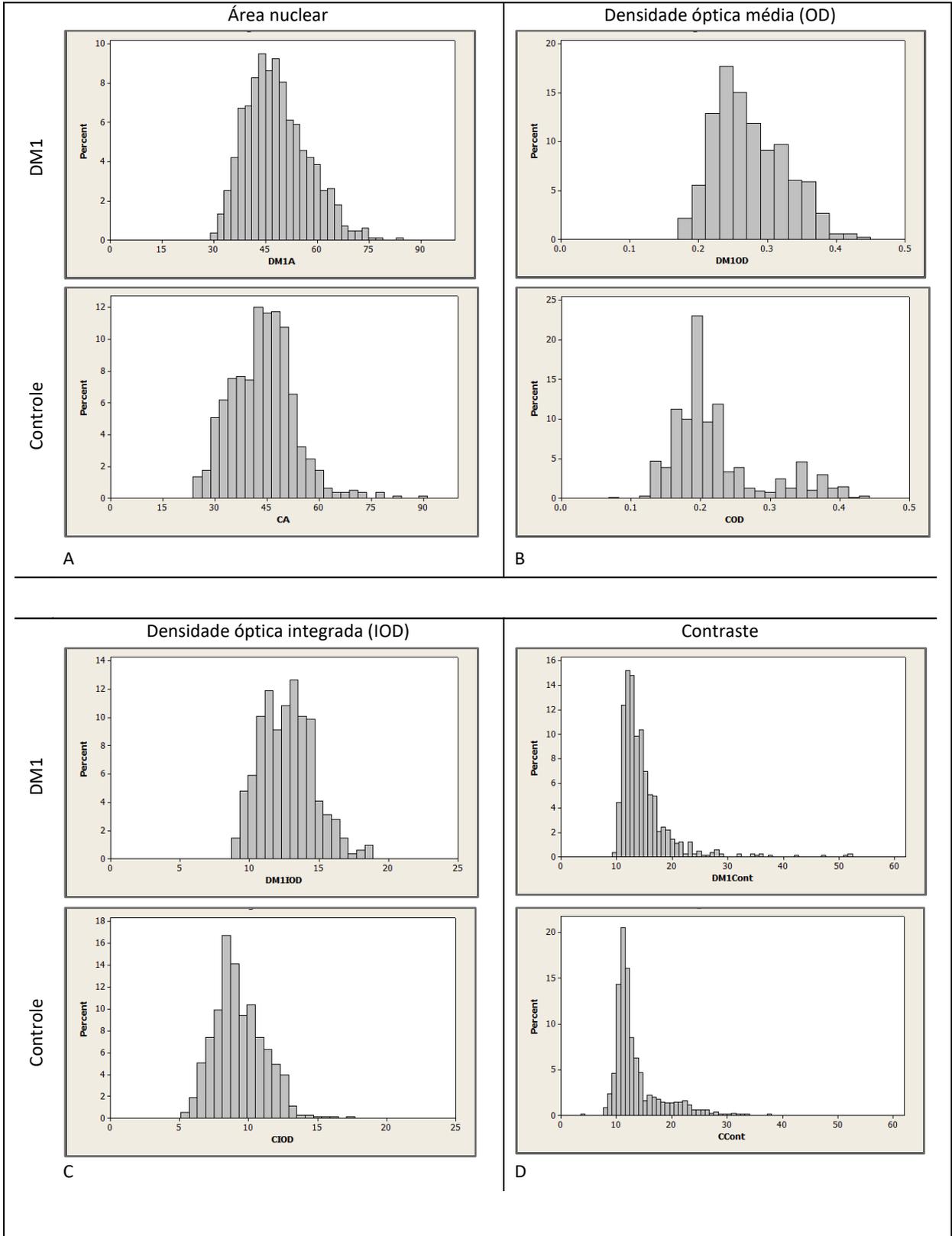


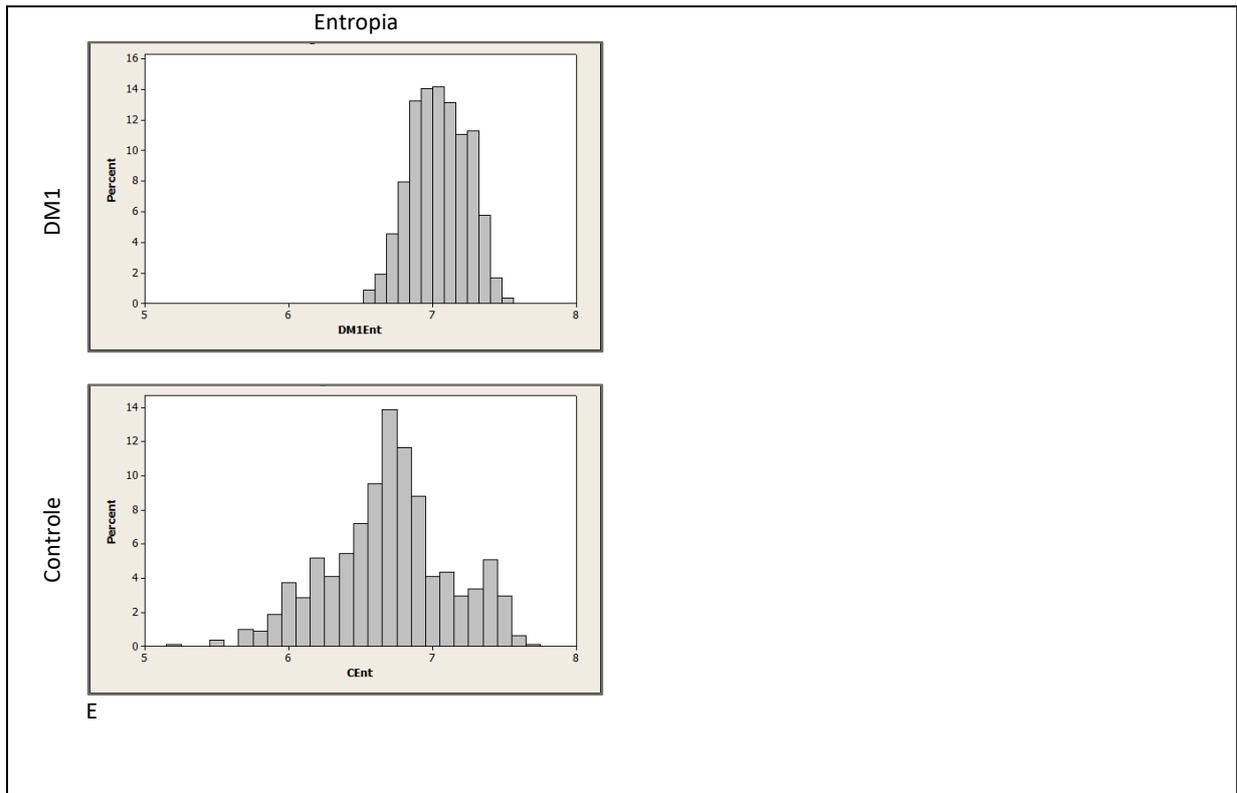
**Figura 1. Comparativo da área nuclear versus OD de núcleos de linfócitos do Grupo 1 versus Controle.** Núcleos de linfócitos de portadores de diabetes DM1 (Grupo 1) são em geral ou maiores ou mais compactos que os de indivíduos não portadores de diabetes (Grupo Controle)

**Tabela 4. Efeitos do DM1 em parâmetros nucleares de linfócitos humanos**

Grupo	n	Área nuclear ( $\mu\text{m}^2$ )	OD	IOD	Contraste	Entropia
DM1	832	$48,3 \pm 0,311$ a	$0,27 \pm 0,002$ a	$12,7 \pm 0,067$ a	$14,7 \pm 0,163$ a	$7,04 \pm 0,007$ a
Controle	809	$43,9 \pm 0,327$ b	$0,22 \pm 0,002$ b	$9,3 \pm 0,062$ b	$13,5 \pm 0,153$ b	$6,69 \pm 0,015$ b

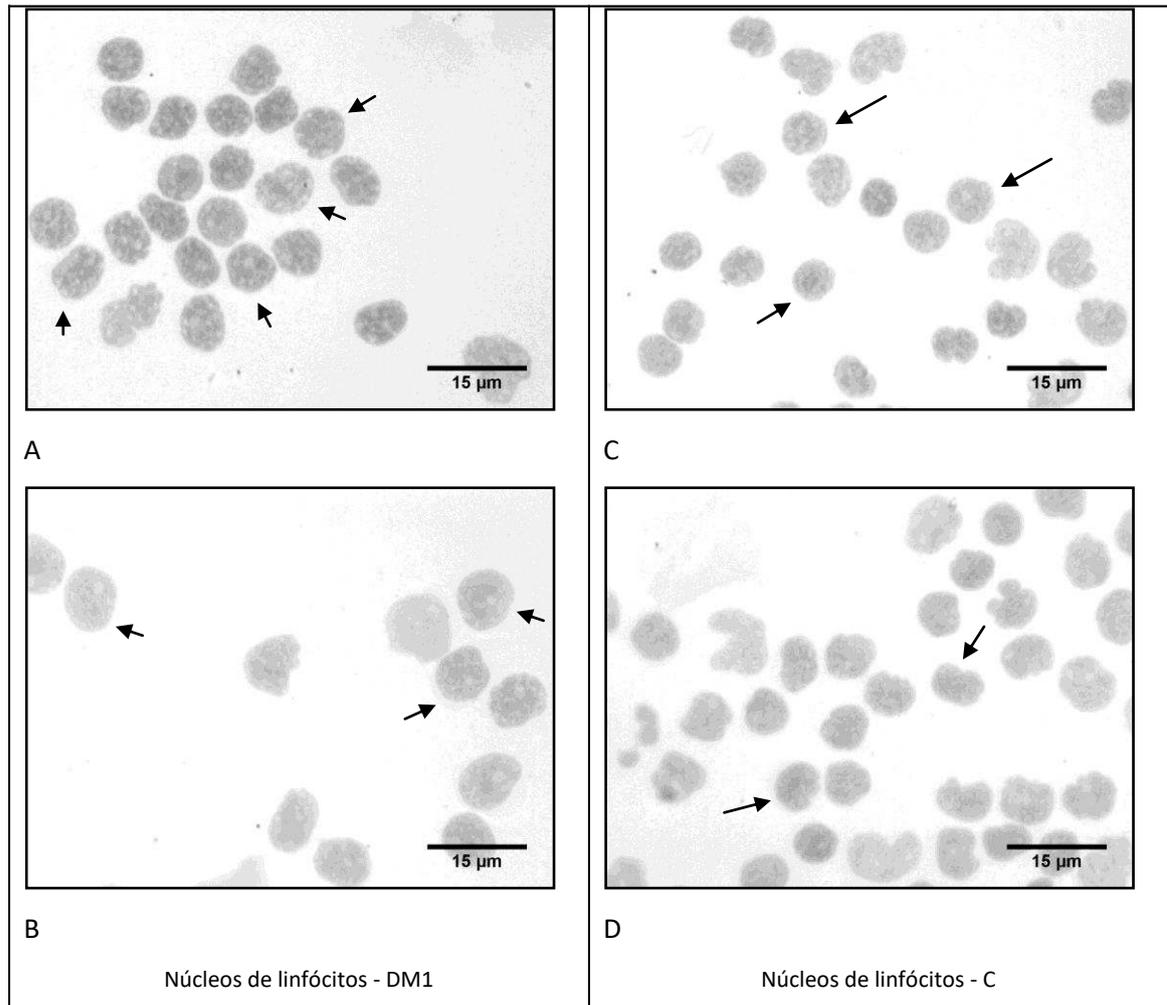
n – número de células analisadas; OD – densidade óptica média; IOD – Conteúdo Feulgen-DNA; valores expressos em média  $\pm$  erro padrão da média; Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística para  $p < 0,05$ .



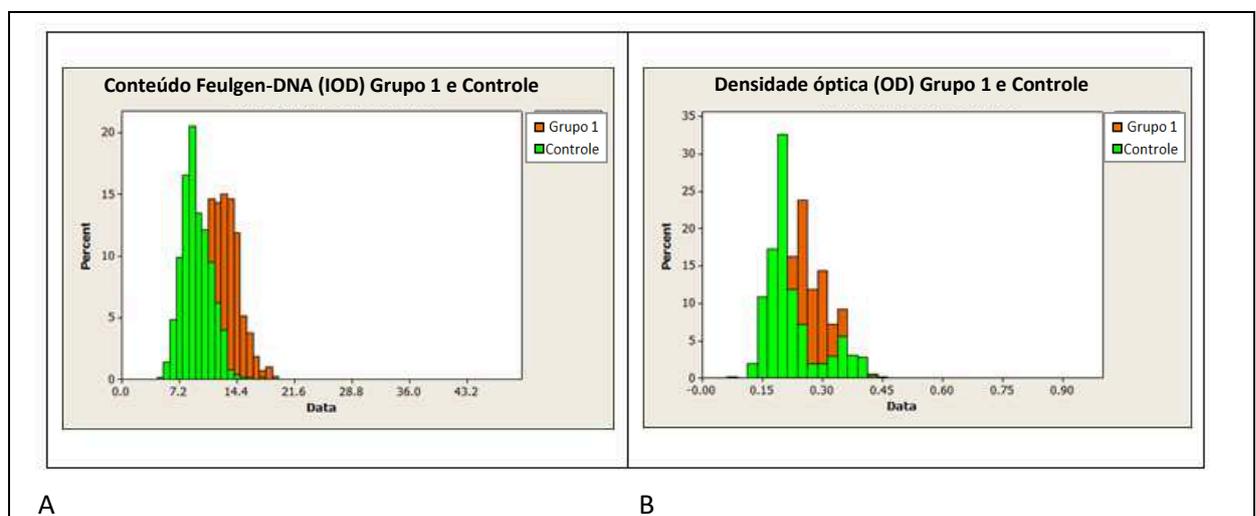


**Figura 2. Histogramas de parâmetros nucleares dos linfócitos analisados para Grupo 1 (DM1) e seus respectivos controles (Controle):** Área nuclear (A), Densidade óptica média (B), Densidade óptica integrada - Conteúdo Feulgen-DNA (C), Contraste (D) e Entropia (E).

Quando a distribuição das ODs é comparada entre os grupos, percebe-se que na realidade o aumento do valor médio desse parâmetro em portadores de diabetes deve-se à concentração de núcleos numa faixa intermediária de valores de OD com diminuição do número de linfócitos com cromatina menos compacta, como pode ser observado na Figura 2-B e na Figura 4-B, Apesar de, como esperado, haver uma correlação positiva estatisticamente significativa entre área nuclear e conteúdo Feulgen-DNA, essa correlação é fraca nos portadores de diabetes e extremamente fraca no grupo controle.

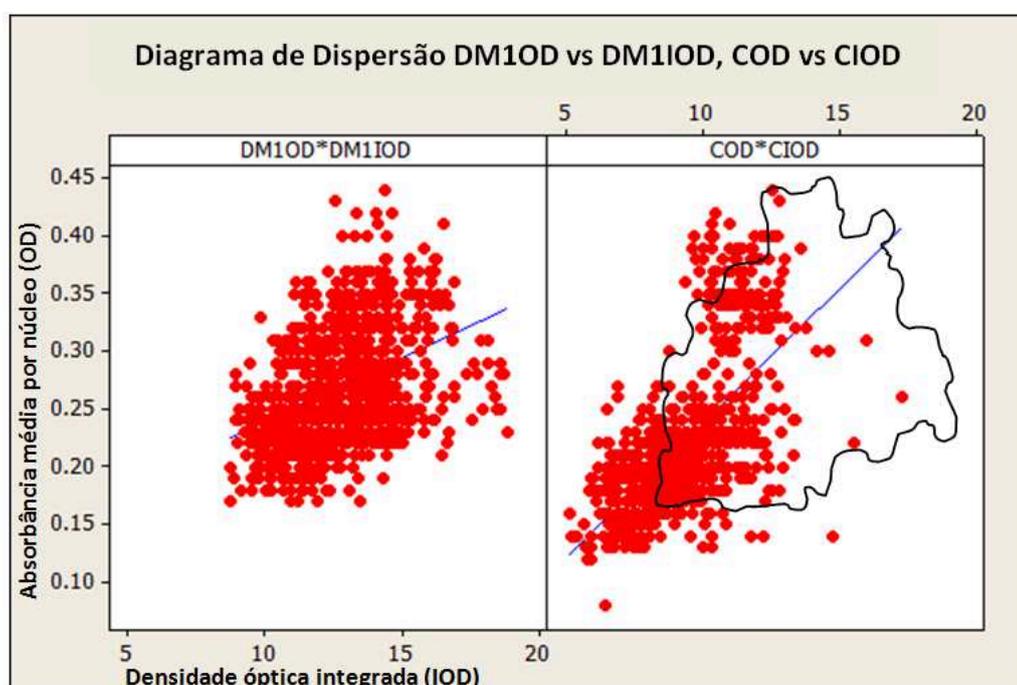


**Figura 3. Imagens de núcleos de linfócitos do Grupo 1 e Controle em escala de cinza.** Quando os núcleos destacados pelas setas são comparados observam-se em A e B um aumento discreto das áreas nucleares, porém sem diminuição proporcional da absorbância média (OD). Nota-se também uma cromatina mais heterogênea (núcleos mais entrópicos) quando comparados aos núcleos das imagens C e D. Núcleos de linfócitos-DM1 = Grupo 1. Núcleos de linfócitos-C = Grupo Controle.



**Figura 4. Histogramas comparativos do Conteúdo Feulgen-DNA (IOD) e das Densidades ópticas médias (OD).** Conteúdo Feulgen-DNA dos núcleos de linfócitos (A) e densidades ópticas médias OD (B) entre os núcleos de portadores de diabetes (colunas laranjas) e os de não portadores de diabetes (colunas verdes).

A análise do conteúdo Feulgen-DNA, que dá uma estimativa da quantidade de DNA presente nos núcleos, evidencia que o aumento de IOD, e, portanto, de conteúdo Feulgen-DNA nos portadores de diabetes tipo 1 não parece estar associado a eventos de proliferação celular ou poliploidização (Figura 2-C e Figura 4-A), mas possivelmente de aneuploidização. A alta correlação positiva desse parâmetro com os graus de compactação cromatínica (OD), como se pode ver na Figura 5, permite concluir que os linfócitos que possuem o menor conteúdo de DNA no grupo controle são os mesmos que possuem menores valores de OD, e, portanto, de cromatina menos compacta. Esses núcleos desaparecem no Grupo1, seja por simplesmente serem eliminados da corrente sanguínea, seja pelo aumento do conteúdo de DNA associado à condição hiperglicêmica.



**Figura 5. Correlação entre absorbância média por núcleo (OD) e Densidade óptica intergrada - Conteúdo Feulgen-DNA (IOD) para o Grupo 1 e Controle.** A linha sobreposta à figura do lado direito, junto aos núcleos do grupo controle corresponde à região que seria ocupada pelos núcleos dos portadores de diabetes.

Há evidência de que o DM1, através do aumento do conteúdo de DNA, está causando compactação cromatínica em linfócitos, já que seus núcleos não crescem em área (e conseqüentemente em volume), de forma proporcional ao aumento do conteúdo cromossômico. Avaliando os dois grupos, Grupo 1 e Controle, vê-se que o aumento de área nuclear com DM1 é da ordem de 10% (o que daria um aumento em volume da ordem de 14%), enquanto o aumento do conteúdo Feulgen-DNA alcança quase 40%. O aumento de compactação é acompanhado por um discreto, mas significativo aumento no Contraste (Figura 2-D), que mede em essência a variação de compactação em cada núcleo. O aumento do valor

médio desse parâmetro em portadores de diabetes em conjunto com o aumento da entropia (Figura 2-E), indica que houve o aparecimento de novas áreas de cromatina compacta nesses núcleos, o que pode indicar um maior empacotamento de cromossomos inteiros nesses núcleos.

### 5.1.3. Correlação dos parâmetros bioquímicos *versus* parâmetros nucleares para DM1

Conforme exposto anteriormente as dosagens de glicemia de jejum maior ou igual a 126 mg/dL ou de HbA1c maior que 6,5% contribuem para o diagnóstico de diabetes *mellitus*. Portanto, como se pode ver na Tabela 5, todos os indivíduos do Grupo 1 apresentaram índices glicêmicos compatíveis com o diagnóstico de diabetes, exceto pelo paciente 0104, que tem um histórico clínico comprovado de diabetes, mas do qual só tivemos acesso a uma medida de glicemia, estando esta dentro da normalidade. Neste caso, a análise de HbA1c (acima de 6,5%) comprova que este apresentou quadro hiperglicêmico nos últimos dois a três meses. Para os indivíduos do grupo controle (não diagnosticados como portadores de diabetes), todos os índices glicêmicos apresentaram-se dentro da normalidade, assim como os valores para HbA1c (abaixo de 6,0%).

**Tabela 5. Média individual de glicemia de jejum e de hemoglobina glicada (HbA1c) e média geral por Grupos (DM1 e Controle)**

	Glicemia (mg/dL)	HbA1c (%)
<b>Grupo 1 - DM1</b>		
0101	168 ± 9,9	8,9 ± 0,32
0102	213 ± 69,2	8,5 ± 1,80
0103	255 ± 60,6	8,1 ± 0,10
0104	85 ± -----	8,6 ± 0,15
0105	215 ± 53,1	10,6 ± 0,38
<b>Controles</b>		
C0101	87 ± 1,4	5,2 ± -----
C0102	85 ± 4,0	5,0 ± -----
C0103	74 ± -----	5,2 ± -----
C0104	97 ± -----	5,2 ± -----
C0105	85 ± -----	5,4 ± -----
<b>Média Geral por Grupos</b>		
DM1	187 ± 29,0 a	8,9 ± 0,43 a
Controle	85 ± 3,6 b	5,2 ± 0,06 b

Valores expressos em média ± erro padrão da média; os dados ausentes de erro padrão indicam que houve apenas uma medição e a média na realidade é uma única medida; letras diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística para  $p < 0,05$ .

Tabela 6. Correlações de Pearson entre parâmetros nucleares e bioquímicos para DM1

Dados totais					
	Área nuclear ( $\mu\text{m}^2$ )	OD	IOD	Contraste	Entropia
Glicemia	-0,007	0,414	0,507	0,204	0,457
HbAc1	0,407	0,244	0,669*	0,049	0,452
Excluindo 0104					
	Área nuclear ( $\mu\text{m}^2$ )	OD	IOD	Contraste	Entropia
Glicemia	0,202	0,421	0,762*	0,205	0,503
HbAc1	0,326	0,261	0,645	0,057	0,443

\*indica diferença estatística para  $p < 0,05$ .

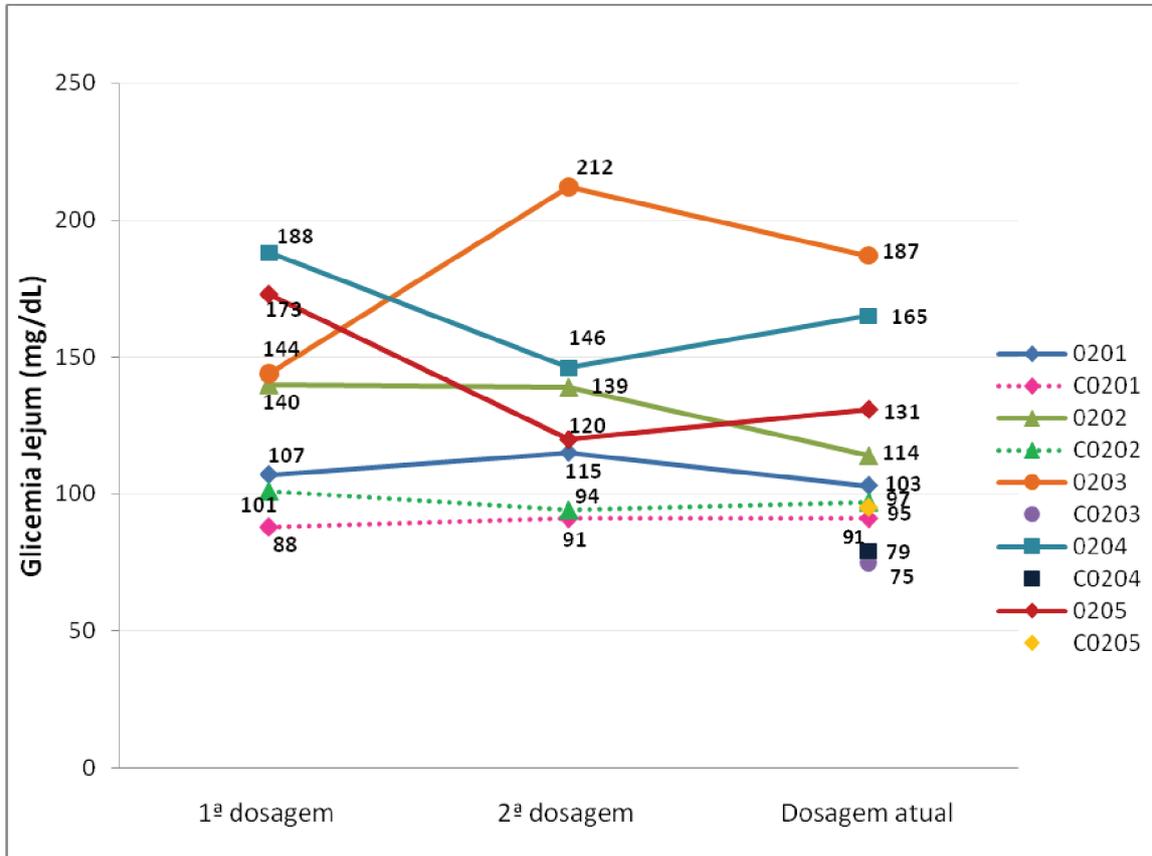
Como esperado, os níveis de HbAc1 estão correlacionados positivamente com os níveis glicêmicos (correlação de Pearson = 0,746, com  $p = 0,013$ ). Entretanto, a única correlação estatisticamente significativa encontrada entre os parâmetros bioquímicos e os parâmetros nucleares foi entre o conteúdo Feulgen-DNA (IOD), cuja variação associada ao DM1 é a mais expressiva dentre todos os parâmetros nucleares avaliados, e HbA1c. Assim níveis maiores de hemoglobina glicada presentes nos portadores de diabetes estão associados com aumento no conteúdo Feulgen-DNA de linfócitos. Acreditamos que a falta de correlação entre IOD e glicemia não foi encontrada por causa da glicemia discrepante do indivíduo 0104 (ver tabela 5), e de fato, quando este indivíduo é retirado da análise, encontra-se uma correlação positiva estatisticamente significativa entre glicemia e conteúdo Feulgen-DNA (correlação de Pearson = 0,762, para  $p = 0,013$ ). Sendo assim, esses dados indicam que um dos principais efeitos da hiperglicemia é contribuir para a alteração do conteúdo Feulgen-DNA em linfócitos humanos, no diabetes *mellitus* tipo 1.

## 5.2. Análises comparativas do Grupo 2 versus Controle para parâmetros bioquímicos e citoquímicos

### 5.2.1. Glicemia de jejum e hemoglobina glicada do Grupo 2 e de seus respectivos controles

Com o intuito de obter um antecedente da glicemia de jejum e HbA1c dos participantes incluídos no Grupo 2, além de coletar as amostras para realizar as dosagens e proceder as análises citoquímicas, foi realizada uma busca por dois resultados anteriores no

Sistema de Informação Hospitalar HC-UFU. Os dados (Gráfico 3) mostram que os resultados obtidos das dosagens de todas as amostras que foram coletadas para este estudo não ultrapassaram 200mg/dL para glicemia de jejum, porém as dosagens anteriores diferem bastante entre os participantes, bem como para HbA1c (Gráfico 4).

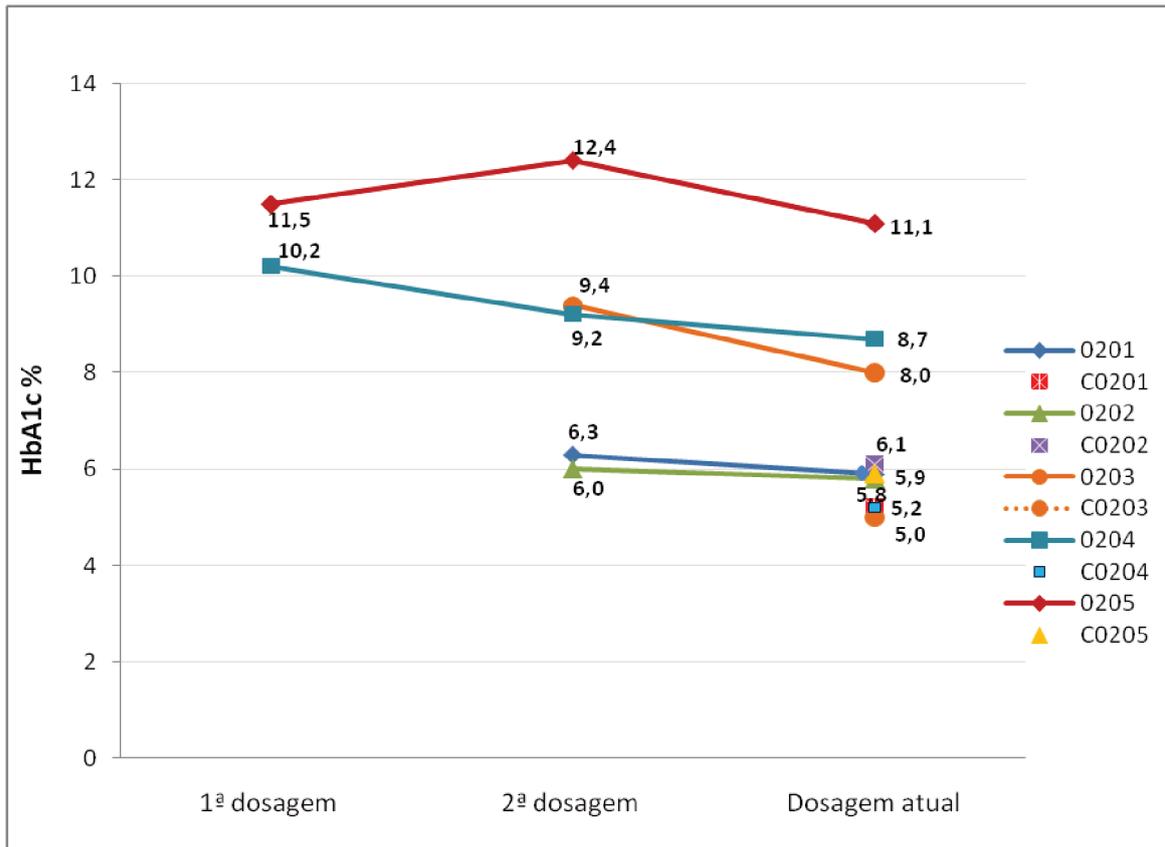


**Gráfico 3. Dosagens da glicemia de jejum dos participantes do Grupo 2 e Controle**

Foram usados códigos numéricos para identificação de cada participante do Grupo 1 = 0201; 0202; 0203; 0204; 0205. Para cada respectivo controle foi usado um código alfa numérico (acrescido da letra “C”) = C0201; C0202; C0203; C0204; C0205. Datas das dosagens diferem entre os participantes. Dosagem atual compreende a do dia em que foi coletada a amostra para o presente trabalho.

Os participantes do Grupo Controle para DM2 (Gráficos 3 e 4) não apresentaram resultados alterados para os testes mencionados anteriormente, conforme esperado. A maioria dos participantes incluídos neste grupo não possuía resultados anteriores registrados no Sistema de Informação Hospitalar HC-UFU, pois não realiza estes exames rotineiramente.

De acordo com as informações coletadas (Tabela7) por meio do Instrumento de coleta de dados a maioria dos pacientes do Grupo 2, é portadora de hipertensão arterial, porém não tem complicações decorrentes do diabetes (retinopatia, nefropatia, pé diabético, doença aterosclerótica: coronariopatia ou infarto agudo do miocárdio prévio, acidente vascular encefálico, doença arterial periférica).



**Gráfico 4. Dosagens da HbA1c dos participantes do Grupo 2 e Controle.**

Foram usados códigos numéricos para identificação de cada participante do Grupo 1 = 0201; 0202; 0203; 0204; 0205. Para cada respectivo controle foi usado um código alfa numérico (acrescido da letra "C") = C0201; C0202; C0203; C0204; C0205. As dosagens atuais de HbA1c para os indivíduos C0201; C0204 foram iguais a 5,2%. As dosagens para 0201 e C0205 foram iguais a 5,9%. Datas das dosagens diferem entre os participantes. Dosagem atual compreende a do dia em que foi coletada a amostra para o presente trabalho.

**Tabela 7. Dados clínicos dos participantes do Grupo 2**

Identificação – Sexo - Idade	Tempo de Diagnóstico	História Familiar de DM	Comorbidades	Complicações do Diabetes	Tratamento do DM2
0201 – F - 46a	4 anos	SIM	Hipertensão arterial, obesidade	NÃO	Medicamento oral
0202 - F - 55a	10 anos	SIM	Hipertensão arterial, sobrepeso	NÃO	Medicamento oral
0203 - F - 55a	>5 anos	SIM	NÃO	NÃO	Medicamento oral
0204 - F - 55a	12 anos	SIM	Hipertensão arterial	NÃO	Medicamento oral + insulina
0205 - M - 55a	12 anos	SIM	Hipertensão arterial	NÃO	Medicamento oral + insulina

F = sexo feminino; M = sexo masculino; a = idade em anos

### 5.2.2. Perfil das análises citoquímicas para linfócitos do Grupo 2 e seus respectivos controles

Assim como aconteceu para os pacientes com diabetes tipo 1 e seus controles, também há bastante variação individual para os parâmetros nucleares analisados no Grupo 2 e seus respectivos controles (Tabelas 8 e 9).

**Tabela 8. Comparação intragrupo Linfócitos do Grupo 2 para parâmetros nucleares**

Participante	n	Área nuclear ( $\mu\text{m}^2$ )	OD	IOD	Contraste	Entropia
0201	200	45,2 $\pm$ 0,567 a	0,35 $\pm$ 0,003 a	15,8 $\pm$ 0,104 a	19,3 $\pm$ 0,372 a	7,34 $\pm$ 0,009 a
0202	195	45,8 $\pm$ 0,597 a	0,32 $\pm$ 0,003 b	14,2 $\pm$ 0,112 b	16,4 $\pm$ 0,266 b	7,12 $\pm$ 0,013 b
0203	167	38,9 $\pm$ 0,425 b	0,35 $\pm$ 0,003 a	13,6 $\pm$ 0,096 c	23,9 $\pm$ 0,559 c	7,26 $\pm$ 0,012 c
0204	176	32,1 $\pm$ 0,395 c	0,34 $\pm$ 0,003 c	10,8 $\pm$ 0,127 d	17,2 $\pm$ 0,500 b	7,26 $\pm$ 0,009 c
0205	189	40,8 $\pm$ 0,527 b	0,29 $\pm$ 0,002 d	11,8 $\pm$ 0,089 e	16,7 $\pm$ 0,224 b	7,10 $\pm$ 0,010 b

n – número de células analisadas; OD – densidade óptica média; IOD – Conteúdo Feulgen-DNA; valores expressos em média  $\pm$  erro padrão da média; Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística para  $p < 0,05$ .

**Tabela 9. Comparação intragrupo Linfócitos Controle para parâmetros nucleares**

Participante	n	Área nuclear ( $\mu\text{m}^2$ )	OD	IOD	Contraste	Entropia
C0201	140	56,5 $\pm$ 0,644 a	0,25 $\pm$ 0,002 a	14,1 $\pm$ 0,129 a	13,9 $\pm$ 0,322 a	6,86 $\pm$ 0,014 a*
C0202	164	40,4 $\pm$ 0,453 b	0,26 $\pm$ 0,002 a	10,2 $\pm$ 0,092 b	15,3 $\pm$ 0,181 b	6,84 $\pm$ 0,017 b
C0203	189	41,5 $\pm$ 0,519 b	0,28 $\pm$ 0,002 b	11,5 $\pm$ 0,092 c	13,3 $\pm$ 0,189 a*	6,95 $\pm$ 0,014 a
C0204	176	53,0 $\pm$ 0,516 c	0,24 $\pm$ 0,002 c	12,4 $\pm$ 0,140 d	12,6 $\pm$ 0,136 c*	6,81 $\pm$ 0,016 b*
C0205	171	49,4 $\pm$ 0,676 d	0,27 $\pm$ 0,003 d	13,2 $\pm$ 0,112 e	16,7 $\pm$ 0,430 d	6,92 $\pm$ 0,016 a

n – número de células analisadas; OD – densidade óptica média; IOD – Conteúdo Feulgen-DNA; valores expressos em média  $\pm$  erro padrão da média; Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística para  $p < 0,05$ ; \*indica que não há diferença estatística entre os dois.

Entretanto, como se pode ver pela Tabela 10, o grupo dos portadores de diabetes tipo 2 pode facilmente ser caracterizado como apresentando diferenças estatisticamente significativas em todos os parâmetros nucleares analisados, em relação ao grupo controle. De acordo com a Tabela 10, diferentemente do que foi observado para linfócitos em portadores de diabetes tipo 1, no Grupo 2 houve uma diminuição das áreas nucleares o que pareceu ser um fenômeno generalizado em toda a população linfocitária analisada, como se pode ver pelos histogramas presentes na Figura 6-A.

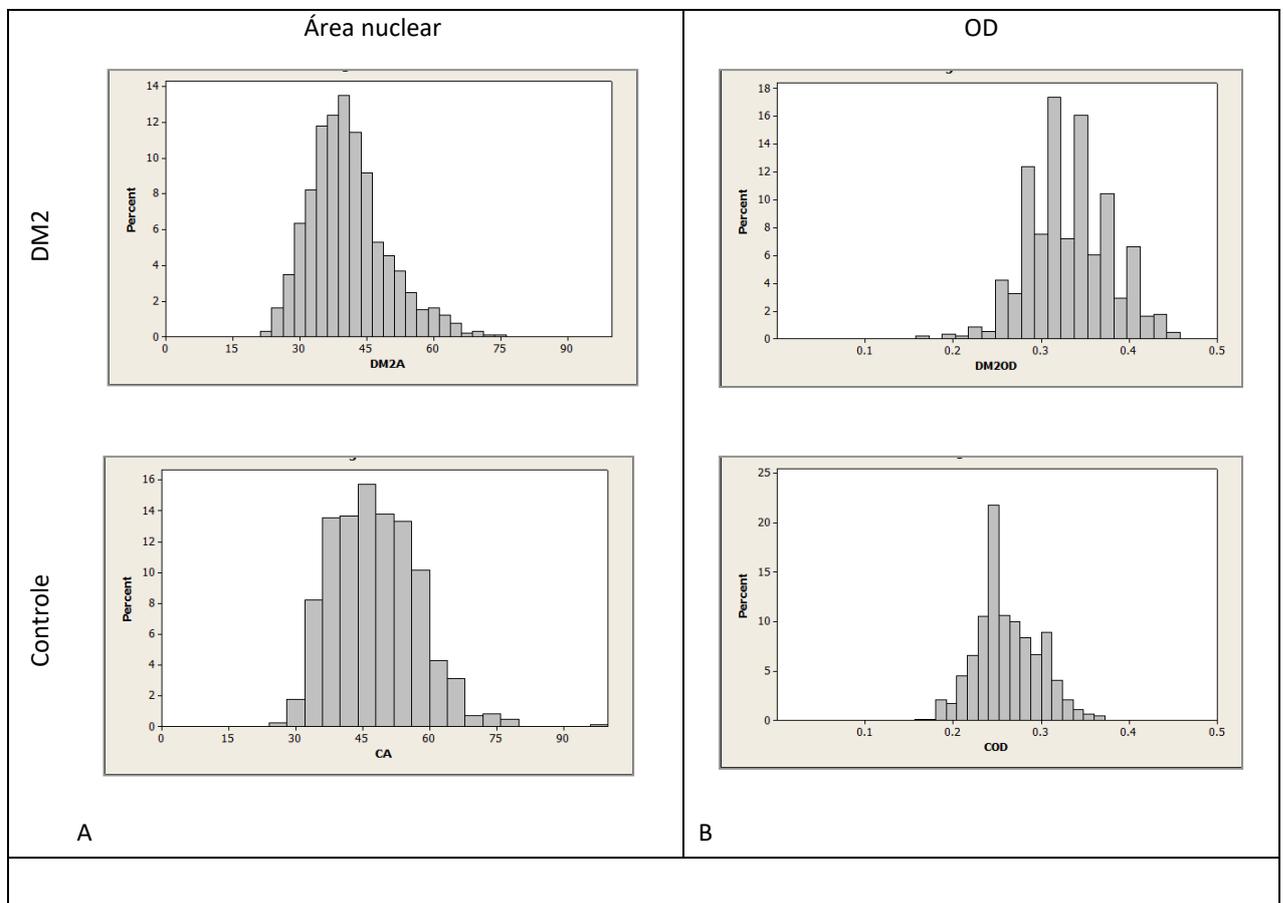
Considerando que a variação de conteúdo Feulgen-DNA, embora estatisticamente significativa, menos de 10%, talvez não seja considerada uma variação biologicamente relevante. De fato, ao observar os histogramas de IOD notam-se alterações, porém menos

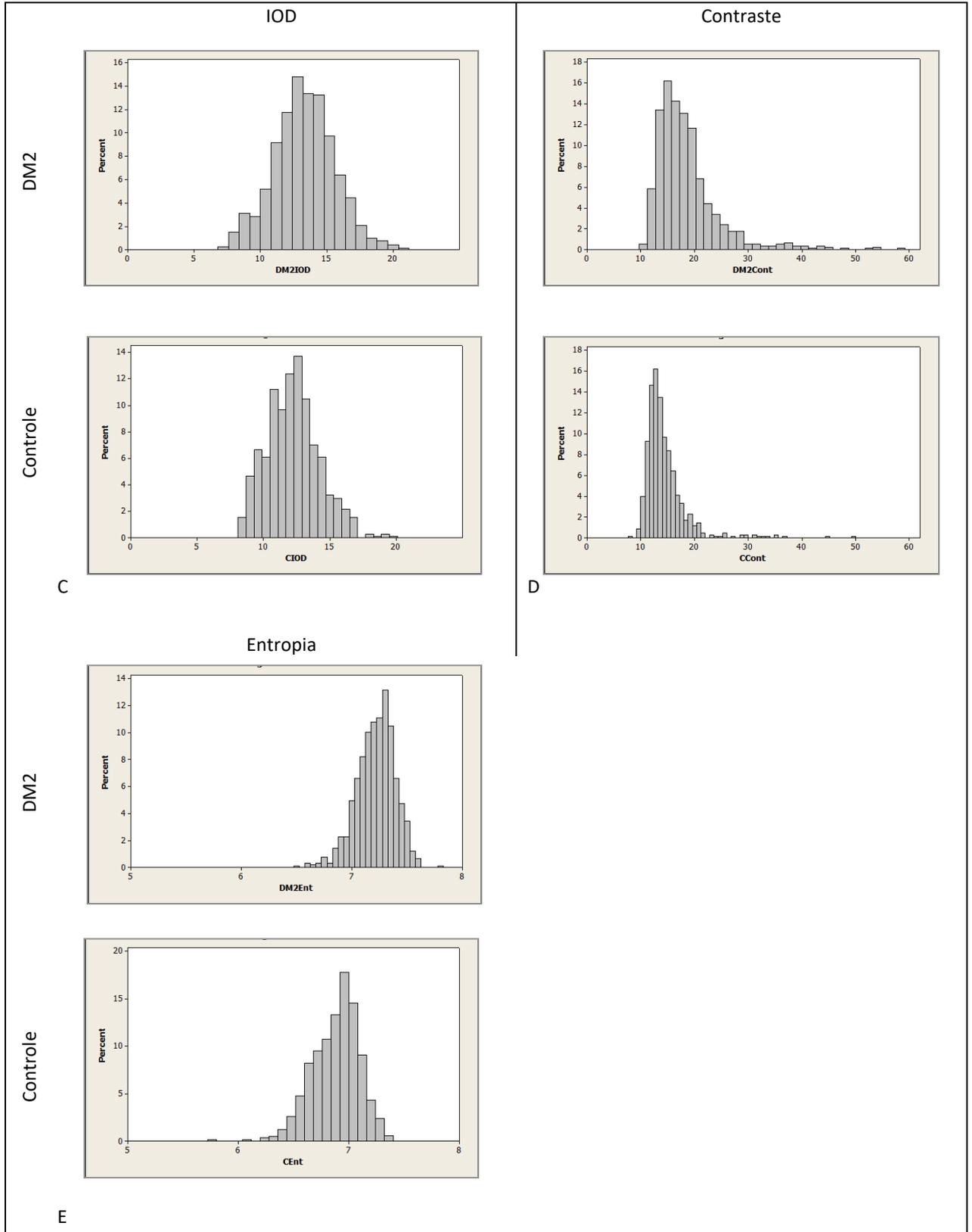
evidentes que as observadas no Grupo1. Supõe-se que a variação de mais de 15% nas áreas nucleares (bastante visível nos histogramas) esteja associada a eventos de compactação cromatínica. O aumento nos valores de OD, vistos na tabela, mas também generalizados em toda a população linfocitária (Figuras 7 e 8) confirmam essa conclusão. Aumentos expressivos no contraste e na entropia em linfócitos de portadores de diabetes tipo 2 confirmam que também nesses pacientes, a cromatina de linfócitos sofre alterações estruturais relacionadas com aparecimento de novas áreas heterocromáticas possivelmente decorrentes da compactação de cromossomos inteiros.

**Tabela 10. Efeitos do DM2 em parâmetros nucleares de linfócitos humanos**

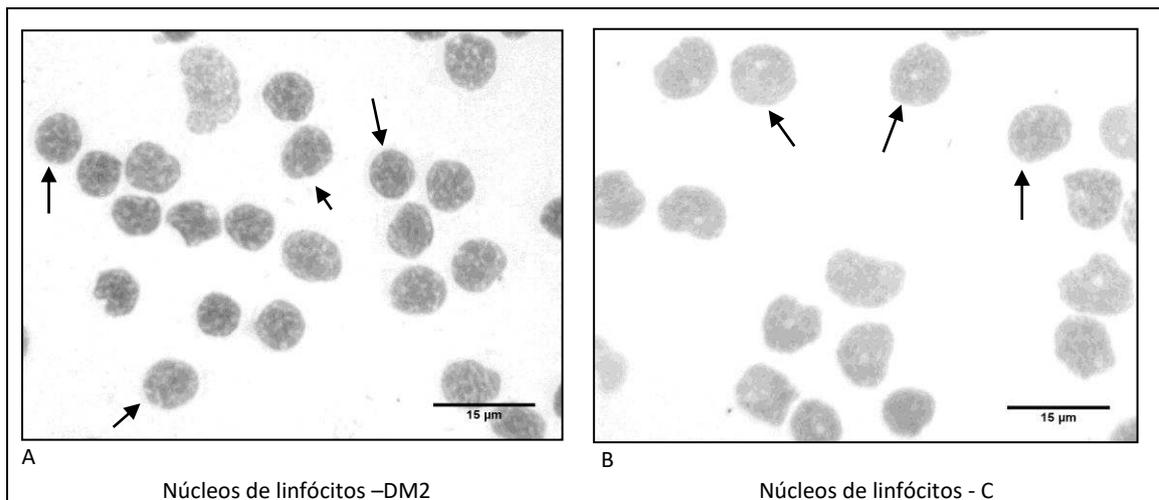
Grupo	n	Área nuclear ( $\mu\text{m}^2$ )	OD	IOD	Contraste	Entropia
DM2	927	40,8 $\pm$ 0,283 a	0,33 $\pm$ 0,002 a	13,3 $\pm$ 0,075 a	18,6 $\pm$ 0,196 a	7,22 $\pm$ 0,006 a
Controle	840	47,8 $\pm$ 0,330 b	0,26 $\pm$ 0,001 b	12,2 $\pm$ 0,068 b	14,4 $\pm$ 0,130 b	6,88 $\pm$ 0,007 b

n – número de células analisadas; OD – densidade óptica média; IOD – Conteúdo Feulgen-DNA; valores expressos em média  $\pm$  erro padrão da média; Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística para  $p < 0,05$

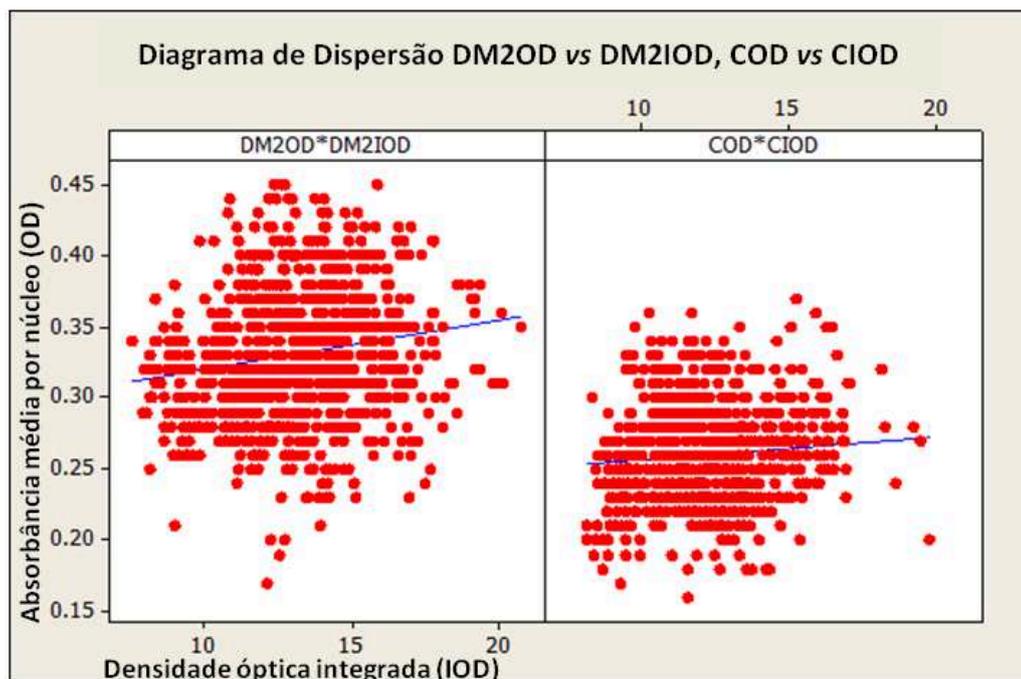




**Figura 6. Histogramas de parâmetros nucleares dos linfócitos analisados para Grupo 2 (DM2) e seus respectivos controles (Controle):** Área nuclear (A), Densidade óptica média (B), Densidade óptica integrada - Conteúdo Feulgen-DNA (C), Contraste (D) e Entropia (E).



**Figura 7. Imagens de núcleos de linfócitos do Grupo 2 e Controle em escala de cinza.** Observando-se os núcleos destacados pelas setas, em A nota-se uma diminuição das áreas nucleares, maior compactação da cromatina e núcleos mais contrastados quando comparados aos núcleos da imagem B. Núcleos de linfócitos-DM2 = Grupo 2. Núcleos de linfócitos-C = Grupo Controle.



**Figura 8. Correlação entre absorvância média por núcleo (OD) e Densidade óptica integrada - Conteúdo Feulgen-DNA (IOD) para o Grupo 2 e Controle**

### 5.2.3. Correlação dos parâmetros bioquímicos *versus* parâmetros nucleares para DM2

Assim como os indivíduos portadores de diabetes tipo 1, pacientes portadores de diabetes tipo 2 apresentam hiperglicemia (neste caso mais modesta que os valores apresentados pelos portadores de diabetes tipo 1), assim como valores para hemoglobina glicada fora da normalidade, excetuando-se o paciente 0201, com valores de glicemia na faixa

de hiperglicemia intermediária e duas medições para HbA<sub>1c</sub>, ambas dentro da normalidade (Tabela 11). Novamente, os níveis de hemoglobina glicada correlacionaram bem com os níveis glicêmicos (correlação de Pearson = 0,775, com  $p = 0,008$ ). Apesar disso, somente a glicemia, mesmo apresentando valores menores que em DM1, correlacionou bem com todos os parâmetros nucleares, exceto os valores Feulgen-DNA (IOD), fato este justificável, pela pequena variação desse parâmetro entre portadores e não portadores de diabetes tipo 2. Interessantemente, não encontramos relação estatisticamente significativa entre as alterações nucleares, associadas com o DM2, e os níveis de hemoglobina glicada, talvez pelo fato dos valores encontrados em dois dos pacientes estarem dentro da normalidade (Tabela 12).

Dessa forma, essencialmente, a hiperglicemia decorrente do diabetes tipo 2, está associada com compactação nuclear em linfócitos humanos, acompanhada por aumento no nível de compactação de áreas cromatínicas, levando a um maior contraste e entropia nucleares, o que pode indicar compactação de cromossomos específicos ou de extensas áreas cromatínicas.

**Tabela 11. Média individual de glicemia de jejum e de hemoglobina glicada (HbA<sub>1c</sub>) e média geral por Grupos (DM2 e Controle)**

	Glicemia (mg/dL)	HbA <sub>1c</sub> (%)
<b>Grupo 2 – DM 2</b>		
0201	108 ± 3,5	6,1 ± 0,20
0202	131 ± 8,5	5,9 ± 0,10
0203	181 ± 19,9	8,7 ± 0,70
0204	166 ± 12,1	9,4 ± 0,44
0205	141 ± 16,1	11,7 ± 0,38
<b>Controles</b>		
C0201	90 ± 1,0	5,2 ± -----
C0202	97 ± 2,0	6,1 ± -----
C0203	75 ± -----	5,0 ± -----
C0204	79 ± -----	5,2 ± -----
C0205	95 ± -----	5,9 ± -----
<b>Média Geral por Grupos</b>		
DM2	145 ± 12,9 a	8,4 ± 1,08 a
Controle	87 ± 4,4 b	5,4 ± 0,22 b

Valores expressos em média ± erro padrão da média; os dados ausentes de erro padrão indicam que houve apenas uma medição e a média na realidade é uma única medida; letras diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística para  $p < 0,05$ .

**Tabela 12. Correlações de Pearson entre parâmetros nucleares e bioquímicos para DM2**

<b>Dados totais</b>					
	<b>Área nuclear (<math>\mu\text{m}^2</math>)</b>	<b>OD</b>	<b>IOD</b>	<b>Contraste</b>	<b>Entropia</b>
Glicemia	-0,667*	0,767*	-0,001	0,791*	0,754*
HbAc1	-0,630	0,437	-0,273	0,480	0,522
<b>Excluindo 0201</b>					
	<b>Área nuclear (<math>\mu\text{m}^2</math>)</b>	<b>OD</b>	<b>IOD</b>	<b>Contraste</b>	<b>Entropia</b>
Glicemia	-0,667*	0,908*	0,061	0,856*	0,940*
HbAc1	-0,630	0,564	-0,248	0,547	0,741*

\*indica diferença estatística para  $p < 0,05$ .

Assim, por meio da metodologia utilizada neste estudo, fica claro pelos resultados obtidos que, ambos os tipos de diabetes, possivelmente por causa da hiperglicemia, estão associados com eventos de compactação nuclear e cromatínica em linfócitos humanos.

## 6. DISCUSSÃO

Os mecanismos moleculares subjacentes às alterações que ocorrem nas células do sistema imune no diabetes ainda não estão totalmente elucidados. No entanto, vários estudos apontam que alterações na cromatina estejam envolvidas neste processo. Frequentemente o DM está vinculado a complicações debilitantes, ao aumento da inflamação e à suscetibilidade a doenças infecciosas (YEBOAH et al., 2011; NGUYEN; SHAW; GRANT, 2012). A condição hiperglicêmica prévia parece desempenhar papel crucial neste processo (EL-OSTA et al., 2008; BEREZIN, 2016). Estudos com enfoque em linfócitos na presença do diabetes têm sido desenvolvidos com o intuito de entender as mudanças que podem ocorrer em nível de cromatina (MIAO et al., 2008; SIMAR et al., 2014), bem como outros processos como danos ao DNA (PEREIRA et al, 2013), perda de integridade cromossômica (BOEHM et al., 2008) e expressão gênica (MIAO et al., 2012) nestas células.

Neste trabalho quando se propôs observar as possíveis alterações cromatínicas que poderiam estar presentes nas populações de linfócitos do sangue periférico de pacientes portadores de diabetes tipo 1 e 2, colocou-se em questão a condição hiperglicêmica, seja transitória ou crônica, a qual estes indivíduos são submetidos. Ou seja, mesmo que algum indivíduo apresentasse glicemia de jejum dentro dos valores de referência para normalidade, tal condição não o excluiria do estudo, pois de acordo com estudos anteriores de El-Osta e colaboradores (2008) e Miao e colaboradores (2014) a condição hiperglicêmica prévia já é capaz de induzir alterações importantes nas células relacionadas à memória metabólica. Entretanto, dentre os pacientes portadores de diabetes, somente um participante do Grupo 1, o 0104, apresentou glicemia de jejum (amostra que foi coletada para proceder às análises) dentro da normalidade.

Na análise individual dos parâmetros nucleares estudados ocorreu variação intragrupo em todos os parâmetros nucleares, de todos os Grupos, isso indica que não houve influência do sexo ou idade nos resultados obtidos, pois de acordo com estudos anteriores de Thakur, Asaithambi e Mukherjee (1999) em modelo animal sobre a avaliação da conformação da cromatina, a idade e o sexo poderiam influenciar os resultados. Deste modo fica claro que, quando os dados são agrupados em dois grupos gerais (Grupo1 vs Controle) e (Grupo 2 vs Controle), as diferenças apresentadas são inerentes à variável em estudo: hiperglicemia.

Mais especificamente, os resultados comparativos entre os grupos 1 e 2 indicaram alterações estruturais importantes na organização cromatínica e nuclear no diabetes tipo 1 e tipo 2, em que os núcleos de linfócitos do Grupo 1 apresentaram uma maior compactação da

cromatina, pelo fato de ter ocorrido uma diminuição de núcleos com cromatina menos compacta, portanto, há que se considerar que os núcleos deste grupo se mostraram com cromatina mais compacta. Já no Grupo 2, a diminuição geral das áreas nucleares foi decorrente da compactação cromatínica pelo aumento generalizado nos valores de densidade óptica para toda a população linfocitária desse grupo. Otton e colaboradores (2004) constataram uma maior taxa de apoptose e um aumento da fragmentação do DNA em linfócitos de sangue periférico de pacientes portadores de diabetes, DM1 e DM2 mal controlados, em comparação com linfócitos de pacientes saudáveis. Concomitantemente com estes resultados observaram também alta ocorrência de condensação da cromatina e formação de *blebbing*. Porém neste caso, a condensação da cromatina nuclear é caracterizada pela perda do seu enquadramento estrutural e hipercromicidade do DNA que, combinada com a fragmentação nuclear é fenômeno característico de apoptose.

A metilação do DNA exerce participação no processo de transcrição gênica entre outras funções e é uma forma de modificação da cromatina que consiste na adição de um grupamento metil (5mC) na citosina que geralmente precede a uma guanina (dinucleotídeo CpG) que está presente principalmente em regiões promotoras dos genes e geralmente pode estar associada a repressão gênica (KEATING; EL-OSTA, 2015). Mecanicamente, geralmente o 5mC é interpretado por proteínas reguladoras e então ocorre o recrutamento de complexos de remodelação de cromatina para estabelecer uma cromatina repressiva transcricionalmente, promovendo, assim, a condensação da cromatina para a forma inativa, com maior compactação da mesma (ATTWOOD; YUNG; RICHARDSON, 2002).

Corroborando com os resultados encontrados no presente estudo, Simar e colaboradores (2014), em um estudo realizado com pacientes obesos e portadores de diabetes evidenciaram que a obesidade e o DM2 estão associados a uma remodelação drástica do epigenoma de tipos específicos de células do sistema imunológico. Ambos os grupos (obesos e portadores de diabetes tipo 2) foram caracterizados pelo aumento global de metilação do DNA em linfócitos B. Esta linhagem de células foi anteriormente descrita por Winer e colaboradores (2011) por desempenhar um papel importante no desenvolvimento da resistência insulínica por meio da produção de anticorpos IgG e ativação de células T e macrófagos. No estudo de Simar e colaboradores também ocorreu no diabetes tipo 2 um aumento na metilação de DNA em células *natural killer*. Conforme Guo e colaboradores (2012) as células NK podem exercer um papel importante na inflamação crônica relacionada à obesidade, a qual pode contribuir para a instalação da resistência insulínica envolvida na patogênese do DM2.

Já Martinez e colaboradores (2014) observaram uma descondensação da cromatina em linfócitos T retirados de linfonodos de camundongos portadores de diabetes induzidos por estreptozotocina, cronicamente hiperglicêmicos. Pois encontraram maior frequência de núcleos descondensados em células T *naive*, como ocorre normalmente após a ativação destas células no encontro inicial com o antígeno. Concluíram também que o aumento de citocinas produzidas por estas células estava associado à hiperglicemia.

No espaço limitado do núcleo, a cromatina é organizada de forma dinâmica e não aleatória, sendo que a topologia cromatínica tem sido correlacionada com mecanismos envolvidos nos processos de saúde *versus* doença (KEATING; EL-OSTA, 2015; ALMASSALHA et al., 2017). No presente estudo foram observadas, em conjunto com a compactação cromatínica, alterações estruturais relacionadas com aparecimento de novas áreas heterocromáticas nos núcleos dos linfócitos em ambos os tipos de diabetes, estes núcleos se apresentaram mais heterogêneos. Os fenômenos observados contribuem para uma redistribuição da cromatina e podem refletir na alteração da expressão gênica (BELMONT, 2014).

Conforme Kreuz e Fische (2016) o estresse oxidativo exerce um papel importante sobre a conformação da estrutura da cromatina. Mudanças que ocorrem na cromatina medeiam várias alterações celulares, incluindo modulação da expressão gênica, morte celular, sobrevivência celular e mutagênese. Portanto, estas alterações têm grande impacto no desenvolvimento e progressão de várias doenças humanas como câncer, diabetes, hipertensão e doenças neurodegenerativas.

O estresse oxidativo devido à hiperglicemia crônica pode exercer um papel importante na perda de integridade cromossômica (BOEHM et al., 2008). Neste contexto existe a possibilidade de que um aumento no conteúdo de DNA possa contribuir para atender a demanda transcricional da célula, visto que um aumento da produção metabólica poderia de certo modo atuar compensando a quantidade aumentada de moléculas danificadas não-funcionais ou até mesmo funcionar como um mecanismo de proteção ao estresse oxidativo ou a mutações. Deste modo o DNA ou genes excedentes funcionariam como *backup*, caso a cópia original sofresse danos (GHIRALDINI et al., 2012).

Portanto, há que se considerar o aumento do conteúdo Feulgen-DNA (IOD) observado no Grupo 1, visto que os núcleos dos linfócitos de portadores de diabetes deste grupo não cresceram em área, conseqüentemente em volume de forma proporcional ao aumento do conteúdo cromossômico. Entretanto, esse aumento não parece estar associado a eventos de proliferação ou poliplodização. A hipótese de que este aumento estaria correlacionado com

aneuploidização poderia ser considerada. A aneuploidia corresponde a eventos em que ocorrem o ganho ou perda de cromossomos (AGUILERA; GOMEZ-GONZALEZ, 2008). Já no Grupo 2, diferentemente do observado no Grupo 1, apesar de estatisticamente significativa, o conteúdo Feulgen-DNA, neste estudo não pôde ser considerado biologicamente relevante, pois consideramos que uma variação menor que 10% poderia ser atribuída à técnica em si.

Boehm e colaboradores (2008) encontraram associação do diabetes tipo 2 em mulheres jovens com a ocorrência de aberrações cromossômicas em seus linfócitos, o que foi também diretamente relacionado à diminuição da sobrevida. Entre as alterações observadas no estudo do cariótipo metafásico estavam alterações de aumento numérico. Assim os autores propuseram que este achado poderia ser considerado um fator de risco relacionado à morte prematura de mulheres DM2. Além disso, já foram observados eventos de aneuploidização em linfócitos do sangue periférico humano relacionados a outras doenças, tais como leucemias (DÖHNER et al., 2000; KUMAR et al., 2015) doença de Alzheimer (MIGLIORE et al., 1999; ZIVKOVIĆ et al., 2006), entre outras.

Os níveis glicêmicos insistentemente elevados e o descontrole da glicemia em longo prazo causam danos ao organismo como complicações, perda de função normal e falência de vários órgãos. (QUADROS et al., 2007; FERREIRA et al., 2011). A HbA1c é utilizada no acompanhamento dos indivíduos portadores de diabetes tipo 1 e 2 e seu uso na prática clínica foi validada pelos dois estudos clínicos mais relevantes sobre a avaliação do impacto do rígido controle glicêmico sobre a incidência e a progressão das complicações do diabetes: o Diabetes Control and Complications Trial (DCCT, 1993) e o United Kingdom Prospective Diabetes Study (UKPDS, 1998). Os resultados destas pesquisas indicam que a manutenção do nível de HbA1c menor que 7% para indivíduos portadores de diabetes, tanto no adulto como no adulto jovem, está diretamente relacionada a uma menor incidência de complicações relacionadas ao diabetes.

Os resultados de HbA1c dos Grupos (1 e 2) foram importantes indicadores da condição hiperglicêmica anterior que os indivíduos portadores de diabetes normalmente apresentam, pois, não significa que um indivíduo com um valor de glicemia recente dentro da normalidade não viesse apresentar alterações na cromatina, como por exemplo o paciente 0104, que mesmo tendo valor de glicemia dentro da normalidade, porém HbA1c alterada, apresentou aumento nos valores de conteúdo Feulgen-DNA, contraste e entropia quando comparado ao seu respectivo controle. O mesmo comportamento foi observado para os demais indivíduos do Grupo 1 quando comparados aos seus controles, exceto o controle C0103 que apresentou valor de contraste bem maior que os demais. Portanto, pelos resultados

obtidos quando se correlacionou os parâmetros bioquímicos *versus* nucleares para o Grupo1, observou-se alta correlação positiva entre HbA1c e o conteúdo Feulgen-DNA, cuja variação associada ao diabetes tipo 1 foi a mais expressiva dentre todos os parâmetros nucleares avaliados neste grupo. A comparação de alterações que ocorrem na cromatina aos níveis de HbA1c já foi utilizada por Miao e colaboradores (2014) que relacionaram as complicações do diabetes com aumento de acetilação de histonas em monócitos *in vivo*, em regiões promotoras de um conjunto de genes relacionados à inflamação, sendo que os níveis maiores de acetilação foram correlacionados com níveis mais altos de HbA1c.

Como se vê, tornam-se necessários mais estudos com enfoque sobre os mecanismos que ocorrem em nível celular no diabetes *mellitus*, mais especificamente nos núcleos de linfócitos, com o intuito de compreender o papel que a hiperglicemia pode exercer nas alterações desta estrutura celular, bem como na cromatina. Pois, conforme exposto estas alterações trazem como consequência a perturbação da homeostasia celular. Para maior clareza dos resultados obtidos nesta pesquisa faz-se necessária a aplicação de outras técnicas de estudo da estrutura da cromatina, bem como análises do grau de acessibilidade da mesma.

## 7. CONCLUSÃO

- Os dois tipos de diabetes *mellitus* (DM1 e DM2), possivelmente por causa da hiperglicemia, alteram parâmetros estruturais relacionados com organização cromatínica em linfócitos humanos do sangue periférico *in vivo*;
- Ambos os tipos de DM estão associados com eventos de compactação nuclear e cromatínica em linfócitos;
- A cromatina de linfócitos em ambos os tipos de DM sofre alterações estruturais relacionadas com aparecimento de novas áreas heterocromáticas possivelmente decorrentes da compactação de cromossomos inteiros ou de partes destes;
- Houve alteração do conteúdo Feulgen-DNA, possivelmente associada à aneuploidia, em linfócitos de pacientes portadores de diabetes. Esta alteração apresentou-se mais evidente em DM1 que em DM2;
- Os níveis glicêmicos e de hemoglobina glicada correlacionaram positivamente entre si e também com algumas das alterações de parâmetros nucleares como conteúdo Feulgen-DNA em DM1, e níveis de compactação cromatínica em DM2;
- Desde modo, as alterações, notadamente encontradas neste estudo, nos núcleos e na cromatina de linfócitos de indivíduos portadores de diabetes devem ser mais bem compreendidas por meio de estudos futuros para assim podermos afirmar que estas alterações são, de fato, uma consequência da hiperglicemia.

## <sup>1</sup>REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. H. I. V. Células e Tecidos do Sistema Imunológico. In: **Imunologia celular e molecular**. 6. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008. Págs 48-56
- ADA, American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus . **Diabetes Care**, v. 37(Supplement 1): S81-S90, 2014. <https://doi.org/10.2337/dc14-S081>
- AGUILERA, A.; GOMEZ-GONZALEZ, B. Genome instability: A mechanistic view of its causes and consequences. **Nat Rev Genet** 9:204–217. 2008. <https://doi.org/10.1038/nrg2268>
- ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Biologia molecular da célula**. 5ª. ed. Porto Alegre : Artmed, 2010, pp. 219-233.
- ALMASSALHA, L. M., et al. The Global Relationship between Chromatin Physical Topology, Fractal Structure, and Gene Expression. **Scientific Reports**, Article number: 41061, 2017. <https://doi.org/10.1038/srep41061>
- APOSTOLOU, I.; SARUKHAN, A.; KLEIN, L.; et al. Origin of regulatory T cells with known specificity for antigen. **Nat Immunol**. 3:756-63. 2002. <https://doi.org/10.1038/ni816>
- ARAKI, Y.; MIMURA, T. The Histone Modification Code in the Pathogenesis of Autoimmune Diseases. **Mediators of Inflammation**. Volume 2017, Article ID 2608605, pag, 1-12., 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/2608605>
- ATKINSON, M. A. The Pathogenesis and Natural History of Type 1 Diabetes. **Cold Spring Harb Perspect Med**. Nov 1;2(11). pii: a007641, 2012. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a007641>
- ATTWOOD, J.T.; YUNG, R.L.; RICHARDSON, B.C. DNA methylation and the regulation of gene transcription. **Cell Mol Life Sci**. v. 59 (2): 241-572002. <https://doi.org/10.1007/s00018-002-8420-z>
- BADEAUX AI, SHI Y. Emerging roles for chromatin as a signal integration and storage platform. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol**. 14(4), 211–224, 2013. <https://doi.org/10.1038/nrm3545>
- BAEHNER, R. L. **Normal Phagocyte Structure and Function**. In: HOFFMAN R.; BENZ, E. J., Jr.; SHATTIL, S. J.; FURIE, B.; COHEN, H. J.; SILBERSTEIN L. E.; McGLAVE, P. **Hematology: Basic Principles and Practice**. 4th ed. Philadelphia: Elsevier Inc, 2005.

---

<sup>1</sup> Baseado na ABNT NBR 6023/2002

- BANNISTER, A. J.; KOUZARIDES, T. Regulation of chromatin by histone modifications. **Cell research**, v. 21, n. 3, p. 381-395, 2011. <https://doi.org/10.1038/cr.2011.22>
- BARKER, J.M.; et al. Prediction of autoantibody positivity and progression to type 1 diabetes: Diabetes Autoimmunity Study in the Young (DAISY). **J Clin Endocrinol Metab.** 89:3896-902. 2004. <https://doi.org/10.1210/jc.2003-031887>
- BAUER, A. J.; MARTIN, K.A. Coordinating regulation of gene expression in cardiovascular disease: interaction between chromatin modifiers and transcription factors. **Frontiers in Cardiovascular Medicine.** v 2, p 4-19, 2017. <https://doi.org/10.3389/fcvm.2017.00019>
- BELMONT, A.S. Large-scale chromatin organization: the good, the surprising, and the still perplexing. **Curr. Opin. Cell Biol.** v. 26, p. 69–78, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2013.10.002>
- BEREZIN, A. Metabolic memory phenomenon in diabetes mellitus : Achieving and perspectives. **Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews** 10S S176–S183,2016. <https://doi.org/10.1016/j.dsx.2016.03.016>
- BOEHM, B. O. et al. Lymphocytes of type 2 diabetic women carry a high load of stable chromosomal aberrations: a novel risk factor for disease-related early death. **Diabetes.** 57(11):2950-7. doi: 10.2337/db08-0274. 2008. <https://doi.org/10.2337/db08-0274>
- BOLDISON, J.; WONG S. F. Immune and Pancreatic  $\beta$  Cell Interactions in Type 1 Diabetes. **Trends in Endocrinology & Metabolism.** December 2016, Vol. 27, No. 12. 2016. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2016.08.007>
- BOLLATI, V.; BACCARELLI, A. Environmental epigenetics. **Chronobiology International**, London, v. 27, n. 5, p. 1093-1104, 2010. <https://doi.org/10.3109/07420528.2010.490065>
- BRADLEY, L.M. Migration and T-lymphocyte effector function. **Curr Opin Immunol** 2003; 15(3):343-8. [https://doi.org/10.1016/S0952-7915\(03\)00043-8](https://doi.org/10.1016/S0952-7915(03)00043-8)
- BRASIL. **Cadernos de Atenção Básica – Estratégias para o cuidado da pessoa com doença crônica: diabetes mellitus** . Brasília: Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde, Departamento de Atenção Básica. 2013. 160 p.
- CALDERON, B.; et al. Dendritic cells in islets of Langerhans constitutively present beta cell-derived peptides bound to their class II MHC molecules. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, 105 (2008), pp. 6121-6126. 2008. <https://doi.org/10.1073/pnas.0801973105>
- CALDERON, B.; UNANUE, E.R. Antigen presentation events in autoimmune diabetes **Curr. Opin. Immunol.**, 24, pp. 119-128. 2012. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2011.11.005>

CALVET, H. M.; YOSHIKAWA, T. T. Infections in diabetes. **Infectious Disease Clinics of North America**. v.15, p. 407-419. 2001. [https://doi.org/10.1016/S0891-5520\(05\)70153-7](https://doi.org/10.1016/S0891-5520(05)70153-7)

CERIELLO, A., IHNAT, M. A., THORPE, J. E. The “Metabolic Memory”: Is More Than Just Tight Glucose Control Necessary to Prevent Diabetic Complications?. **J Clin Endocrinol Metab**. February 2009, 94(2):410–415. <https://doi.org/10.1210/jc.2008-1824>

CHANDALIA, H. B.; KRISHNASWAMY, P. R.. Glycated Haemoglobin. **Current Science**, 2002; 83 (12): 1522-1532, 2002.

CHEN, Z.; TATO, C.M.; MUUL, L.; LAURENCE, A.; O’SHEA J.J. Distinct Regulation of Interleukin-17 in Human T Helper Lymphocytes. **Arthritis & Rheumatism** 2007; 56(9):2936-46. 2007. <https://doi.org/10.1002/art.22866>

COPPIETERS, K.T.; et al. Demonstration of islet-autoreactive CD8 T cells in insulitic lesions from recent onset and long-term type 1 diabetes patients. **J. Exp. Med.**, 209 (2012), pp. 51-60. 2012. <https://doi.org/10.1084/jem.20111187>

CRAIG, M.E.; JEFFERIES, C.; DABELEA, D.; BALDE, N.; SETH, A.; DONAGHUE, K.C. Definition, epidemiology, and classification of diabetes in children and adolescents. **Pediatric Diabetes**, v. 15, n. 20, p. 4-17, 2014. <https://doi.org/10.1111/pedi.12186>

CRUVINEL, W.M.; MESQUITA JR. D.; ARAUJO, J.A.P.; SALMAZI, K.C.; KÁLLAS, E.G.; ANDRADE, L.E.C. Natural Regulatory T cells in Rheumatic Diseases. **Rev Bras Reumatol** 2008; 48(6):342-355. <https://doi.org/10.1590/S0482-50042008000600007>

DCCT RESEARCH GROUP. Diabetes Control and Complications Trial (DCCT). The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus . **N Engl J Med**, v. 329, p. 977-86, 1993. <https://doi.org/10.1056/NEJM199309303291401>

DCCT/EDIC, Diabetes Control and Complications Trial/Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications Research Group. Risk factors for cardiovascular disease in Type 1 Diabetes. **Diabetes**, v. 65, n. 5, p. 1370-1379, 2016.

DECHASSA, M. L.; LUGER, K. **Nucleosomes as Control Elements for Accessing the Genome**. In *Genome Organization And Function In The Cell Nucleus*, First Edition. Edited by Karsten Rippe. © 2012 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim. Published 2012 by WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.

DEFURIA, J.; BELKINA, A. C.; JAGANNATHAN-BOGDAN, M. et al. B cells promote inflammation in obesity and type 2 diabetes through regulation of T-cell function and an inflammatory cytokine profile. **Proc Natl Acad Sci USA** 2013;110:5133–5138. <https://doi.org/10.1073/pnas.1215840110>

DENG, T. et al. Class II major histocompatibility complex plays an essential role in obesity-induced adipose inflammation. **Cell Metabolism**, vol. 17, no. 3, pp. 411–422, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2013.02.009>

DIELI, F.; TANIGUCHI, M.; KRONENBERG, M.; IONA, E.; OREFICI, G.; ALERNO, A. An anti-inflammatory role for V<sub>14</sub> NK T cells in Mycobacterium bovis bacillus CalmetteGuerin-infected mice. **J. Immunol.** 171:1961–1968, 2003. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.171.4.1961>

Diretrizes SBD (2014-2015) – Sociedade Brasileira de Diabetes. **Aplicação de insulina: dispositivos e técnica de aplicação.** Disponível em <<http://www.diabetes.org.br/profissionais/images/pdf/diabetes-tipo-1/002-Diretrizes-SBD-Applicacao-Insulina-pg219.pdf>> Acesso em 20 de junho de 2017.

Diretrizes SBD. (2015-2016) – Sociedade Brasileira de Diabetes / Milech A. et. al., OLIVEIRA, J.E.P.; S VENCIO, S. (Org.) - São Paulo: A.C. Farmacêutica, 2016. 348 p

DÖHNER H. et al. Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. **N Engl J Med**, 343(26):1910-6, 2000. <https://doi.org/10.1056/NEJM200012283432602>

EGGER, Gerda et al. Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. **Nature**, v. 429, n. 6990, p. 457-463, 2004. <https://doi.org/10.1038/nature02625>

EHSES, J. A. et al. Increased number of islet associated macrophages in type 2 diabetes. **Diabetes**, v. 56, n. 9, p. 2356-2370, 2007. <https://doi.org/10.2337/db06-1650>

EL-OSTA, A. et al. Transient high glucose causes persistent epigenetic changes and altered gene expression during subsequent normoglycemia. **J Exp Med.** v 205:2409–17, 2008. <https://doi.org/10.1084/jem.20081188>

ESTORNINHO, M.; et al. A novel approach to tracking antigen-experienced CD4 T cells into functional compartments via tandem deep and shallow TCR clonotyping. **J. Immunol.**, 191 pp. 5430-5440. 2013. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1300622>

FERREIRA, L. T., ABREU, L. C; SAVIOLLI, I. H., VALENTI, V. E. Diabetes melito: hiperglicemia crônica e suas complicações/Diabetes mellitus : hyperglycemia and its chronic complications. **Arquivos Brasileiros de Ciências da Saúde**, v.36, n. 3, p. 182-8, Set/Dez 2011. <https://doi.org/10.7322/abcs.v36i3.59>

FOURLANOS, S. et al. The rising incidence of type 1 diabetes is accounted for by cases with lower-risk human leukocyte antigen genotypes. **Diabetes Care**, v. 31, p. 1546–1549, 2008. <https://doi.org/10.2337/dc08-0239>

GEERLINGS, S. E.; HOEPELMAN, A. I. M. Immune dysfunction in patients with diabetes mellitus (DM), **FEMS Immunology & Medical Microbiology**, Vol. 26, p. 259–265 Dez 1999. [https://doi.org/10.1016/S0928-8244\(99\)00142-X](https://doi.org/10.1016/S0928-8244(99)00142-X)

GHIRALDINI, F.G.; SILVA, I.S.; MELLO, M.L.S. Polyploidy and chromatin remodeling in hepatocytes from insulin-dependent diabetic and normoglycemic aged mice. **Cytometry A** 81, 755–764. 2012. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.22102>

GODFREY, D.I.; HAMMOND, K.J.; POULTON, L.D.; SMYTH, M.J.; BAXTER, A.G. NKT cells: facts, functions and fallacies. **Immunol. Today.**, 21(11):573-83, 2000. [https://doi.org/10.1016/S0167-5699\(00\)01735-7](https://doi.org/10.1016/S0167-5699(00)01735-7)

GOMEZ-TOURINO, I.; ARIF, S.; EICHMANN, M.; PEAKMAN, M. T cells in type 1 diabetes: Instructors, regulators and effectors: A comprehensive review. **Journal of Autoimmunity**. Volume 66, Pages 7-16. January 2016.  
<https://doi.org/10.1016/j.jaut.2015.08.012>

GRUPO INTERDISCIPLINAR DE PADRONIZAÇÃO DA HEMOGLOBINA GLICADA – A1C. **Atualização sobre hemoglobina glicada (A1C) para avaliação do controle glicêmico e para o diagnóstico do diabetes: aspectos clínicos e laboratoriais**. 2009. Disponível em: <[www.sbpc.org.br/upload/conteudo/320110603170201.pdf](http://www.sbpc.org.br/upload/conteudo/320110603170201.pdf)>. Acesso em: 20 jan. 2015.

GUPTA, S.; KOIRALA, J.; KHARDORI R, KHARDORI N. Infections in diabetes mellitus and hyperglycemia. **Infect Dis Clin North Am**. Sep;21(3):617-38. 2007.  
<https://doi.org/10.1016/j.idc.2007.07.003>

GUO, H. et al. High frequency of activated natural killer and natural killer T-cells in patients with new onset of type 2 diabetes mellitus . **Exp Biol Med**, 237:556–62, 2012.  
<https://doi.org/10.1258/ebm.2012.011272>

GUYTON, A. C. e HALL, J. E. Diabetes melito. In: GUYTON, A. C. e HALL, J. E. **Tratado de Fisiologia Médica**, 11ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2006, pp. 972-977.

HARFORD, K. A. et al. Fats, inflammation and insulin resistance: insights to the role of macrophage and T-cell accumulation in adipose tissue. **Proceedings of the Nutrition Society**, vol. 70, no. 4, pp. 408–417, 2011. <https://doi.org/10.1017/S0029665111000565>

HAUSER, R.M.; HENSHALL, D.C.; LUBIN, F.D. The Epigenetics of Epilepsy and Its Progression. **Neuroscientist**. 2017 May 1:1073858417705840, 2017

HOGQUIST, A. K.; BALDWIN, T. A.; JAMESON, S.C. Central tolerance: learning self-control in the thymus. **Nature**. 5:772-81. 2005. <https://doi.org/10.1038/nri1707>

HOLLIDAY, Robin. Epigenetics: a historical overview. **Epigenetics**, v. 1, n. 2, p. 76-80, 2006. <https://doi.org/10.4161/epi.1.2.2762>

HOTAMISLIGIL, G.S. Inflammation and metabolic disorders. **Nature** 444, 860–867. 2006. <https://doi.org/10.1038/nature05485>

HU, T.; GIMFERRER, I.; ALBEROLA-ILA, J. Control of early stages in invariant natural killer T-cell development. **Immunology**. Volume 134, Issue 1, Version of Record online: 30 JUN 2011. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2011.03463.x>

IDF, International Diabetes Federation. **About Diabetes**. 2017. Disponível em: <<http://www.idf.org/about-diabetes>>. Acesso em: 02 fev. 2017.

IDF, International Diabetes Federation. **IDF Diabetes Atlas – 6<sup>th</sup> Edition**. 2014. Disponível em: <<http://www.idf.org/diabetesatlas/update-2014>>. Acesso em: 20 jan. 2015.

- IDF, International Diabetes Federation. **IDF Diabetes Atlas – 7<sup>th</sup> Edition**. 2015. Disponível em: <<http://www.diabetesatlas.org/resources/2015-atlas.html>>. Acesso em: 23 fev. 2017.
- IN'T VELD, P. Insulitis in human type 1 diabetes: the quest for an elusive lesion. **Islets**, v. 3, n. 4, p. 131-138, 2011. <https://doi.org/10.4161/isl.3.4.15728>
- JACOBSEN, L. M.; POSGAI, A.; SEAY, H. R. ; HALLER, M. J.; BRUSKO, T. M. T Cell Receptor Profiling in Type 1 Diabetes. **Curr Diab Rep** 17: 118. 2017. <https://doi.org/10.1007/s11892-017-0946-4>
- JAGANNATHAN-BOGDAN, M. et al., Elevated proinflammatory cytokine production by a skewed T cell compartment requires monocytes and promotes inflammation in type 2 diabetes. **Journal of Immunology**, vol. 186, no. 2, pp. 1162–1172, 2011. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1002615>
- JENUWEIN, T.; ALLIS, C. D. Translating the histone code. **Science**. 293(5532): p 1074-1080, 2001. <https://doi.org/10.1126/science.1063127>
- KAWAKAMI, K., N. YAMAMOTO, Y. KINJO, K. MIYAGI, C. NAKASONE, K. UEZU, T. KINJO, T. NAKAYAMA, M. TANIGUCHI, A. SAITO. Critical role of V<sub>14</sub> natural killer T cells in the innate phase of host protection against Streptococcus pneumoniae infection. **Eur. J. Immunol.** 33:3322–3330, 2003. <https://doi.org/10.1002/eji.200324254>
- KEATING, S. T.; EL-OSTA, A. Epigenetics and Metabolism. **Circulation Research**. 116:715-736, 2015. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.116.303936>
- KNIGHT, R.R.; et al. A distinct immunogenic region of glutamic acid decarboxylase 65 is naturally processed and presented by human islet cells to cytotoxic CD8 T cells. **Clin. Exp. Immunol.**, 179 (2015), pp. 100-107. 2015. <https://doi.org/10.1111/cei.12436>
- KOUZARIDES, T. Chromatin modifications and their function. **Cell** 2007;128:693–705. 2007. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.02.005>
- KORBEL, L., SPENCER J.D. Diabetes mellitus and infection: an evaluation of hospital utilization and management costs in the United States. **Journal of Diabetes and its Complications**. Vol. 29, P. 192-195, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.jdiacomp.2014.11.005>
- KREUZ, S.; FISCHLE, W. Oxidative stress signaling to chromatin in health and disease. **Epigenomics**, v. 8(6), p. 843–862, 2016. <https://doi.org/10.2217/epi-2016-0002>
- KRONENBERG, M.; GAPIN, L. The unconventional lifestyle of NKT cells. **Nat Rev Immunol.** 2(8):557-68, 2002. <https://doi.org/10.1038/nri854>
- KUMAR, B. K. et al. DNA Ploidy and S-phase Fraction Analysis in Paediatric B-cell Acute Lymphoblastic Leukemia Cases: a Tertiary Care Centre Experience. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, Vol 16, p. 7917-7922, 2015. <https://doi.org/10.7314/APJCP.2015.16.17.7917>

LANG, F. Hormones: Late Complications of Prolonged Hyperglycemia (Diabetes Mellitus ). In: SILBERNAGL, S.; LANG, F. **Color atlas of Pathophysiology**. New York: Thieme, 2000. p. 290-291.

LIU, E.; EISENBARTH, G.S. Type 1A diabetes mellitus -associated autoimmunity. **Endocrinol Metab Clin North Am** v. 31:391-410, 2002. [https://doi.org/10.1016/S0889-8529\(01\)00017-2](https://doi.org/10.1016/S0889-8529(01)00017-2)

MALLONE, R.; BREZAR, V.; BOITARD, C. T cell recognition of autoantigens in human type 1 diabetes: clinical perspectives. **Clin. Dev. Immunol.**, p. 513210. 2011. <https://doi.org/10.1155/2011/513210>

MARTINEZ, N. et al. Chromatin Decondensation and T Cell Hyperresponsiveness in Diabetes-Associated Hyperglycemia. **The Journal of Immunology** 193:4457-4468, September 2014. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1401125>

MATARESE G.; et al. Leptin accelerates autoimmune diabetes in female NOD mice. **Diabetes**. May;51(5):1356-61. 2002. <https://doi.org/10.2337/diabetes.51.5.1356>

McCARTHY, M.; MENZEL, S. The genetics of type 2 diabetes. **British Journal of Clinical Pharmacology**. 51(3):195-199. doi:10.1046/j.1365-2125.2001.00346.x, 2001. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2125.2001.00346.x>

McHEYZER-WILLIAMS, M.G. B cells as effectors. **Curr Opin Immunol** 15(3):354-61. 2003. [https://doi.org/10.1016/S0952-7915\(03\)00046-3](https://doi.org/10.1016/S0952-7915(03)00046-3)

MEDA, F.; FOLCI M.; BACCARELLI, A.; SELMI, C. The epigenetics of autoimmunity. **Cellular & Molecular Immunology**. v. 8, p 226–236, 2011. <https://doi.org/10.1038/cmi.2010.78>

MELLENDEZ-RAMIREZ, L.Y.; RICHARDS, R.J.; CEFALU, W.T. Complications of type 1 diabetes. **Endocrinology and Metabolism Clinics of North America**, v. 39, p. 625-40, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.ecl.2010.05.009>

MESQUITA JR. D, CRUVINEL WM, CÂMARA NOS, KÁLLAS EG, ANDRADE LEC. Autoimmune diseases in the TH17 era. **Braz J Med Biol Res** 2009; 42(6):476-486. 2009. <https://doi.org/10.1590/S0100-879X2009000600002>

MIAO, F. et al. Evaluating the role of epigenetic histone modifications in the metabolic memory of type 1 diabetes. **Diabetes**. v. 63, p. 1748–1762, 2014. <https://doi.org/10.2337/db13-1251>

MIAO, F. et al. Profiles of Epigenetic Histone Post-translational Modifications at Type 1 Diabetes Susceptible Genes. **J Biol Chem**. 287(20): 16335–16345. May 11, 2012 <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.330373>

MIAO, F.; GONZALO, I. G.; LANTING, L.; NATARAJAN, R. In vivo chromatin remodeling events leading to inflammatory gene transcription under diabetic conditions. **J Biol Chem**. Apr 23;279(17):18091-7. 2004. <https://doi.org/10.1074/jbc.M311786200>

- MIAO, F.; SMITH, D.D.; ZHANG, L.; MIN, A.; FENG, W.; NATARAJAN, R. Lymphocytes from patients with type 1 diabetes display a distinct profile of chromatin histone H3 lysine 9 dimethylation: an epigenetic study in diabetes. **Diabetes**, v. 57, n. 12, p. 3189-3198, 2008. <https://doi.org/10.2337/db08-0645>
- MIAO, F.; WU, X.; ZHANG, L.; YUAN, Y.C.; RIGGS, A. D.; NATARAJAN, R. Genome-wide analysis of histone lysine methylation variations caused by diabetic conditions in human monocytes. **J. Biol. Chem.**, v. 282, p. 13854-13863, 2007. <https://doi.org/10.1074/jbc.M609446200>
- MIGLIORE, L. et al. Preferential occurrence of chromosome 21 malsegregation in peripheral blood lymphocytes of Alzheimer disease patients **Cytogenet. Cell Genet.**, 87 pp. 41–46, 1999. <https://doi.org/10.1159/000015389>
- MULLER, L.M. et al. Increased risk of common infections in patients with type 1 and type 2 diabetes mellitus. **Clin Infect Dis**. 2005 Aug 1;41(3):281-8. Epub 2005. <https://doi.org/10.1086/431587>
- MURPHY, K.; TRAVERS, P.; WALPORT, M. **Imunobiologia de Janeway**. 7.ed. Porto Alegre: ArtMed, 2010. 908p.
- NISHIMURA, S. et al. CD8<sup>+</sup> effector T cells contribute to macrophage recruitment and adipose tissue inflammation in obesity. **Nature Medicine** volume15, pages 914–920. 2009. <https://doi.org/10.1038/nm.1964>
- ONENGUT-GUMUSCU, S.; CONCANNON, P. Mapping genes for autoimmunity in humans: type 1 diabetes as a model. **Immunol Rev**. 190:182-94, 2002. <https://doi.org/10.1034/j.1600-065X.2002.19014.x>
- OTTON, R. et al. Diabetes induces apoptosis in lymphocytes. **J Endocrinol**. 2004 Jul;182(1):145-56. <https://doi.org/10.1677/joe.0.1820145>
- PALMER, J. P.; ASPLIN, C. M.; CLEMONS, P.; LYEN, K.; TATPATI, O.; RAGHU, P. K.; PAQUETTE, T. L. Insulin antibodies in insulin-dependent diabetics before insulin treatment. **Science**, v. 222, p.1337-1339, 1983. <https://doi.org/10.1126/science.6362005>
- PARKIN, J.; COHEN, B. An overview of the immune system. **Lancet**. v. 357: 1777-89, 2001. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(00\)04904-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(00)04904-7)
- PELEG, A.Y., WEERARATHNA, T., MCCARTHY, J.S., DAVIS, T.M. Common infections in diabetes: Pathogenesis, management and relationship to glycaemic control. **Diabetes Metab Res Rev**. 2007;23:3–13. <https://doi.org/10.1002/dmrr.682>
- PEREIRA, C. S. et al. DNA damage and cytotoxicity in adult subjects with prediabetes. **Mutation Research** 753 p. 76– 81, 2013 <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2013.02.002>
- QUADROS, A.S., LEITE, R. S., BERTOLUCI, M., DURO, K., SCHMIDT, A., DE LUCCA, G.J., et al. Angiographic coronary artery disease is associated with progressively higher levels of fasting plasma glucose. **Diabetes Res Clin Pract**.75(2):207-13, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.diabres.2006.06.003>

RAZ, I. et al. Personalized management of hyperglycemia in type 2 diabetes: reflections from a Diabetes Care Editors' Expert Forum. **Diabetes Care**. 36(6):1779–88, 2013. <https://doi.org/10.2337/dc13-0512>

RUDIN, C.M.; THOMPSON, C.B. B-Cell Development and Maturation. **Seminar in Oncology** 1998; 25(4):435-46. 1998.

SALMINEN, K.K. et al. Isolation of enterovirus strains from children with preclinical Type 1 diabetes. **Diabet Med** v. 21:156-64, 2004. <https://doi.org/10.1111/j.1464-5491.2004.01097.x>

SCHONES, D. E.; LEUNG, A.; NATARAJAN, R.. Chromatin Modifications Associated With Diabetes and Obesity. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**. May 25, 2015. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.115.305041>

SESTERHEIN, P; SAI TOVITCH, D.; STAUB, H.L. Type 1 diabetes mellitus : multifactors that confer susceptibility to the autoimmune pathogenesis. **Scientia Medica**, Porto Alegre, v. 17, n. 4, p. 212-217, out./dez. 2007.

SEXTON, T.; SCHOBER, H.; FRASER, P.; GASSER, S. M. Gene regulation through nuclear organization. **Nature Structural & Molecular Biology** 14, November 2007. 1049 – 1055 pp. <https://doi.org/10.1038/nsmb1324>

SIMAR, D.; VERSTEYHE, S.; DONKIN, I.; LIU, J.; HESSON, L.; NYLANDER, V.; FOSSUM, A.; BARRÈS, R. DNA methylation is altered in B and NK lymphocytes in obese and type 2 diabetic human. **Metabolism**. v. 63(9):1188-97. sep 2014. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2014.05.014>

SUMITA, N.M.; ANDRIOLO, A. Importância da hemoglobina glicada no controle do diabetes mellitus e na avaliação de risco das complicações crônicas. **Jornal Brasileiro de Medicina Laboratorial**. v. 44, p. 169-174, 2008. <https://doi.org/10.1590/S1676-24442008000300003>

SUNG, H. Y. et al. Aberrant epigenetic regulation of GABRP associates with aggressive phenotype of ovarian cancer. **Exp Mol Med**. 2017 May 19;49(5):e335. doi: 10.1038/emm.2017.62. 2017. <https://doi.org/10.1038/emm.2017.62>

SZABLEWSKI, L. Role of immune system in type 1 diabetes mellitus pathogenesis. **Int Immunopharmacol**. Sep;22(1):182-91. 2014. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2014.06.033>

THAKUR, M. K.; ASAITHAMBI, A.; MUKHERJEE, S. Sex-specific alterations in chromatin conformation of the brain of aging mouse. **Molecular Biology Reports** 26: 239–247, 1999. <https://doi.org/10.1023/A:1007042321521>

THE INTERNATIONAL EXPERT COMMITTEE. International Expert Committee report on the role of the A1C assay in the diagnosis of diabetes. **Diabetes Care**, v. 32, n. 7, p. 1327-1334, 2009. <https://doi.org/10.2337/dc09-9033>

UK PROSPECTIVE DIABETES STUDY GROUP. Intensive blood glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes. **Lancet**, v. 352, p. 837-53, 1998.

[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(98\)07019-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(98)07019-6)

VILLENEUVE, L.M.; NATARAJAN, R. The role of epigenetics in the pathology of diabetic complications. **Am J Physiol Renal Physiol**, v. 299, n. 1, p. 14-25, 2010.

<https://doi.org/10.1152/ajprenal.00200.2010>

VILLENEUVE, L.M.; REDDY, M.A.; LANTING, L.L.; WANG, M.; MENG, L.; NATARAJAN, R. Epigenetic histone H3 lysine 9 methylation in metabolic memory and inflammatory phenotype of vascular smooth muscle cells in diabetes. **PNAS**, v. 105, n. 26, p. 9047-9052, 2008.

<https://doi.org/10.1073/pnas.0803623105>

VILLENEUVE, L.M.; REDDY, M.A.; NATARAJAN, R. Epigenetics: Deciphering its role in Diabetes and its Chronic Complications. **Clin Exp Pharmacol Physiol**, v. 38, n. 7, p. 401-409, 2011.

<https://doi.org/10.1111/j.1440-1681.2011.05497.x>

VOMUND, A.N.; et al. Beta cells transfer vesicles containing insulin to phagocytes for presentation to T cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, 112 (2015), pp. E5496-E5502.

2015. <https://doi.org/10.1073/pnas.1515954112>

WANG, H. et al. Purification and functional characterization of a histone H3-lysine 4-specific methyltransferase. **Molecular cell**, v. 8, n. 6, p. 1207-1217, 2001.

[https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(01\)00405-1](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(01)00405-1)

WEDGWOOD, K.C.A.; RICHARDSON, S.J.; MORGAN, N.G.; TSANEVA-ATANASOVA, K. Spatiotemporal Dynamics of Insulinitis in Human Type 1 Diabetes. **Frontiers in Physiology**, v. 7, n. 633, p. 1-22, 2016.

<https://doi.org/10.3389/fphys.2016.00633>

WEINBERG J. B. **Mononuclear phagocytes**. In LEE, G. R.; Foerster, J.; Lukens, J.; Paraskevas, F.; Greer, J. P.; Rodgers, G. M., editors. **Wintrobe's clinical hematology**. 10th ed. Vol. 1. Philadelphia: Williams & Wilkins; 1998. pags. 377-383

WHO, World Health Organization. 2016. **Global report on diabetes**. 1. Diabetes Mellitus – epidemiology. 2. Diabetes Mellitus – prevention and control. 3. Diabetes, Gestational. 4. Chronic Disease. 5. Public Health. I. World Health Organization.

Disponível em <

[http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/204871/1/9789241565257\\_eng.pdf](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/204871/1/9789241565257_eng.pdf) > Último acesso em 22 de fevereiro de 2017.

WHO, World Health Organization. **Definition and diagnosis of diabetes mellitus and intermediate hyperglycemia: report of a WHO/IDF consultation**. 2006. Disponível em: <[http://www.who.int/diabetes/publications/diagnosis\\_diabetes2006/en/](http://www.who.int/diabetes/publications/diagnosis_diabetes2006/en/)>. Acesso em: 20 jan. 2015.

WHO, World Health Organization. **Diabetes health topic**. 2015a. Disponível em: <[http://www.who.int/topics/diabetes\\_mellitus/en/](http://www.who.int/topics/diabetes_mellitus/en/)>. Acesso em: 15 jan. 2015.

WHO, World Health Organization. **Diabetes Programme**. 2017. Disponível em: <[http://www.who.int/topics/diabetes\\_mellitus/en/](http://www.who.int/topics/diabetes_mellitus/en/)> Acesso em 27 de set. 2017.

WHO, World Health Organization. **Media centre. Diabetes**. 2015b. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/en/>>. Acesso em: 31 jan. 2015.

WHO. World Health Organization 2011. Use of Glycated Haemoglobin (HbA1c) in the Diagnosis of Diabetes Mellitus . Abbreviated Report of a WHO Consultation. Disponível em < [http://www.who.int/diabetes/publications/report-HbA1c\\_2011.pdf](http://www.who.int/diabetes/publications/report-HbA1c_2011.pdf)>

WINER, D.A.; WINER, S.; SHEN, L.; WADIA, P.P.; YANTHA, J.; PALTSER, G.; et al. B cells promote insulin resistance through modulation of T cells and production of pathogenic IgG antibodies. **Nat Med**. 17:610–7. 2011. <https://doi.org/10.1038/nm.2353>

WOLFFE, A. P.; GUSCHIN, D. Chromatin structural features and targets that regulate transcription. **Journal of Structural Biology**, Amsterdam, v. 129, p. 102–122, 2000. <https://doi.org/10.1006/jsbi.2000.4217>

YEBOAH, J.; BERTONI, A.G.; HERRINGTON, D.M.; POST, W.S.; BURKE, G.L. Impaired fasting glucose and the risk of incident *Diabetes* mellitus and cardiovascular events in an adult population: The Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 58, n. 2, p. 140-146, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2011.03.025>

XIA, C.; RAO, X.; ZHONG, J. Role of T lymphocytes in type 2 diabetes and diabetes-associated inflammation . **Journal of Diabetes Research**. Vol. 2017. Article ID 6494795. 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/6494795>

XU, H. et al. Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. **J. Clin. Invest**. 112, 1821–1830. 2003. <https://doi.org/10.1172/JCI200319451>

ZAID, H. et al. Insulin action on glucose transporters through molecular switches, tracks and tethers, **The Biochemical Journal**, vol. 413, no. 2, pp. 201–215, 2008. <https://doi.org/10.1042/BJ20080723>

ZANG, L. et al. Mesenchymal stem cell therapy in type 2 diabetes mellitus . **Diabetol Metab Syndr**. 2017 May 15;9:36. doi: 10.1186/s13098-017-0233-1. eCollection 2017. <https://doi.org/10.1186/s13098-017-0233-1>

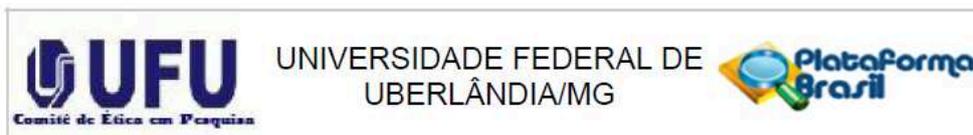
ZHOU, X.; SHENTU, P.; XU, Y. Spatiotemporal Regulators for Insulin-Stimulated GLUT4 Vesicle Exocytosis. **Hindawi Journal of Diabetes Research** Volume 2017, Article ID 1683678, 9 pages, 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/1683678>

ZIMMET, P.; ALBERTI, K.G.; SHAW, J. Global and societal implications of the diabetes epidemic. **Nature**, v. 414, n. 6865, p. 782-787, 2001. <https://doi.org/10.1038/414782a>

ZIMERING, M.B; PAN, Z. Autoantibodies in type 2 diabetes induce stress fiber formation and apoptosis in endothelial cells. **J Clin Endocrinol Metab** 94:2171–2177. 2009. <https://doi.org/10.1210/jc.2008-2354>

ZIVKOVIĆ, L. et al. Analysis of premature centromere division (PCD) of the chromosome 18 in peripheral blood lymphocytes in Alzheimer disease patients. **Mech Ageing Dev.** ;127(12):892-6, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.mad.2006.09.004>

## ANEXO A - Parecer Consubstanciado do CEP



## PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

## DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Pesquisa de alterações na organização da cromatina de células mononucleares do sangue periférico de pacientes diabéticos

**Pesquisador:** Alberto da Silva Moraes

**Área Temática:**

**Versão:** 2

**CAAE:** 47655615.6.0000.5152

**Instituição Proponente:** Instituto de Ciências Biomédicas

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

## DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 1.227.701

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Declaração de Pesquisadores	Termo de compromisso da equipe executora.pdf	24/07/2015 14:08:41		Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Declaração da Instituição co-Participante.pdf	24/07/2015 14:09:38		Aceito
Outros	Solicitacao_do_pesquisador_para_a_instituicao.pdf	24/07/2015 14:11:22		Aceito
Outros	Curriculos lattes.docx	24/07/2015 14:12:40		Aceito
Outros	Instrumento de coleta de dados.doc	24/07/2015 14:13:28		Aceito
Folha de Rosto	Folha de rosto.pdf	24/07/2015 14:14:52		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de	Termos_de_Consentimento_Livre_e_Esclarecido_corrigido.doc	09/09/2015 11:07:02	Alberto da Silva Moraes	Aceito
Ausência	Termos_de_Consentimento_Livre_e_Esclarecido_corrigido.doc	09/09/2015 11:07:02	Alberto da Silva Moraes	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETO_DE_PESQUISA_CEP_corrigido.doc	09/09/2015 11:07:25	Alberto da Silva Moraes	Aceito
Outros	Carta_resposta__pendencias.doc	09/09/2015 11:11:03	Alberto da Silva Moraes	Aceito
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_558876.pdf	09/09/2015 11:11:50		Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

UBERLANDIA, 14 de Setembro de 2015

Assinado por:

Sandra Terezinha de Farias Furtado  
(Coordenador)

**ANEXO B - Instrumento de coleta de dados****Protocolo de avaliação dos pacientes com diabetes e grupo controle****IDENTIFICAÇÃO**

Paciente número: \_\_\_\_\_

Data da entrevista \_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_

Data de nascimento \_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_

Sexo

 Masculino  Feminino**TEMPO DE DIAGNÓSTICO DO DIABETES:** \_\_\_\_\_ anos**HISTÓRIA FAMILIAR** Diabetes Outros: \_\_\_\_\_**COMORBIDADES** Hipertensão arterial Obesidade Outras \_\_\_\_\_**COMPLICAÇÕES DO DIABETES** Retinopatia Nefropatia Pé diabético Doença aterosclerótica: Coronariopatia ou IAM prévio, AVE, Carótida, Doença arterial periférica**TRATAMENTO DO DIABETES: DM1** Insulina NPH Insulina glargina Insulina detemir Insulina regular Insulina ultrarrápida

**TRATAMENTO DO DIABETES: DM2**

- ( ) Só dieta
- ( ) Medicamento oral
- ( ) Medicamento oral + insulina
- ( ) Só insulina

**Questionário Internacional de atividade física (IPAQ) – versão curta**

As perguntas estão relacionadas ao tempo que você gasta fazendo atividade física na **ÚLTIMA** semana. As perguntas incluem as atividades que você faz no trabalho, para ir de um lugar a outro, por lazer, por esporte, por exercício ou como parte das suas atividades em casa ou no jardim. Suas respostas são **MUITO** importantes. Por favor, responda cada questão mesmo que considere que não seja ativo.

Para responder as questões lembre que:

- atividades físicas **VIGOROSAS** são aquelas que precisam de um grande esforço físico e que fazem respirar **MUITO** mais forte que o normal
- atividades físicas **MODERADAS** são aquelas que precisam de algum esforço físico e que fazem respirar **UM POUCO** mais forte que o normal

Para responder as perguntas pense somente nas atividades que você realiza **por pelo menos 10 minutos contínuos** de cada vez.

**1a** Em quantos dias da última semana você **CAMINHOU** por pelo menos 10 minutos contínuos em casa ou no trabalho, como forma de transporte para ir de um lugar para outro, por lazer, por prazer ou como forma de exercício?

dias \_\_\_\_\_ por **SEMANA** ( ) Nenhum

**1b** Nos dias em que você caminhou por pelo menos 10 minutos contínuos quanto tempo no total você gastou caminhando **por dia**?

horas: \_\_\_\_\_ Minutos: \_\_\_\_\_ **2a.** Em quantos dias da última semana, você realizou atividades **MODERADAS** por pelo menos 10 minutos contínuos, como por exemplo pedalar leve na bicicleta, nadar, dançar, fazer ginástica aeróbica leve, jogar vôlei recreativo, carregar pesos leves, fazer serviços domésticos na casa, no quintal ou no jardim como varrer, aspirar, cuidar do jardim, ou qualquer atividade que fez aumentar **moderadamente** sua respiração ou batimentos do coração (POR FAVOR NÃO INCLUA CAMINHADA)

dias \_\_\_\_\_ por **SEMANA** ( ) Nenhum

**2b.** Nos dias em que você fez essas atividades moderadas por pelo menos 10 minutos contínuos, quanto tempo no total você gastou fazendo essas atividades **por dia**?

horas: \_\_\_\_\_ Minutos: \_\_\_\_\_

**3a** Em quantos dias da última semana, você realizou atividades **VIGOROSAS** por pelo menos 10 minutos contínuos, como por exemplo correr, fazer ginástica aeróbica, jogar futebol, pedalar rápido na bicicleta, jogar basquete, fazer serviços domésticos pesados em casa, no quintal ou cavoucar no jardim, carregar pesos elevados ou qualquer atividade que fez aumentar **MUITO** sua respiração ou batimentos do coração.

dias \_\_\_\_\_ por **SEMANA** ( ) Nenhum

**3b** Nos dias em que você fez essas atividades vigorosas por pelo menos 10 minutos contínuos quanto tempo no total você gastou fazendo essas atividades **por dia**?

horas: \_\_\_\_\_ Minutos: \_\_\_\_\_

Estas últimas perguntas são em relação ao tempo que você gasta sentado ao todo no trabalho, em casa, na escola ou faculdade e durante o tempo livre. Isto inclui o tempo que você gasta sentado no escritório ou estudando, fazendo lição de casa, visitando amigos, lendo e sentado ou deitado assistindo televisão.

**4a.** Quanto tempo no total você gasta sentado durante um **dia de semana**?

\_\_\_\_\_ horas \_\_\_\_ minutos

**4b.** Quanto tempo no total você gasta sentado durante em um **dia de final de semana**?

\_\_\_\_\_ horas \_\_\_\_ minutos

#### **Dados de exame físico**

**Altura:** \_\_\_\_\_

**Peso:** \_\_\_\_\_

**IMC:** \_\_\_\_\_

**EXAMES LABORATORIAIS: Data da coleta:** \_\_\_\_\_

Glicemia de jejum: \_\_\_\_\_

HbA1c: \_\_\_\_\_

**ANEXO C – Termos de Consentimento Livre e Esclarecido**  
**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – GRUPO 1**

Prezado(a) participante,

Você está sendo convidado para participar da “Pesquisa de alterações na organização da cromatina de células mononucleares do sangue periférico de pacientes portadores de diabetes”, sob a responsabilidade dos pesquisadores Vanessa Carla de Souza Pereira, Prof. Dr. Alberto da Silva Moraes, Prof. Dr. Paulo Tannus Jorge, Dra. Maria Luiza Mendonça Pereira Jorge. Você foi selecionado por fazer parte do grupo de pacientes portadores de *Diabetes mellitus* tipo 1. E sua participação não é obrigatória.

Nesta pesquisa nós estamos buscando entender se o diabetes altera algumas características genéticas de algumas células de defesa do organismo, comparando os resultados com os de indivíduos não portadores de diabetes. Sua participação nesta pesquisa consistirá em doar uma amostra de 25 mL de sangue periférico para dosagem de glicose, hemoglobina glicada e análise do conteúdo do núcleo das células.

Os objetivos deste estudo são: Avaliar se os níveis de glicose e hemoglobina glicada estão associados ao grau de compactação da cromatina e sua distribuição e avaliar alterações no conteúdo de DNA.

O Termo de consentimento Livre e Esclarecido será obtido pela pesquisadora Vanessa Carla de Souza Pereira e a amostra de sangue será coletada após ser solicitada na consulta ambulatorial ou hospitalar devendo ser colhida no Laboratório de Análises Clínicas ou no Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia.

Na sua participação você será submetido à coleta de sangue periférico (25 mL). Após a coleta de sangue serão dosados níveis de glicose e de hemoglobina glicada. Esses exames irão verificar o índice glicêmico atual e avaliar o controle glicêmico sendo estes valores correlacionados às análises das células de defesa do seu organismo.

Os riscos consistem somente na coleta do sangue, que será mínimo (incômodo ou desconforto no momento da coleta da amostra, ou hematoma no local da punção), uma vez que será coletado por profissional experiente do Laboratório de Análises Clínicas do Hospital de Clínicas da UFU. O risco de que você seja identificado será minimizado, pois sua privacidade será respeitada, ou seja, seu nome ou qualquer outro dado ou elemento que possa, de qualquer forma, o identificar, será mantido em sigilo. Não serão utilizadas identificações como as iniciais do seu nome, sua identificação será por um número no instrumento de coleta de dados e nos tubos que serão coletadas as amostras, garantindo assim o sigilo da sua identidade em todas as etapas da pesquisa. Os benefícios serão o monitoramento do seu nível glicêmico atual e estimado há três meses, o que é muito importante para sua qualidade de

vida. Indiretamente você também estará contribuindo para a produção de conhecimento científico e para o melhor entendimento sobre o *Diabetes mellitus*.

Os resultados da pesquisa serão publicados e ainda assim a sua identidade será preservada. Você não terá nenhum gasto e ganho financeiro por participar na pesquisa.

Você é livre para deixar de participar da pesquisa a qualquer momento sem nenhum prejuízo ou coação. Uma cópia deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido ficará com você.

Qualquer dúvida a respeito da pesquisa, você poderá entrar em contato com: Dr. Alberto da Silva Moraes, (34) 32918481 ramal 30, albertomoraes@icbim.ufu.br, Vanessa Carla de Souza Pereira, (34) 3218-2375, vanessacsp@mestrado.ufu.br, Dr. Paulo Tannus Jorge, (34) 3218-2246, pauloj@prove.com.br, Dra. Maria Luiza Mendonça Pereira Jorge, (34) 3218-2246, mlfernandes@ufu.br. Endereço profissional: Hospital das Clínicas de Uberlândia, Av. Pará, nº 1.720, Bairro Umuarama, CEP 38405-320. Poderá também entrar em contato com o Comitê de Ética na Pesquisa com Seres-Humanos – Universidade Federal de Uberlândia: Av. João Naves de Ávila, nº 2121, bloco A, sala 224, Campus Santa Mônica – Uberlândia –MG, CEP: 38408-100; fone: 34-3239-4131.

Uberlândia, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 201\_\_.

---

Assinatura dos pesquisadores

Eu aceito participar do projeto citado acima, voluntariamente, após ter sido devidamente esclarecido.

---

Participante da pesquisa

## TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – GRUPO 2

Prezado(a) participante,

Você está sendo convidado para participar da “Pesquisa de alterações na organização da cromatina de células mononucleares do sangue periférico de pacientes portadores de diabetes”, sob a responsabilidade dos pesquisadores Vanessa Carla de Souza Pereira, Prof. Dr. Alberto da Silva Moraes, Prof. Dr. Paulo Tannus Jorge, Dra. Maria Luiza Mendonça Pereira Jorge. Você foi selecionado por fazer parte do grupo de pacientes portadores de *Diabetes mellitus* tipo 2. E sua participação não é obrigatória.

Nesta pesquisa nós estamos buscando entender se o diabetes altera algumas características genéticas de algumas células de defesa do organismo, comparando os resultados com os de indivíduos não portadores de diabetes. Sua participação nesta pesquisa consistirá em doar uma amostra de 25 mL de sangue periférico para dosagem de glicose, hemoglobina glicada e análise do conteúdo do núcleo das células.

Os objetivos deste estudo são: Avaliar se os níveis de glicose e hemoglobina glicada estão associados ao grau de compactação da cromatina e sua distribuição e avaliar alterações no conteúdo de DNA.

O Termo de consentimento Livre e Esclarecido será obtido pela pesquisadora Vanessa Carla de Souza Pereira e a amostra de sangue será coletada após ser solicitada na consulta ambulatorial ou hospitalar devendo ser colhida no Laboratório de Análises Clínicas ou no Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia.

Na sua participação você será submetido à coleta de sangue periférico (25mL). Após a coleta de sangue serão dosados níveis de glicose e de hemoglobina glicada. Esses exames irão verificar o índice glicêmico atual e avaliar o controle glicêmico sendo estes valores correlacionados às análises das células de defesa do seu organismo.

Os riscos consistem somente na coleta do sangue, que será mínimo (incômodo ou desconforto no momento da coleta da amostra, ou hematoma no local da punção), uma vez que será coletado por profissional experiente do Laboratório de Análises Clínicas do Hospital de Clínicas da UFU. O risco de que você seja identificado será minimizado, pois sua privacidade será respeitada, ou seja, seu nome ou qualquer outro dado ou elemento que possa, de qualquer forma, o identificar, será mantido em sigilo. Não serão utilizadas identificações como as iniciais do seu nome, sua identificação será por um número no instrumento de coleta de dados e nos tubos que serão coletadas as amostras, garantindo assim o sigilo da sua identidade em todas as etapas da pesquisa. Os benefícios serão o monitoramento do seu nível glicêmico atual e estimado há três meses, o que é muito importante para sua qualidade de vida. Indiretamente você também estará contribuindo para a produção de conhecimento científico e para o melhor entendimento sobre o *Diabetes mellitus*.

Os resultados da pesquisa serão publicados e ainda assim a sua identidade será preservada. Você não terá nenhum gasto e ganho financeiro por participar na pesquisa.

Você é livre para deixar de participar da pesquisa a qualquer momento sem nenhum prejuízo ou coação. Uma cópia deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido ficará com você.

Qualquer dúvida a respeito da pesquisa, você poderá entrar em contato com: Dr. Alberto da Silva Moraes, (34) 32918481 ramal 30, albertomoraes@icbim.ufu.br, Vanessa Carla de Souza Pereira, (34) 3218-2375, vanessacsp@mestrado.ufu.br, Dr. Paulo Tannus Jorge, (34) 3218-2246, pauloj@prove.com.br, Dra. Maria Luiza Mendonça Pereira Jorge, (34) 3218-2246, mlfernandes@ufu.br. Endereço profissional: Hospital das Clínicas de Uberlândia, Av. Pará, nº 1.720, Bairro Umuarama, CEP 38405-320. Poderá também entrar em contato com o Comitê de Ética na Pesquisa com Seres-Humanos – Universidade Federal de Uberlândia: Av. João Naves de Ávila, nº 2121, bloco A, sala 224, Campus Santa Mônica – Uberlândia –MG, CEP: 38408-100; fone: 34-3239-4131.

Uberlândia, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 201\_\_.

---

Assinatura dos pesquisadores

Eu aceito participar do projeto citado acima, voluntariamente, após ter sido devidamente esclarecido.

---

Participante da pesquisa

## TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO - GRUPO CONTROLE

Prezado(a) participante,

Você está sendo convidado para participar da “Pesquisa de alterações na organização da cromatina de células mononucleares do sangue periférico de pacientes portadores de diabetes”, sob a responsabilidade dos pesquisadores Vanessa Carla de Souza Pereira, Prof. Dr. Alberto da Silva Moraes, Prof. Dr. Paulo Tannus Jorge, Dra. Maria Luiza Mendonça Pereira Jorge. Você foi selecionado para fazer parte do grupo controle de pacientes que não possuem até o momento diagnóstico *Diabetes mellitus* tipo 1 ou 2 ou insipidus e sua participação não é obrigatória.

Nesta pesquisa nós estamos buscando entender se o diabetes altera algumas características genéticas de algumas células de defesa do organismo, comparando os resultados com os de indivíduos não portadores de diabetes. Sua participação nesta pesquisa consistirá em doar uma amostra de 25 mL de sangue periférico para dosagem de glicose, hemoglobina glicada e análise do conteúdo do núcleo das células.

Os objetivos deste estudo são: Avaliar se os níveis de glicose e hemoglobina glicada estão associados ao grau de compactação da cromatina e sua distribuição e avaliar alterações no conteúdo de DNA.

O Termo de consentimento Livre e Esclarecido será obtido pela pesquisadora Vanessa Carla de Souza Pereira e a amostra de sangue será coletada após ser solicitada na consulta ambulatorial ou hospitalar devendo ser colhida no Laboratório de Análises Clínicas ou no Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia.

Na sua participação você será submetido à coleta de sangue periférico (25 mL). Após a coleta de sangue serão dosados níveis de glicose e de hemoglobina glicada. Esses exames irão verificar o índice glicêmico atual e avaliar o controle glicêmico sendo estes valores correlacionados às análises das células de defesa do seu organismo.

Os riscos consistem somente na coleta do sangue, que será mínimo (incômodo ou desconforto no momento da coleta da amostra, ou hematoma no local da punção), uma vez que será coletado por profissional experiente do Laboratório de Análises Clínicas do Hospital de Clínicas da UFU. O risco de que você seja identificado será minimizado, pois sua privacidade será respeitada, ou seja, seu nome ou qualquer outro dado ou elemento que possa, de qualquer forma, o identificar, será mantido em sigilo. Não serão utilizadas identificações como as iniciais do seu nome, sua identificação será por um número no instrumento de coleta de dados e nos tubos que serão coletadas as amostras, garantindo assim o sigilo da sua identidade em todas as etapas da pesquisa. Os benefícios serão o monitoramento do seu nível glicêmico atual e estimado há três meses, o que é muito importante para sua qualidade de vida. Indiretamente você também estará contribuindo para a produção de conhecimento científico e para o melhor entendimento sobre o *Diabetes mellitus*.

Os resultados da pesquisa serão publicados e ainda assim a sua identidade será preservada. Você não terá nenhum gasto e ganho financeiro por participar na pesquisa.

Você é livre para deixar de participar da pesquisa a qualquer momento sem nenhum prejuízo ou coação. Uma cópia deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido ficará com você.

Qualquer dúvida a respeito da pesquisa, você poderá entrar em contato com: Dr. Alberto da Silva Moraes, (34) 32918481 ramal 30, albertomoraes@icbim.ufu.br, Vanessa Carla de Souza Pereira, (34) 3218-2375, vanessacsp@mestrado.ufu.br, Dr. Paulo Tannus Jorge, (34) 3218-2246, pauloj@prove.com.br, Dra. Maria Luiza Mendonça Pereira Jorge, (34) 3218-2246, mlfernandes@ufu.br. Endereço profissional: Hospital das Clínicas de Uberlândia, Av. Pará, nº 1.720, Bairro Umuarama, CEP 38405-320. Poderá também entrar em contato com o Comitê de Ética na Pesquisa com Seres-Humanos – Universidade Federal de Uberlândia: Av. João Naves de Ávila, nº 2121, bloco A, sala 224, Campus Santa Mônica – Uberlândia –MG, CEP: 38408-100; fone: 34-3239-4131.

Uberlândia, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 201\_\_.

---

Assinatura dos pesquisadores

Eu aceito participar do projeto citado acima, voluntariamente, após ter sido devidamente esclarecido.

---

Participante da pesquisa