

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

VINÍCIUS DE OLIVEIRA GERALDO

AVALIAÇÃO DE ALTERAÇÕES ESTRUTURAIS NA CROMATINA DE
MONÓCITOS DE SANGUE PERIFÉRICO ASSOCIADAS AO
DIABETES HUMANO

Uberlândia -MG

Março, 2022

VINÍCIUS DE OLIVEIRA GERALDO

AVALIAÇÃO DE ALTERAÇÕES ESTRUTURAIS NA CROMATINA DE
MONÓCITOS DE SANGUE PERIFÉRICO ASSOCIADAS AO
DIABETES HUMANO

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
ao Instituto de Ciências Biomédicas da
Universidade Federal de Uberlândia como
requisito para obtenção do título de Bacharel
em Biomedicina.

Orientador: Prof. Dr. Alberto da Silva Moraes.

Uberlândia -MG

Março, 2022

VINÍCIUS DE OLIVEIRA GERALDO

**AVALIAÇÃO DE ALTERAÇÕES ESTRUTURAIS NA CROMATINA DE
MONÓCITOS DE SANGUE PERIFÉRICO ASSOCIADAS AO
DIABETES HUMANO**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
ao Instituto de Ciências Biomédicas da
Universidade Federal de Uberlândia como
requisito para obtenção do título de Bacharel
em Biomedicina.

Orientador: Prof. Dr. Alberto da Silva Moraes.

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Alberto da Silva Moraes

Dra. Aline Alves da Silva

Ma. Fernanda Busnardo de Oliveira

Uberlândia –MG

2022

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Altair e Maria Inês, que são os que verdadeiramente me sustentaram em todos os momentos, nos altos e baixos e quem sem eles não seria possível chegar até aqui. Por todo o amor, carinho, conselhos e conversas. Por me ouvirem e sentir que mesmo longe, vocês estavam comigo para o que der e vier.

A minha irmã, Deborah, a minha “queridaaaaa”, que me influenciou a seguir na área da saúde, uma mulher incrível que admiro muito e uma enfermeira brilhante. Obrigado por todo amor, por todas as risadas, pelos conselhos inteligentíssimos e força que você me deu de longe e agora perto de mim.

A biomédica Vanessa, ao trabalho prévio que garantiu que eu teria amostras para realizar este trabalho. E também, por todo carinho, apoio, conversas e ensinamentos nesta área que a gente é apaixonado, as análises clínicas.

A biomédica Andrielle, que juntamente com a Vanessa me forneceu os materiais e técnicas para executar este trabalho.

Ao professor Dr. Alberto por ter me orientado praticamente desde o início da graduação, tanto neste trabalho, como em outros em que colaborei. Por todos os ensinamentos, conselhos, apoio e muita compreensão.

A biomédica Dra. Aline, por ter me ensinado tudo e mais um pouco, por ter me ensinado sobre soluções e diluições. Obrigado por ter aceito o convite para participar da banca e agradeço também por ser sempre um amor comigo todas as vezes que me vê.

A biomédica Ma. Fernanda, minha veterana muito querida, obrigado por ter aceito o convite para participar da banca.

Aos meus amigos de longa data, Janaira, Safira, Kimberly, Letícia, Pedro e Erick. Obrigado por todas as risadas, memes, apoio, conversas, conselhos mesmo que geograficamente cada um esteja longe uns dos outros.

A minha querida amiga, Carol. Obrigado por me salvar em todos os momentos difíceis. Obrigado por celebrar comigo os momentos gloriosos. Você estava em todos os momentos e não há palavras pra descrever o quanto sinto amado por você. Te amo maioral!

A minha querida amiga, Kellen. Obrigado por sempre ser tão carinhosa, amorosa e cuidar de mim sempre. Não mediou esforços para me ajudar sempre que precisei e até quando nem precisava, você estava lá. Te amo amiga.

A dupla de mulheres mais lindas da biotec, Duda e Gaby. Obrigado meninas, vocês são muito amorosas e sempre me ajudaram tanto. Eu só tenho a agradecer por ter conhecido vocês e estarem até hoje na minha vida.

As minhas queridas amigas Marina, Shiraz, Bárbara, Juliana, Letícia, Sara e Ale. Obrigado meninas por essa linda amizade que temos e por serem tão amorosas comigo. Eu tenho muito orgulho de todas, profunda admiração e memórias incríveis com cada uma ou às vezes com todas ao mesmo tempo! Amo vocês!

A minha amiga Izabella Clara, por não ter deixado eu “chutar o balde” e ter sido essencial para vencer a reta final da graduação. Sou muito grato e muito obrigado por todo carinho e força que você me deu. Não existe pessoa no mundo que tenha a garra e as mais belas unhas que essa mulher!

A minha amiga Danilo, ela que entrega close, entrega ciência e entrega luta LGBTQIA+. Obrigado pelas conversas, pelas “panicações” nos doces, pelos rolês icônicos, por todo o carinho e assistência. Sucesso gata, você vai longe! E aproveitando esse momento, para agradecer a todos os meus amigxs que fazem parte da comunidade. A amizade de vocês fez com que eu me sentisse pela primeira vez o mais livre para ser quem eu era sem medos, sem julgamentos.

As minhas colegas de laboratório, Nath e Chris, que me ajudaram durante todo o tempo que estive no laboratório. Muito obrigado!

Aos meus amigos e professores do Centro de Línguas da UFU - CELIN, Natália, Izaaque, Sara, Geovanna, Barbara, Aline, Lucas, Wilson, Adriana, Fernanda e o Prof. Raphael. A língua inglesa me presentou com a amizade de vocês e trouxe momentos incríveis que nunca esquecerei.

Aos meus vizinhos do 4604, obrigado por todo o carinho, pela ajuda em tantos momentos difíceis e lógico as festas extremamente memoráveis!

Aos meus familiares e parentes, obrigado por me ampararem e serem sempre muito atenciosos comigo.

A todos os meus amigos, que não foram citados acima, mas que são como minha segunda família aqui em Uberlândia e me ajudaram muito nesta nova vida que dei inicio lá em 2017.

Ao curso de biomedicina da UFU, pelos professores, pela estrutura, pelo auxilio do corpo técnico-administrativo (em especial ao Filipe, secretário ícone aclamado perfeito).

Ao coordenador do curso, Dr. Carlos, quero agradecer toda atenção e suporte que me ofereceu sempre quando precisei.

Aos colegas do Laboratório de Análises Clínicas do HC-UFU, quem sem dúvidas foram uma parte extremamente importante na minha formação.

Aos colegas do Departamento de Biologia Celular, Histologia e Embriologia – DEBHEM, por terem contribuído com a realização deste trabalho e serem sempre muito solícitos.

E por fim, a todos aqueles que estiveram envolvidos com esta etapa extremamente marcante da minha vida. Muito obrigado!!!

RESUMO

O diabetes *mellitus* (DM) é um grupo de alterações metabólicas que apresentam em comum a hiperglicemia decorrente da insuficiência da insulina ou problemas relacionados a sua efetiva utilização. A hiperglicemia oriunda da instalação do DM pode causar alterações importantes na homeostasia celular, inclusive levando a alterações na organização cromatínica. A cromatina tem um papel chave no controle da expressão gênica, cuja alteração em células de defesa do organismo pode levar ao comprometimento da função normal destes grupos celulares. Entre elas há os monócitos que, se alterados, podem gerar uma resposta imune diferente do esperado. Estudos anteriores reforçam essas associações das mudanças na organização da cromatina causadas pelo DM e as consequências para a função imune. Sendo assim, é importante que uma investigação busque entender a relação das alterações cromatínicas e nucleares com a fisiopatologia do diabetes. O objetivo neste trabalho foi pesquisar mudanças na organização da cromatina de monócitos do sangue periférico de indivíduos portadores de diabetes 1 e 2, quando comparados a indivíduos não portadores. Para este fim, foram analisadas imagens de núcleos de monócitos submetidos à reação citoquímica de Feulgen, dos quatro diferentes grupos: Grupo 1, portadores de DM tipo 1, Grupo 2, portadores de DM tipo 2, e seus respectivos grupos controle de idade e sexo, não portadores de diabetes *mellitus*. A avaliação da organização nuclear e da cromatina foi realizada através do software ImageJ para obtenção de medidas de parâmetros geométricos, absorciométricos e texturais. Os resultados indicam alterações expressivas na organização cromatínica nos núcleos de monócitos de pacientes portadores de DM1, cujos núcleos apresentaram aumento no tamanho nuclear gerado pelo aumento no conteúdo total de DNA, incluindo compactação e reorganização da cromatina, além de alterações em seu formato. E, de acordo com dados prévios na literatura, tais mudanças podem estar associadas a processos de poliploidia. Adicionalmente, há indícios que a insulinemia desencadeada pelo uso da insulina glargina estaria relacionada com as modificações cromatínicas descritas neste trabalho. Para o DM2 as alterações cromatínicas foram extremamente sutis e as correlações fracas, não havendo indícios de que os monócitos tenham sido afetados.

Palavras-chave: cromatina, diabetes, monócitos, histocitoquímica, análise de imagem assistida por computador.

ABSTRACT

Diabetes mellitus (DM) is a group of metabolic changes that have in common hyperglycemia resulting from insulin insufficiency or problems related to its effective use. Hyperglycemia resulting from the installation of DM can cause important changes in cellular homeostasis, even leading to changes in chromatin organization. Chromatin plays a key role in controlling gene expression, changes in the body's defense cells can compromise the normal function of these cell groups. Among them there are monocytes that, if altered, can generate an immune response different from the expected one. Previous studies reinforce these associations of changes in chromatin organization caused by DM and consequences for immune function. Therefore, it is important that an investigation seeks to understand the relationship of chromatin and nuclear changes with the pathophysiology of diabetes. The aim of this study was to investigate changes in the organization of chromatin in peripheral blood monocytes from patients with diabetes 1 and 2, when compared to non-carriers. For this purpose, images of monocyte nuclei related to Feulgen's cytochemical reaction were analyzed, from the three different groups: Group 1, patients with type 1 DM, Group 2, patients with type 2 DM, and their control groups, without diabetes mellitus. The evaluation of nuclear and chromatin organization was performed using ImageJ software to obtain measurements of geometric, absorptiometry and textural parameters. The results result in expressive changes in chromatin organization in monocyte nuclei from patients with DM1, whose size increases in nuclear size generated by the increase in total DNA content, including chromatin compaction and reorganization, in addition to changes in its shape. And, according to previous data in the literature, such changes may be associated with polyploidy processes. Additionally, there are indications that the insulinemia triggered by the use of insulin glargine would be related to the chromatin changes described in this work. For DM2, chromatin alterations were extremely subtle and correlations were weak, with no evidence that monocytes were affected.

Keywords: chromatin, diabetes *mellitus*, monocytes, histocytology, computer-assisted image analysis

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Comparação gráfica dos 7 parâmetros de análise de imagem DM1 e Controle.....	29
Figura 2. Imagens dos núcleos de monócitos DM1 e Controle corados com Feulgen.....	33
Figura 3. Curvas de insulina associada a diferentes tratamentos com insulina exógena.....	36
Figura 4. Comparação gráfica dos 7 parâmetros de análise de imagem DM2 e Controle.....	43
Figura 5. Imagens dos núcleos de monócitos de pacientes portadores de DM2 e não portadores - controles corados com Feulgen.....	44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Histórico das dosagens da Glicemia de Jejum e Hemoglobina Glicada do Grupo 1 – DM1	27
Tabela 2. Histórico das dosagens da Glicemia de Jejum e Hemoglobina Glicada do Grupo Controle – DM1	27
Tabela 3. Histórico Clínico dos portadores de DM1	28
Tabela 4. Comparações Intragrupo do Grupo DM1	30
Tabela 5. Comparações Intragrupo do Grupo Controle para DM1	31
Tabela 6. Comparação pareada das medianas dos grupos DM1 vs Controle.....	32
Tabela 7. Comparações Intergrupo DM1 vs Controle.....	34
Tabela 8. Histórico das dosagens da glicemia de jejum e hemoglobina glicada do grupo diabetes – DM2.....	37
Tabela 9. Histórico das dosagens da glicemia de jejum e hemoglobina glicada do grupo controle – DM2.....	37
Tabela 10. Histórico Clínico dos portadores de DM2	37
Tabela 11. Comparações Intragrupo do Grupo DM2	38
Tabela 12. Comparações Intragrupo do Grupo Controle DM2	40
Tabela 13. Comparação das Medianas dos Grupos DM2 vs Controle.....	44
Tabela 14. Comparações Intergrupo DM2 vs Controle.....	46

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
1.1 Diabetes: epidemiologia e aspectos gerais	11
1.2 Pâncreas e Insulina	12
1.3 DM1 e DM2: fisiopatologia	13
1.4 Sistema Imune: monócitos e sua relação com o DM	14
1.5 Cromatina: estrutura e dinâmica	16
1.6 Cromatina: relação entre DM e monócitos circulantes	17
2 JUSTIFICATIVA.....	20
3 OBJETIVOS	20
3.1 Objetivo Geral.....	20
3.2 Objetivos Específicos.....	20
4 METODOLOGIA	21
4.1 Células Mononucleares de Sangue Periférico (PBMCs).....	21
4.2 Dosagens: glicemia de jejum e hemoglobina glicada (HbA1c)	21
4.3 Captura e análise de Imagem	22
4.4 Análise Estatística	23
5 RESULTADOS.....	27
5.1 Condições clínico-laboratoriais dos portadores de DM1 e seus controles	27
5.2 Alterações nucleares e cromatínica observadas no diabetes <i>mellitus</i> tipo 1	29
5.4 Condições clínico-laboratoriais dos portadores de DM2 e seus controles	36
5.5 Alterações nucleares e cromatínicas observadas no diabetes <i>mellitus</i> tipo 2	38
6 DISCUSSÃO	47
7 CONCLUSÃO	52
8 REFERÊNCIAS	53

1 INTRODUÇÃO

1.1 Diabetes: epidemiologia e aspectos gerais

O diabetes *mellitus* (DM) consiste em um distúrbio metabólico caracterizado por hiperglicemia persistente, decorrente de deficiência na produção de insulina ou na sua ação, ou em ambos os mecanismos, ocasionando complicações crônicas a longo prazo (LYRA et al., 2020). A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que a glicemia elevada é o terceiro fator entre os mais importantes da causa de mortalidade prematura, superada apenas por hipertensão arterial e uso de tabaco. Atualmente, muitos governos, sistemas de saúde pública e profissionais de saúde ainda não se conscientizaram da atual relevância do diabetes e de suas complicações na sociedade (WHO, 2009).

O distúrbio possui proporções epidêmicas, com estimativa de 425 milhões de pessoas com DM mundialmente e, de acordo com a Federação Internacional de Diabetes, existe a estimativa de que 8,8% desta população esteja na faixa de 20 a 79 anos de idade. Se as tendências atuais persistirem, o número de pessoas com diabetes superará 700 milhões em 2045. Cerca de 79% dos casos estão em países em desenvolvimento, cujas taxas de aumento nas próximas décadas podem ser as maiores registradas (IDF, 2019). Em 2013, a Pesquisa Nacional de Saúde (PNS), realizada pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) e pelo Ministério da Saúde, estimou que 6,2% da população brasileira com 18 anos de idade ou mais relatou diagnóstico médico de diabetes, sendo 7,0% de casos nas mulheres e 5,4% nos homens (IBGE, 2014).

O DM é categorizado nos tipos 1 e 2, diabetes gestacional, e diabetes neonatal, além daqueles derivados de causas secundárias devido a endocrinopatias ou uso de medicamentos, dentre outros. (RAJEEV GOYAL; ISHWARLAL JIALAL, 2019). Dois dos principais subtipos de DM são o diabetes *mellitus* tipo 1 (DM1), associado classicamente a ausência completa ou produção insuficiente de insulina, e o diabetes *mellitus* tipo 2 (DM2), que resulta na diminuição da sensibilidade dos tecidos-alvo ao efeito metabólico da insulina (HALL, 2017). A patogênese do DM1 e do DM2 é drasticamente diferente e, portanto, cada tipo tem várias etiologias, apresentações e tratamentos (RAJEEV GOYAL; ISHWARLAL JIALAL, 2019).

O diagnóstico do DM é um procedimento básico que consiste na medida da glicose no soro/plasma após jejum de 8 a 12 horas e o teste padronizado de tolerância à glicose (TTG) após administração de 75 gramas de glicose anidra (ou dose equivalente). Glicemias em jejum superiores a 126 mg/dL ou maiores que 200 mg/dL (TTG) são indicativos de um diagnóstico confirmatório de DM (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2000).

1.2 Pâncreas e Insulina

O pâncreas é a fonte do hormônio metabólico vital, a insulina, intimamente relacionada com os eventos do DM. Esse órgão é composto por dois componentes histologicamente e funcionalmente distintos: o pâncreas exócrino (células acinares e células ductais) e o pâncreas endócrino (ilhotas pancreáticas). As ilhotas endócrinas representam menos de 5% da massa pancreática total, mas ainda assim são formadas por mais de um bilhão de células em humanos. Cada um dos cinco principais tipos de células das ilhotas sintetiza e secreta um tipo principal de hormônio: insulina (células β), glucagon (células α), somatostatina (células δ), polipeptídio pancreático (Células PP) e grelina (células ϵ). A insulina e o glucagon são liberados diretamente na circulação sanguínea através de uma densa rede vascular por um mecanismo autocrino e têm papéis essenciais na regulação dos níveis de glicose no sangue (ZHOU; MELTON, 2018).

Os mecanismos envolvidos na regulação fisiológica da secreção de insulina das células beta pancreáticas se iniciam pela exocitose dos grânulos deste hormônio com o aumento do cálcio intracelular. Quando essa secreção é induzida por glicose, o resultado é quase inteiramente influxo de cálcio através dos canais de cálcio voltagem dependentes. Sua abertura é controlada pelo canal de potássio sensível ao ATP (KATP), que atua ligando o metabolismo celular ao potencial de membrana. Se os níveis fisiológicos de glicose plasmática estiverem baixos, este canal estará aberto e o efluxo de K^+ através do poro aberto mantém a membrana hiperpolarizada, impedindo a atividade elétrica, a abertura do canal de cálcio, seu influxo e a secreção de insulina (ASHCROFT; RORSMAN, 2018).

Outro importante hormônio, que atua como um contrarregulador para a insulina, é o glucagon, desempenhando um papel crítico na manutenção da homeostase da glicose in vivo em animais e humanos. O glucagon promove a produção de glicose hepática, aumentando a glicogenólise e gliconeogênese, diminuindo a glicogênese e glicólise em uma forma combinada por meio de vários mecanismos. As proporções alteradas de insulina e glucagon desempenham papéis importantes no início e na manutenção de estados hiperglicêmicos patológicos (JIANG; ZHANG, 2003).

Quando temos um estado de hiperglicemia crônica relacionado ao DM, todos os mecanismos citados anteriormente vão sofrer uma miríade de alterações prejudiciais. Os resultados adversos associados são atribuídos a patobiologia específica de cada subtipo de diabetes (PREISER; THOOFT; TIRONI, 2016).

1.3 DM1 e DM2: fisiopatologia

O (DM1) é resultado da destruição das células β em ilhotas pancreáticas produtoras de insulina através de mecanismos autoimunes. Nesse contexto a conexão entre o sistema imunológico e o DM1 foi sugerida pela primeira vez em 1973, quando os抗ígenos HLA (Human Leukocyte Antigen ou Antígenos Leucocitários Humanos) foram associados ao diabetes mellitus insulinodependente, mas não com outros tipos de diabetes. Posteriormente, estudos genômicos (NOBLE; VALDES, 2011) confirmaram que os genes HLA são responsáveis por até 50% do risco genético para desenvolvimento de DM1 (em particular HLA classe II), sugerindo a existência de peptídeos dos autoantígenos específicos envolvidos na patogênese do DM1 (ROEP et al., 2021).

Estudos apontam que autoanticorpos circulantes contra insulina, ácido glutâmico descarboxilase (GAD), proteína tirosina fosfatase IA-2 e/ou transportador de zinco podem ser detectados antes do diagnóstico clínico de diabetes tipo 1. Enquanto os indivíduos com positividade de um único autoanticorpo frequentemente revertem para um quadro negativo, a reversão é rara em pessoas com múltiplos autoanticorpos. Portanto, é possível observar que existe uma relação intrínseca com as respostas autoimunes que levam à perda de função de células β com início da intolerância à glicose, representando o próximo estágio distinto antes do início dos sintomas clínicos do diabetes (SKYLER et al., 2017).

O DM1 ainda pode ser caracterizado por dois subtipos, o (1A) e o (1B). O primeiro é um dos mais comuns, sendo autoimune, e caracteriza-se pela destruição progressiva e insidiosa das células β produtoras de insulina das ilhotas pancreáticas, gerando deficiência absoluta de insulina (COBAS; GOMES, 2010). O segundo corresponde de 4% a 7% dos casos de DM1 e pode incluir outras formas como o diabetes fulminante e o diabetes tipo 1 adulto atípico ou com tendência à cetose (DATC). Diferentemente do tipo (1A), esse não possui os marcadores de autoimunidade, mas de forma semelhante, necessita de terapêutica com insulina exógena pelo resto da vida (DIB, 2008).

O diabetes *mellitus* tipo 2 (DM2) é um distúrbio metabólico e endócrino complexo resultante da interação entre fatores genéticos e ambientais, que pode causar diferentes graus de alterações na funcionalidade da insulina nos tecidos periféricos, bem como nas células β pancreáticas. Outras condições como excesso de peso e a obesidade, principalmente do tipo androide são os principais fatores que favorecem o desenvolvimento do DM2 (DURRUTY; SANZANA; SANHUEZA, 2019). Recentemente, a função reduzida das células β foi reconhecida como um problema chave no DM2 (ARTASENSI et al., 2020).

As alterações metabólicas no DM2 incluem comumente comprometimento da função endotelial, inflamação subclínica, alterações nos adipócitos, o desenvolvimento de dislipidemia aterogênica, níveis aumentados de ácidos graxos livres (FFAs), trombose e fibrinólise (PANDEY; CHAWLA; GUCHHAIT, 2015).

A resistência periférica à insulina é uma característica importante do DM2 e se desenvolve em vários órgãos, incluindo músculo esquelético, fígado, tecido adiposo e coração. O receptor de insulina é um receptor tipo tirosina cinase que, após ligação da insulina, sofre processos de autofosforilação seguidos de ativação dos domínios tirosina cinase citosólicos que, por sua vez, causam fosforilação de diversas outras enzimas intracelulares, incluindo os substratos do receptor de insulina (IRS). O efeito global é dirigir toda a maquinaria metabólica intracelular, de modo a produzir efeitos no metabolismo de carboidratos, lipídios e proteínas (HALL, 2017).

A atividade inadequada desse receptor, somada à secreção deficiente de insulina pelas células β influencia o desenvolvimento da hiperglicemias no diabetes, afetando o controle glicêmico de forma severa (PANDEY; CHAWLA; GUCHHAIT, 2015). Tanto a resistência à insulina quanto a disfunção das células β ocorrem no início da patogênese do (DM2) e se mantêm de forma sustentada ao longo do tempo (ZHENG; LEY; HU, 2018).

1.4 Sistema Imune: monócitos e sua relação com o DM

Dentre as alterações que são geradas em decorrência da hiperglicemias e/ou hipoinsulinemia, o sistema imunológico e vários outros grupos celulares também acompanham essas modificações no organismo incluindo as células beta pancreáticas, células endoteliais (VILLENEUVE; NATARAJAN., 2010), monócitos (MIAO et al., 2007) e linfócitos (MIAO et al., 2008).

As respostas do sistema imunológico às infecções ou alterações celulares que são reconhecidas como ameaças ao organismo consistem em dois tipos: uma resposta imune inata e uma adaptativa (CARRILLO et al., 2017). A resposta inata é a primeira etapa, essencial na defesa do hospedeiro contra as infecções. Ela ataca microrganismos com eficiência e é capaz de controlar e até mesmo erradicar infecções. Os dois principais mecanismos de resposta inata são a inflamação e a defesa antiviral, sendo as células epiteliais, as células sentinelas em tecidos (monócitos/macrófagos, células dendríticas e outros), células NK (Natural Killer) e uma série de proteínas plasmáticas seus principais componentes (ABBAS, 2014).

A imunidade adaptativa envolve uma interação extremamente regulada entre células apresentadoras de antígeno e linfócitos T e B, que facilitam o efeito imunológico específico. Os linfócitos se desenvolvem e são ativados dentro de uma série de órgãos linfoides que

compreendem o sistema linfático. Durante o desenvolvimento, conjuntos de segmentos gênicos são reorganizados e montados para criar sequências que codificam os receptores de antígenos específicos de linfócitos T e B. Outra característica importante é a geração de memória imunológica. Em encontros subsequentes com o mesmo patógeno, as células de memória são rapidamente ativadas para produzir mais resposta de proteção rápida e robusta (BONILLA; OETTGEN, 2010)

Os monócitos são um subconjunto de leucócitos circulantes que podem se diferenciar ainda mais em uma gama de macrófagos teciduais. Esses grupos de células se originam de progenitores na medula óssea e quando existe um processo inflamatório que perturba a homeostase, os monócitos circulantes deixam a corrente sanguínea e migram para os tecidos onde, após condicionados por fatores de crescimento locais, citocinas pró-inflamatórias e produtos microbianos, se diferenciam em macrófagos. O recrutamento de monócitos é essencial para o controle eficaz e eliminação de vírus, infecções bacterianas, fúngicas e por protozoários, mas também contribuem para a patogênese de doenças inflamatórias e degenerativas (SHI; PAMER, 2011).

Nos monócitos existem alterações significativas em relação ao seu funcionamento durante a patogênese do diabetes. Foi evidenciado que monócitos em diabéticos diferem significativamente na expressão de genes pró-inflamatórios e pró-fibróticos quando comparados aos de pessoas saudáveis. Uma importante correlação, pois esse grupo celular está diretamente envolvido no reparo celular e auxilia em processos inflamatórios que são relevantes na manutenção da homeostasia (KIMBALL et al., 2019).

Outro importante componente do sistema imune, o linfócito, também está relacionado com alterações que são provocadas pelo diabetes mal controlado. Estudos a partir de ratos diabéticos induzidos por aloxana mostraram alterações marcantes no metabolismo da glicose e da glutamina. Os resultados mostraram prejuízo na capacidade dos linfócitos de utilizar glicose e a glutamina, afetando significativamente sua capacidade de responder a estímulos imunológicos. O importante papel da insulina para o metabolismo dos linfócitos foi confirmado pelo fato de que o tratamento com insulina *in vivo* ou *in vitro* reverteu a maioria das mudanças observadas (OTTON; MENDONÇA; CURI, 2002).

As células especializadas que capturam os antígenos microbianos e os apresentam aos linfócitos T são denominadas de células apresentadoras de antígenos (APC, do inglês, *antigen-presenting cells*). Essas células apresentaram diferenças na maturação e função quando derivadas de monócitos de pacientes com diabetes. Foi sugerido que uma das razões para tal evento era a ativação defeituosa de células regulatórias nestes indivíduos. Além disso, esses

monócitos têm um fenótipo inflamatório, com aumento de IL-6 e produção de IL-1 β . Essas citocinas podem então estimular a produção de IL-17 inflamatória, aumentando a produção de linfócitos T (WONG; WEN, 2012).

Os monócitos também desempenham um papel fundamental na progressão da obesidade e resistência à insulina em pacientes com DM2, fatores esses ressaltados anteriormente devido a sua alta relevância na patogênese da doença. Pacientes que sofrem de DM2 exibiram expressão aumentada de marcadores de ativação de monócitos CD11, CD36 e CD163 sendo este último significativamente associado ao desenvolvimento de resistência à insulina. Os macrófagos são enfatizados por desempenhar um papel fundamental no progresso patológico de obesidade ou resistência à insulina. Dois subtipos de macrófagos estão presentes no tecido adiposo: um pró-inflamatório denominado "M1" e um tipo de macrófago anti-inflamatório, denominado "M2" na presença de IL-4 (ZHOU, MELTON., 2018).

Macrófagos tipo M1 mostraram efeitos pró-inflamatórios pela secreção de altos níveis de marcadores pró-inflamatórios e citocinas, como TNF (Tumor Necrosis Factor ou Fator de Necrose Tumoral). Além disso, a ativação de macrófagos é mediada por células envolvidas na imunidade adaptativa. Liberação de células Th1 e Th17, IFN- γ e IL-17, que estimulam a diferenciação de macrófagos M1 pró-inflamatórios foram consideradas como reguladores importantes na inflamação do tecido adiposo e na patogênese no DM2 (ZHOU et al., 2018). Os macrófagos são vistos em infiltrados de ilhotas humanas em secções post-mortem do pâncreas obtidas de pacientes com DM1, ambos no momento do início da doença e mais tarde (WONG; WEN, 2012).

1.5 Cromatina: estrutura e dinâmica

Entre as importantes disfunções celulares associadas ao diabetes, as modificações relacionadas com o estado conformacional da cromatina podem ser um caminho para encontrar respostas. A cromatina é uma estrutura altamente dinâmica que confere organização estrutural e funcional ao genoma e regula a expressão de genes subjacentes (TYAGI et al., 2016). Suas complexas estruturas de ordem superior formam subcompartimentos em núcleos interfásicos e diferentes categorias de enzimas especializadas atuam regulando sua compactação e características biofísicas em resposta a condições fisiológicas e patológicas (MARGUERON; REINBERG, 2010).

As proteínas que se ligam ao DNA para formar os cromossomos eucarióticos são divididas em duas classes gerais: as histonas e as proteínas cromossômicas não histonas. O complexo das duas classes de proteínas com o DNA nuclear é denominado de cromatina. As histonas são

responsáveis pelo primeiro nível fundamental de compactação da cromatina, o nucleossomo. Uma partícula central do nucleossomo individual consiste em um complexo de oito proteínas histonas – duas moléculas de histonas H2A, H2B, H3 e H4 – e um segmento de DNA de fita dupla, com 147 pares de nucleotídeos de comprimento. Por fim, o DNA que está firmemente preso ao redor de cada octâmero de histonas perfaz 1,75 voltas em uma hélice levogira (ALBERTS et al., 2011).

Embora sejam formadas longas fitas de nucleossomos na maior parte do DNA cromossômico, a cromatina, nas células vivas, raramente adota a forma estendida de colar de contas. Em vez disso, os nucleossomos são adicionalmente empacotados em cima uns dos outros, formando uma estrutura mais densa, como a fibra de cromatina. Uma quinta histona, denominada de histona H1 pode ligar-se aos nucleossomos adjacentes, formando um arranjo regular e repetitivo. Ao formar uma fibra mais condensada de cromatina, essa estrutura pode atingir ainda mais um nível, ficando mais enovelada em uma série de alças em um cromossomo interfásico (ALBERTS et al., 2011). Nesta etapa, podem ser vistas regiões de eucromatina, nas quais as fibras estão menos enoveladas, e regiões de heterocromatina, que representam as partes mais condensadas (ROBERTIS; HIB, 2012). Esses arranjos característicos da cromatina interfásica podem sofrer graus adicionais de empacotamento, observados especialmente nos cromossomos mitóticos (ALBERTS et al., 2011). Estudos mais recentes (NUÑEZ-OLVERA et al., 2022) reforçam que o grau de enovelamento da cromatina possui influência na atividade dos genes. Sugeriu-se que os fatores de transcrição gerais não somente ativam o promotor do gene, mas também o desarmam dos nucleossomos no setor inicial do segmento codificador, possibilitando a separação das duas cadeias do DNA, a fim de que enzimas iniciem a transcrição.

Aparentemente, os fatores de transcrição agem direta ou indiretamente sobre as histonas H4, que se modificam e desencadeiam a remoção das outras histonas, iniciando pelas H2A e H2B. Além disso, a cromatina é regulada pela reunião ou pela remoção de grupos acetila, grupos metila e grupos fosfato nas “caudas” das histonas, as quais estão expostas a estas alterações porque se projetam para fora dos nucleossomos. Em alguns casos, a atividade gênica é inativada e a cromatina fica compactada, devido à ação de outras causas além das citadas (ROBERTIS; HIB, 2012).

1.6 Cromatina: relação entre DM e monócitos circulantes

As alterações funcionais em células do sistema imune, como nos monócitos e a ativação de macrófagos não estão apenas associadas a mudanças transpcionais, mas também alterações na estrutura da cromatina. Os monócitos em especial parecem possuir peculiaridades no

comportamento da sua cromatina, apresentando diferentes domínios dependendo do cenário em que se encontra, o que pode explicar sua enorme plasticidade funcional e reatividade rápida para sinais de estresse. Um estudo onde se buscou caracterizar a expressão de genes envolvidos em processos de regulação imunológica, observou-se que, através de um ou outro sinal de estresse, a cromatina permanecia aberta, mesmo antes de encontrarem indícios que levassem a esse comportamento (SCHULTZE, 2017).

Dados recentes evidenciaram que, durante o desenvolvimento de monócitos e outras células imunes, os TFs (fatores de transcrição específicos) como proteína ativadora-1 (AP-1), NF-kB (fator nuclear kB) e IRFs (fatores reguladores do interferon), que especificam a linhagem destes tipos celulares, alteram a estrutura da cromatina facilitando a abertura do loci ISG (“*Interferon-Stimulated Genes*”, Genes Estimulados por Interferons) para a transcrição. Essa evidência é consistente com os conceitos emergentes de que a cromatina regula dinamicamente a expressão gênica alterando sua arquitetura por meio do reposicionamento, montagem e reestruturação de nucleossomos (SONG et al., 2021).

Evidências emergentes sugerem um papel fundamental para o controle transcricional na patogênese de numerosas doenças humanas incluindo distúrbios metabólicos como o diabetes. Desse modo, a exposição a fatores ambientais, como hiperglicemia pode levar a alterações estruturais da cromatina que poderiam ser potencialmente retidos por toda a vida daquele indivíduo. (KEATING; EL-OSTA, 2012). Nesse sentido, foi demonstrado que as alterações da cromatina induzidas por dietas obesogênicas podem persistir após mudanças na dieta. Isso se correlaciona com estudos clínicos que examinam o controle da glicose no sangue para pacientes diabéticos onde foi demonstrado que as complicações podem continuar a desenvolver-se muito depois da normalização da glicemia no sangue, um fenômeno que foi originalmente denominado "memória metabólica". No entanto, dado que as modificações da cromatina podem ser dinâmicas e reversíveis, caracterizar modificações da cromatina persistentes versus transitórias em resposta à sinalização metabólica é um dos grandes desafios da atualidade (COSTELLO; SCHONES, 2018).

As consequências das modificações da estrutura da cromatina durante o desenvolvimento do diabetes *mellitus* se refletem diferentemente em tipos específicos de células do sistema imunológico. Estudos relacionados às remodelações cromatinicas associadas a proteína adaptadora p66Shc (principal impulsor do estresse oxidativo mitocondrial) em monócitos do sangue periférico de pacientes com DM2 evidenciaram uma relação casual entre a variabilidade glicêmica e os processos que induzem assinaturas epigenéticas não apenas nos monócitos, alvos do estudo, mas também em células endoteliais humanas. (COSTANTINO et

al., 2017). Ainda, em um ambiente diabético descompensado, a glicose e seus subprodutos, ou seja, produtos finais de glicação avançada, podem causar alterações epigenéticas na medula óssea. Isso faz com que exista um pré-condicionamento diabético dos monócitos e macrófagos (MOSSEL et al., 2020).

Adicionalmente, foram observadas alterações cromatínicas em monócitos após tratamento *in vitro* com meio hiperglicêmico, as quais foram associadas à ativação de genes associados a processos inflamatórios. Através dos resultados, evidenciou-se que modificações epigenéticas como a acetilação nas histonas de genes específicos de monócitos, representam um importante marcador do estado inflamatório aumentado nos portadores de DM (MIAO et al., 2008).

Com base nas evidências apresentadas, a hipótese deste projeto é de que o diabetes *mellitus* humano esteja associado com alterações cromatínicas em monócitos, sendo tais alterações diferenciais a depender do tipo de diabetes avaliado, DM1 e DM2, e também do nível glicêmico e de hemoglobina glicada apresentado pelos indivíduos testados.

2 JUSTIFICATIVA

Nos últimos anos houve um maior desenvolvimento das pesquisas que buscavam compreender os processos que envolvem o comportamento da cromatina relacionados ao DM (ROSEN et al., 2018). Trabalhos anteriores evidenciaram que a hiperglicemia modifica a cromatina a ponto de alterar a atividade de determinadas células do sistema imune, como os linfócitos T (MARTINEZ, 2014), neutrófilos e macrófagos (DOWEY et al., 2021).

Considerando estas alterações que são relatadas no sistema imune de pacientes portadores de DM e que podem desencadear respostas fisiopatológicas como o defeito e disfunção da resposta imune inata e adaptativa relacionados a vulnerabilidade contra patógenos, exacerbação de quadros inflamatórios (BERBUDI et al., 2020), risco aumentando de desenvolver doenças autoimunes (DANNUNZIO; RAMONA TALLONE; LORINI, 2011), maior desenvolvimento de neoplasias (HAMMAD et al., 2019) e descompensações imuno-metabólicas (ZMORA et al., 2017). Portanto, é imperativo que estudos sejam realizados para compreender os efeitos que o DM pode vir a causar nos constituintes interativos da cromatina em determinados componentes celulares do sistema imunológico.

Logo, o entendimento dos mecanismos envolvidos nestes eventos são cruciais para compreender a ligação entre a regulação genômica e o fenótipo diabético que envolve o funcionamento do sistema imune. Consequentemente, um maior conhecimento a respeito dos padrões que se estabelecem na patogenia do DM pode vir a estabelecer estratégias de combate à progressão de complicações prejudiciais futuras.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar se há alterações estruturais na cromatina em células mononucleares de sangue periférico de pacientes diabéticos tipo 1 e 2 quando comparados a indivíduos saudáveis não portadores.

3.2 Objetivos Específicos

Estaria o diabetes em monócitos de sangue periférico humano, associado com:

1. Alterações de ploidia nuclear?
2. Alterações nos graus de compactação e distribuição da cromatina?
3. Alterações na morfologia nuclear?
4. Finalmente, seriam tais alterações semelhantes nos pacientes DM1 e DM2?

4 METODOLOGIA

4.1 Células Mononucleares de Sangue Periférico (PBMCs)

Para a preparação do material, foram utilizadas células mononucleares de sangue periférico (PBMCs) humano, isoladas de homens e mulheres de 18 a 55 anos, sem distinção de raça ou grupos sociais, residentes na cidade de Uberlândia e região, e atendidos no Hospital de Clínicas de Uberlândia (HC-UFG). Os sujeitos foram organizados em quatro grupos: um grupo com 4 indivíduos diabéticos tipo 1 e seus respectivos controles e outro grupo com 5 indivíduos diabéticos tipo 2 e seus respectivos controles, todos pareados por sexo e idade.

Os PBMCs foram isolados utilizando-se centrifugação em gradiente de Ficoll-Paque (Kanof, Smith, Zola 2001), como parte de projeto de pesquisa de mestrado desenvolvido por Vanessa Carla de Souza Pereira (PEREIRA, 2017), após aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (Parecer 1.227.701), e encontram-se armazenados a -20 °C em tampão PBS acrescido de DMSO a 10%. Lâminas histológicas contendo as células isoladas foram confeccionadas pela mestrandona, as quais foram então fixadas em etanol/ácido acético 1:1 (v/v) por 1 min e submetidas à citoquímica para coloração de DNA, reação de Feulgen, com hidrólise em ácido clorídrico 4 N, por 60 min a 25 °C, seguida de lavagem em ácido clorídrico 0,1 N gelado, e coloração em reativo de Schiff por 40 min.

4.2 Dosagens: glicemia de jejum e hemoglobina glicada (HbA1c)

Durante seu mestrado, a discente Vanessa Carla também realizou as dosagens de glicemia de jejum e hemoglobina glicada. Todos os procedimentos clínicos pré-analíticos foram rigorosamente seguidos para a obtenção das amostras. Na etapa analítica, as amostras foram encaminhadas para o setor de Imunoquímica do Laboratório de Análises Clínicas do HC/UFG por onde passaram pelas metodologias de escolha para obtenção dos resultados.

Para a glicemia em jejum o método utilizado foi o enzimático automatizado, que se baseia em um ensaio de acoplamento enzimático, que utiliza as enzimas hexoquinase e a glicose-6-fosfato desidrogenase (G-6-PD). A glicose presente no plasma ou soro do paciente é primeiro fosforilada com gasto de ATP na presença da hexoquinase e de Mg²⁺. A glicose-6-fosfato formada é oxidada pela G-6-PD formando 6-fosfogliconato, na presença de NADP⁺ ou NAD⁺. A quantidade de (NADPH) reduzido ou produzido é diretamente proporcional à quantidade de glicose na amostra e é medida pelo aumento na absorbância a 340nm. Para a

HbA1c (Hemoglobina glicada) foi quantificada através do método de Cromatografia Líquida de Alta Performance (HPLC) automatizada. O método exige 5 ml de sangue total (EDTA) e as amostras são coletadas por venopunção. Todas as etapas posteriores são feitas de forma automatizada na seguinte sequência: o material é diluído com um reagente de hemólise contendo boratos, seguido por incubação a 37°C para remover as bases de Schiff. Uma alteração de gradiente usando três tampões de fosfato de aumento da força iônica é passada através da coluna. A detecção é efetuada em 415 e 690 nm e os resultados são quantificados através da integração das áreas sob os picos. O tempo da análise é em torno de 3 minutos para cada amostra (BURTIS et al., 2016).

Todo o levantamento dos dados do Histórico Clínico de cada paciente foi obtido através de consulta no Sistema de Informação Hospitalar (SIH).

4.3 Captura e análise de Imagem

Imagens das células coradas foram capturadas pelo estudante responsável por este projeto durante a sua iniciação científica voluntária, em microscópio óptico Leica DM500 acoplado a uma câmera Leica ICC50 conectada a um microcomputador, e utilizando o software Leica LAS EZ. Foram realizadas capturas com a objetiva de imersão, 100x, mantendo-se constantes as condições de iluminação, regulando-se a potência da fonte de luz ao máximo e ajustando o tempo de exposição pelo software de captura Leica LAS EZ (versão 1.8.1, Leica Microsystems Limited – Suiça). As condições de captura estabelecidas foram: tempo de exposição 7,0 ms, ganho 1,6x, gama 2,0 e saturação 60,00. Sob as condições ópticas utilizadas, 1 µm correspondeu a 15,6 pixels nas imagens.

As imagens foram analisadas quantitativamente utilizando o software ImageJ. Como na dissertação da discente Vanessa Carla foram analisados os linfócitos, no presente trabalho, foram avaliados somente os núcleos de monócitos, sendo selecionados ao todo 277 núcleos. A primeira seleção dos núcleos foi realizada no momento das capturas de imagem através da escolha de campos em movimentos de “zig-zag” cobrindo todo o material presente na lâmina histológica.

Posteriormente, as imagens sofreram uma série de processamentos digitais para eliminar qualquer tipo de interferência externa que viesse a alterar os valores obtidos através dos parâmetros de análise. O seguinte protocolo foi usado para cada imagem: as imagens digitais em formato TIFF foram convertidas para escala de cinza a 8 bits. Posteriormente foi feita uma eliminação de *vignetting* utilizando o plugin BaSiC para ImageJ (PENG et al., 2017). Para ajustar diferenças de brilho causadas durante o processo de captura, por exemplo por variações

da luminosidade na sala de captura ou até mesmo da lâmpada LED do microscópio, foi feito, também no ImageJ, um ajuste do brilho das imagens considerando a moda, que representa o valor de cinza mais comum de cada imagem, associado com o valor de cinza do fundo. Foi escolhido o valor de moda mais comum entre as imagens e a partir deste todas as demais imagens foram ajustadas. O ajuste se dá através da alteração dos valores mínimo e máximo do histograma dos níveis de cinza de cada imagem, de acordo com a diferença entre a moda de cada imagem e a moda considerada padrão. Para análise, o ImageJ foi calibrado para escala utilizando uma régua micrométrica, e para absorbâncias, onde os níveis de cinza foram convertidos em valores de absorbância utilizando uma barra de calibração de níveis de cinza (Kodak #5). A seleção dos núcleos a serem medidos se deu por “*thereshold*” separando os núcleos do fundo da imagem. O processo de análise foi realizado manualmente, levando em consideração o tamanho dos núcleos individuais de monócitos frente a núcleos de outros tipos celulares, fragmentos, e aglomerados de núcleos.

No ImageJ foram obtidos dados através de parâmetros geométricos, absorciométricos e texturais. De forma detalhada, foram avaliadas medidas de área nuclear (AREA) que indica o tamanho do núcleo bidimensional em μm^2 , a absorbância média (OD) mede a capacidade do núcleo em absorver radiação no espectro da luz visível e o desvio padrão (DESV) que mede a variabilidade das absorbâncias dos pixels em torno da média. A densidade óptica integrada (IOD) é uma estimativa do conteúdo do DNA presente em cada núcleo, já que corresponde à integração dos níveis de absorbância de todos os pixels presentes dentro de um núcleo analisado. A circularidade (CIRC), determinada pela equação 4π (área/perímetro²), fornece uma estimativa de alterações de formato, sendo que uma circularidade de 1,0 indica um círculo perfeito. A solidex (SOLID) é a medida de área por área convexa, um indicador que mede alterações de formato, associadas com alterações drásticas de forma que desviam a área nuclear da área convexa. Finalmente, a entropia (ENT) é um parâmetro textural energético que quantifica o nível de desordem dentro dos núcleos, ou seja, quanto mais complexa for a distribuição cromatínica nos núcleos analisados, maior será sua entropia.

4.4 Análise Estatística

Para a análise estatística foram utilizados *softwares* como o Studio R e o Microsoft Excel, com testes implementados em cada um deles. Os testes de hipótese e tamanho de efeito foram escolhidos de acordo com uma avaliação prévia minuciosa da distribuição dos dados após teste de normalidade (quando aplicável) e de homogeneidade de variâncias, além da forma da

distribuição e presença de empates (*ties*).

Essencialmente, para cada parâmetro de análise, os indivíduos foram comparados primeiramente intragrupo, considerando cada indivíduo ou paciente de cada grupo como um grupo em si, e posteriormente entre grupos experimentais. A análise intragrupo teve como objetivo avaliar o nível de variação existente entre os indivíduos do mesmo grupo experimental, considerando a variação intragrupo de faixas etárias e sexo. Em havendo grande variação nos parâmetros de análise entre os indivíduos dentro de um mesmo grupo, a comparação intergrupos seria feita entre cada paciente e seu respectivo controle de idade e sexo, ao invés de reunir todos os dados de um grupo e comparar com os dados totais do grupo controle.

Se não estivessem normalmente distribuídos, os dados não deveriam ser usados em testes cujas premissas requerem uma distribuição normal como os testes T, testes F e testes qui-quadrado (KHATUN, 2021), por exemplo. Dessa forma, amostras com $n < 15$ foram automaticamente descartadas de análise de normalidade utilizando os testes disponíveis, por falta de confiabilidade dos resultados desses testes para um n tão reduzido, sendo consideradas apenas para estatística não paramétrica. Para n acima de 15 e abaixo de 50, o teste de normalidade utilizado foi o Shapiro-Wilk (SW).

Alguns testes de hipóteses requerem homogeneidade de variâncias. Dessa forma, a próxima etapa foi verificar se há (homoscedasticidade) ou não (heteroscedasticidade), homogeneidade de variâncias (SALKIND, 2013). No caso de distribuições Gaussianas, o teste de variâncias adotado foi o paramétrico de Brown-Forsythe (DAG; DOLGUN; KONAR, 2018). No caso de estatística não paramétrica, optou-se pela análise de “*squared ranks*” de Conover (CONOVER, 1999).

Quando necessário, o teste de Kolmogorov-Smirnov (RAZALI; WAH, 2011) foi aplicado para determinar se as distribuições possuem ou não a mesma forma, outra exigência que alguns testes de hipóteses, como o teste de Mood para medianas, que precisa ser modificado caso as distribuições a serem comparadas variem em forma (*shape*).

Seguindo esse curso, para as comparações intragrupo, foram utilizados, finalmente, o teste de Kruskal-Wallis com post-hoc Conover-Iman (CONOVER; IMAN, 1981), ou o teste não paramétrico de medianas desenvolvido por Rand Wilcox (WILCOX., 2017).

A análise intergrupos seguiu duas vias de raciocínio. Primeiramente, os grupos diabéticos seriam comparados com seus controles de forma pareada utilizando as medianas de cada indivíduo, para cada um dos parâmetros nucleares avaliados. Essa análise foi feita utilizando o teste de Wilcoxon (WOOLSON, 2008).

Posteriormente, cada paciente de cada grupo diabético teve todas as suas medidas

nucleares comparadas com as medidas de seu respectivo controle de idade e sexo. Nesse caso, optou-se pelo teste de Kruskal-Wallis com post-hoc Conover-Iman ou o teste não paramétrico de medianas de Rand Wilcox, citado mais acima, sendo as diferenças consideradas significativas para $p < 0,05$.

Após os testes de hipóteses, foram realizados cálculos para determinar o tamanho do efeito ou “*effect size*”. O tamanho do efeito pode ser definido como a magnitude da diferença entre os grupos comparados. Enquanto os testes de hipóteses indicam se há ou não alguma diferença entre populações, o tamanho do efeito indica o quanto grande a diferença é. Os tamanhos de efeito são geralmente classificados como pequenos, médios ou grandes e têm uma influência considerável no poder estatístico (DZIADKOWIEC, 2021).

Para as comparações intragrupo foram calculados os coeficientes g de Hedge ou Δ de Cliff. Para a comparação intergrupo utilizando os grupos como um todo (mediana de cada paciente e de cada parâmetro) de forma pareada, foi calculada probabilidade de superioridade de dependência, $Psdep$, e no caso das comparações de cada paciente com seu respectivo controle, envolvendo os dados nucleares totais, foram calculados os coeficientes d de Cohen, g de Hedge, ou Δ de Cliff, de acordo com a distribuição dos dados.

O tamanho de efeito pode ser interpretado através de regras pré-definidas ou avaliando de forma isolada de acordo com as circunstâncias que estão sendo estudadas. De forma geral, quando realizadas as comparações e os valores obtidos, por exemplo, para o grupo comorbidade e o grupo controle uma pequena diferença entre eles, isso indicará uma menor amplitude, resultando em um pequeno tamanho de efeito. Da mesma forma, se os valores possuem uma alta amplitude, com grande diferença entre um grupo e outro, isso indica um grande tamanho de efeito. Tal categorização está intimamente associada ao teste escolhido, podendo variar consideravelmente a depender do coeficiente utilizado, não sendo, inclusive, válida para todos os testes disponíveis. Adicionalmente, um efeito forte (magnitude alta) ou fraco (magnitude fraca) irá se relacionar com outros elementos dos resultados, como o próprio p (teste de hipótese), o n populacional e o contexto da pesquisa.

O sinal do resultado indica o sentido no qual as comparações foram feitas, sendo para esse estudo a diferença diabetes menos controle. Nesse sentido, valores positivos indicam que o grupo dos pacientes diabéticos ou o paciente diabético especificamente avaliado possui incremento dos valores de determinado parâmetro de análise nuclear, com relação aos controles, sendo o sinal negativo associado a superioridade dos valores encontrados nos controles, com relação aos diabéticos. Quando a amplitude do efeito resultante da diferença entre os dois

grupos é extremamente pequena ou nula, configura-se como um tamanho de efeito muito pequeno ou negligenciável respectivamente, e não se considera diferença relevante do ponto de vista biológico, mesmo que exista significância estatística nos testes de hipóteses.

5 RESULTADOS

5.1 Condições clínico-laboratoriais dos portadores de DM1 e seus controles

Os resultados obtidos relacionados as dosagens de glicemia em jejum e hemoglobina glicada (HbA1c) dos pacientes portadores de DM1 e seus respectivos controles podem ser observados nas Tabelas 1 e 2, respectivamente. É possível observar, através desses resultados e dos históricos clínicos (Tabela 3), que temos um grupo que possui condições de hiperglicemia e que se sustenta ao longo do período de todas as coletas para ambos os analitos, comprovando que de fato temos pacientes portadores de diabetes *mellitus* e que estes podem ser utilizados como alvo do presente estudo.

Tabela 1. Tabela 1. Histórico das dosagens da Glicemia de Jejum e Hemoglobina Glicada do Grupo 1 – DM1

Paciente	Data da coleta	Glicemia de jejum	HbA1c
Identificação – Sexo – Idade		VR: 70-99mg/dL	VR: 4-6%
0101 - F - 30a	11/06/2016	186	9,2
	27/02/2016	152	8,3
	17/02/2016	165	9,3
0102 - F - 31a	02/06/2016	133	6,7
	30/03/2016	156	10,3
	06/10/2015	351	*
0103 - F - 18a	06/07/2016	137	8,2
	08/04/2015	290	*
	27/02/2014	338	8,0
0105 - M - 18a	14/07/2016	113	11,3
	24/03/2016	239	10,0
	11/12/2015	292	10,4

* representa dosagens ausentes, por motivo dos participantes não terem realizado exames anteriores.
VR = valor de referência; F = sexo feminino; M = sexo masculino; a = idade em anos. Fonte: Pereira, 2017.

Tabela 2. Tabela 2. Histórico das dosagens da Glicemia de Jejum e Hemoglobina Glicada do Grupo Controle – DM1

Paciente	Data da coleta	Glicemia de jejum	HbA1c
Identificação – Sexo – Idade		VR: 70-99mg/dL	VR: 4-6%
C0101 - F - 29a	11/06/2016	84	5,2
	07/02/2016	89	*
	11/10/2015	87	*
C0102 - F - 32a	01/07/2016	84	5,0
	12/06/2015	78	*
	13/02/2015	92	*
C0103 - F - 18a	08/07/2016	74	5,2
	*	*	*
	*	*	*
C0105 - M - 18a	21/07/2016	85	5,4
	*	*	*
	*	*	*

* representa dosagens ausentes, por motivo dos participantes não terem realizado exames anteriores.
VR = valor de referência; F = sexo feminino; M = sexo masculino; a = idade em anos. Fonte: Pereira, 2017.

Outro ponto importante é que todos os pacientes portadores de DM1 tiveram inicialmente sua glicemia em jejum com valores extremamente elevados e ao longo dos meses, até suas últimas coletas, quando uma queda importante, com exceção do 0101, demonstrando que durante esse período houve intervenção clínica para o controle do quadro hiperglicêmico, o que pode ser confirmado nos dados da Tabela 3. Para a hemoglobina glicada, o contrário acontece para os pacientes 0103 e 0105 que tiveram um aumento nos seus resultados, uma diminuição acentuada é notável no 0102 e uma estabilidade no paciente 0101. Esses resultados para HbA1c são interessantes do ponto de vista de refletirem as glicemias anteriores, evidenciando a longa duração dos efeitos da hiperglicemia, mesmo após intervenção terapêutica e tentativa de controle glicêmico.

Tabela 3. Histórico Clínico dos portadores de DM1

Identificação-sexo-idade	Tempo de diagnóstico	Histórico Familiar de DM	Tratamento do DM1
0101-F-30a	11 anos	SIM	Insulina Glargina
0102-F-31a	1 ano e 7 meses	SIM	Insulina NPH e Ultrarrápida
0103-F-18a	16 anos	SIM	Insulina Glargina e Ultrarrápida
0105-M-18a	10 anos	SIM	Insulina NPH e Insulina glulisina

F = sexo feminino; M = sexo masculino; a = idade em anos. Fonte: Pereira, 2017.

É notável que os níveis decrescentes da glicemia em jejum e da hemoglobina glicada (HbA1c) da paciente 0102 em conjunto com as informações relacionadas ao tempo de diagnóstico e a sua idade (Tabela 3) revelam que a descoberta da doença aconteceu na fase adulta configurando possivelmente uma *latent autoimmune diabetes in adults* ou diabetes autoimune latente do adulto (LADA). Tal possível diagnóstico, contudo, não configura um interferente para a análise.

Os resultados do Grupo Controle (Tabela 2) comprovam de forma evidente que os participantes não apresentaram resultados alterados para as dosagens realizadas. Ou seja, todos esses indivíduos são normoglicêmicos nem demonstraram condições de disglicemia (níveis glicêmicos alterados que são compatíveis com pré-diabetes) de acordo com o período de avaliação do estudo.

5.2 Alterações nucleares e cromatínica observadas no diabetes mellitus tipo 1

Primeiramente foi realizada uma análise intragrupo. Os dados mostrados na Figura 1 e Tabelas 4 e 5 demonstram que existe uma imensa variabilidade dos resultados entre os pacientes dentro do mesmo grupo.

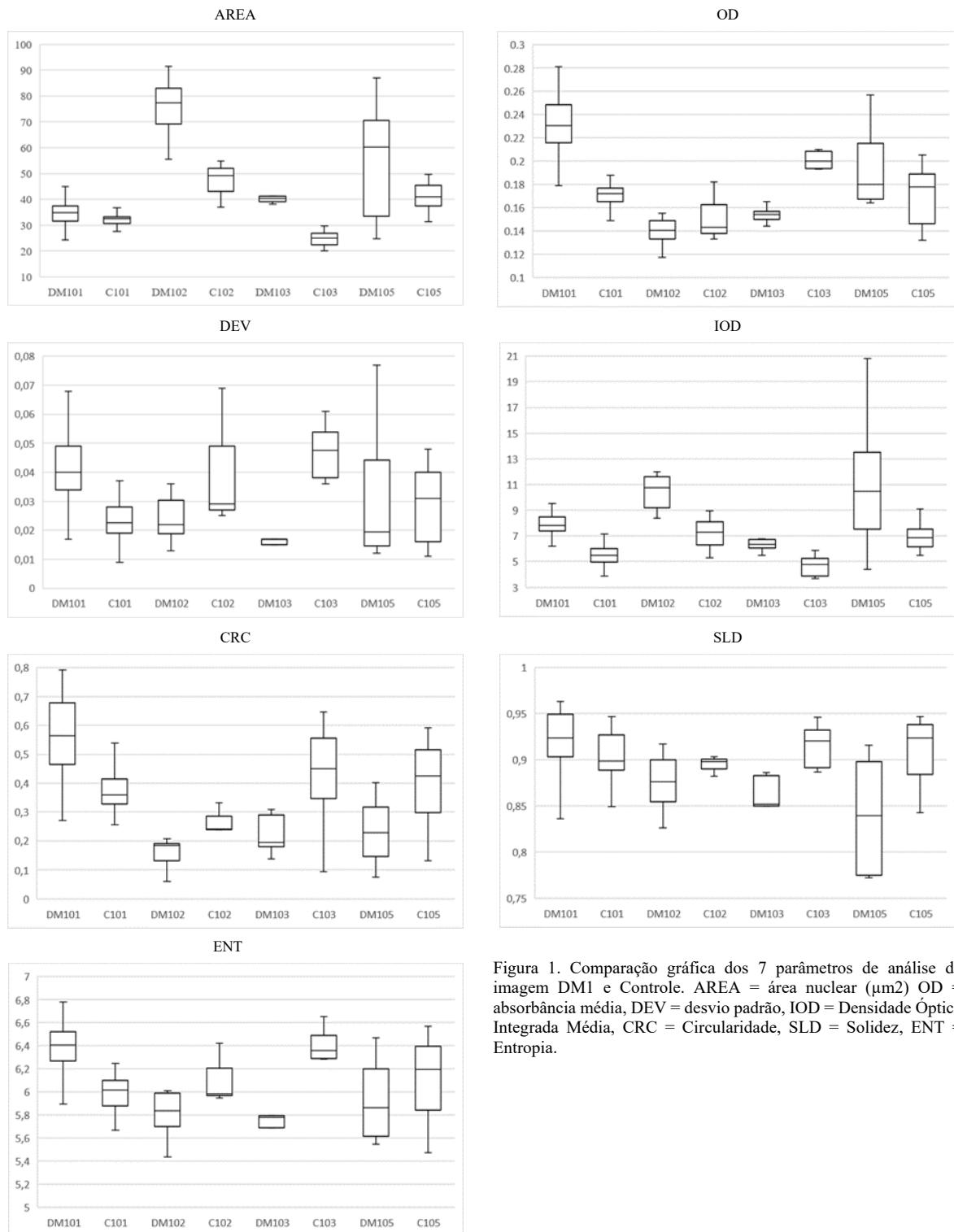


Figura 1. Comparação gráfica dos 7 parâmetros de análise de imagem DM1 e Controle. AREA = área nuclear (μm^2) OD = absorbância média, DEV = desvio padrão, IOD = Densidade Óptica Integrada Média, CRC = Circularidade, SLD = Solidez, ENT = Entropia.

Tabela 4. Comparações Intragrupo do Grupo DM1

Grupos	<i>n</i>	Teste de Hipótese (p-valor)	Amplitude do Efeito	Interpretação	Intervalo de confiança (C.I.95)	
					Inferior	Superior
Área		Wilcox	Δ			
101X102	50/10	0	-1	Muito grande	-1	-1
101X103	50/5	0	-0,77	Muito grande	-0,91	-0,45
101X105	50/8	0,6	-0,43	Muito grande	-0,86	0,1
102X103	10/5	0	1	Muito grande	1	1
102X105	10/8	0,4	0,5	Muito grande	-0,02	0,9
103X105	5/8	0,28	-0,25	Médio	-0,75	0,5
OD		Wilcox	Δ			
101X102	50/10	0	1	Muito grande	1	1
101X103	50/5	0	1	Muito grande	1	1
101X105	50/8	0,5	0,57	Muito grande	0,11	0,98
102X103	10/5	0	-0,72	Muito grande	-1	-0,28
102X105	10/8	0	-1	Muito grande	-1	-1
103X105	5/8	0	-0,95	Muito grande	-1	-0,7
Desvio Padrão		Wilcox	Δ			
101X102	50/10	0	0,75	Muito grande	0,49	0,91
101X103	50/5	0	0,96	Muito grande	0,9	1
101X105	50/8	0,62	0,4	Muito grande	-0,14	0,96
102X103	10/5	0,04	0,62	Muito grande	0,16	1
102X105	10/8	0,98	0,04	Minúsculo	-0,58	0,65
103X105	5/8	0,54	-0,32	Grande	-0,8	0,3
IOD		Wilcox	Δ			
101X102	50/10	0	-0,88	Muito grande	-0,99	-0,72
101X103	50/5	0	0,9	Muito grande	0,79	0,99
101X105	50/8	0,24	-0,41	Muito grande	-0,98	0,26
102X103	10/5	0	1	Muito grande	1	1
102X105	10/8	0,94	0	Minúsculo	-0,55	0,68
103X105	5/8	0,05	-0,5	Muito grande	-1	0,25
Circularidade		Wilcox	Δ			
101X102	50/10	0	1	Muito grande	1	1
101X103	50/5	0	0,96	Muito grande	0,87	1
101X105	50/8	0	0,92	Muito grande	0,78	1
102X103	10/5	0,18	-0,48	Muito grande	-1	0,12
102X105	10/8	0,22	-0,38	Grande	-0,88	0,35
103X105	5/8	0,9	-0,05	Pequeno	-0,65	0,6
Solidez		Wilcox	Δ			
101X102	50/10	0	0,75	Muito grande	0,56	0,92
101X103	50/5	0	0,9	Muito grande	0,76	0,98
101X105	50/8	0	0,76	Muito grande	0,5	0,96
102X103	10/5	0,18	0,26	Médio	-0,28	0,8
102X105	10/8	0,22	0,3	Médio	-0,28	0,8
103X105	5/8	0,9	0,05	Pequeno	-0,55	0,7
Entropia		Kruskal-Wallis	<i>g</i>			
101X102	50/10	0,0000	2,3	Grande	1,51	3,08
101X103	50/5	0,0000	2,66	Grande	1,62	3,69
101X105	50/8	0,0004	1,65	Grande	0,84	2,44
102X103	10/5	1	0,5	Médio	-0,53	1,52
102X105	10/8	1	-0,41	Pequeno	-1,3	0,49
103X105	5/8	0,6632	-0,67	Médio	-1,73	0,42

Testes de Hipótese considerando diferença estatística para $p < 0,05$. $\Delta = \text{Delta de Cliff}$ e $g = g$ de Hedge. Interpretação da amplitude de efeito segue as seguintes graduações: Muito grande, grande, médio, pequeno e minúsculo efeito para o Delta de Cliff. E grande, médio, pequeno e minúsculo efeito para o g de Hedge.

Tabela 5. Comparações Intragrupo do Grupo Controle para DM1

Grupos	<i>n</i>	Teste de Hipótese (p-valor)	Amplitude do Efeito	Interpretação	Intervalo de confiança (C.I.95)	
					Inferior	Superior
Área		Kruskal-Wallis	<i>g</i>			
C101XC102	18/3	0,0060	-2,2	Grande	-3,54	-0,81
C101XC103	18/10	0	1,32	Grande	0,48	2,15
C101XC105	18/9	0	-1,41	Grande	-2,26	-0,53
C102XC103	3/10	0,0020	3,68	Grande	1,71	5,58
C102XC105	3/9	0,1798	0,83	Médio	-0,45	2,07
C103XC105	10/9	0	-2,95	Grande	-4,24	-1,63
OD		Kruskal-Wallis	<i>g</i>			
C101XC102	18/3	0,8527	1,26	Grande	0	2,48
C101XC103	18/10	0,0375	-0,96	Grande	-1,75	-0,16
C101XC105	18/9	1	0,06	Minúsculo	-0,72	0,83
C102XC103	3/10	0,0399	-1,03	Grande	-2,29	0,26
C102XC105	3/9	0,4729	-0,62	Médio	-1,84	0,63
C103XC105	10/9	0,3845	0,74	Médio	-0,16	1,63
Desvio Padrão		Wilcox	Δ			
C101XC102	18/3	0,06	-0,56	Médio	-1	0
C101XC103	18/10	0,01	-0,59	Médio	-1	0
C101XC105	18/9	0,34	-0,25	Pequeno	-0,74	0,31
C102XC103	3/10	0,64	-0,13	Minúsculo	-1	0,8
C102XC105	3/9	0,5	0,19	Minúsculo	-0,63	1
C103XC105	10/9	0,05	-0,19	Minúsculo	-1	0,63
IOD		Kruskal-Wallis	<i>g</i>			
C101XC102	18/3	0,1267	-1,39	Grande	-2,63	-0,13
C101XC103	18/10	0,0695	0,79	Médio	0	1,56
C101XC105	18/9	0,0046	-1,28	Grande	-2,12	-0,42
C102XC103	3/10	0,0048	2,21	Grande	0,67	3,69
C102XC105	3/9	1	0,2	Pequeno	-1,02	1,4
C103XC105	10/9	0	-2,24	Grande	-3,37	-1,09
Circularidade		Kruskal-Wallis	<i>g</i>			
C101XC102	18/3	0,3623	0,81	Médio	0,33	1
C101XC103	18/10	0,9335	-0,28	Pequeno	-0,76	0,19
C101XC105	18/9	1	-0,15	Minúsculo	-0,64	0,37
C102XC103	3/10	0,1227	-0,53	Médio	-0,93	0
C102XC105	3/9	0,2443	-0,48	Médio	-1	0,11
C103XC105	10/9	1	0,11	Minúsculo	-0,51	0,58
Solidez		Wilcox	Δ			
C101XC102	18/3	0,36	0,24	Pequeno	-0,33	0,78
C101XC103	18/10	0,59	-0,11	Minúsculo	-0,6	0,36
C101XC105	18/9	0,47	-0,09	Minúsculo	-0,64	0,44
C102XC103	3/10	0,36	-0,47	Médio	-1	0,07
C102XC105	3/9	0,22	-0,41	Médio	-1	0,19
C103XC105	10/9	0,82	-0,09	Minúsculo	-0,6	0,49
Entropia		Kruskal-Wallis	<i>g</i>			
C101XC102	18/3	1	-0,6	Minúsculo	-1,78	0,6
C101XC103	18/10	0,0341	-0,66	Médio	-1,43	0,11
C101XC105	18/9	0,5218	-0,47	Médio	-1,25	0,32
C102XC103	3/10	0,9979	-0,22	Médio	-1,42	0,99
C102XC105	3/9	1	0,004	Minúsculo	-1,2	1,21
C103XC105	10/9	0,8914	0,25	Pequeno	-0,62	1,11

Testes de Hipótese considerando diferença estatística para $p<0,05$. $\Delta = \text{Delta de Cliff}$ e $g = g \text{ de Hedge}$. Interpretação da amplitude de efeito segue as seguintes graduações: Muito grande, grande, médio, pequeno e minúsculo efeito para o Delta de Cliff. E grande, médio, pequeno e minúsculo efeito para o g de Hedge. n indica número de núcleos de cada paciente.

Desta forma, qualquer análise estatística posterior deveria ser realizada comparando-se sempre um paciente diabético com seu respectivo controle de idade e sexo, ao invés de uma comparação grupo controle x grupo diabético como um todo. É possível observar, por exemplo, as duas pacientes controle, C101 e C102 que, de acordo com a tabela 3, possuem idades semelhantes, e mesmo assim, apresentam imensa variação nos parâmetros morfométricos de núcleos de monócitos.

Com base nesses resultados, foi proposta uma análise dos grupos diabéticos comparados com seus controles de forma pareada utilizando as medianas para cada indivíduo, e para cada um dos parâmetros nucleares avaliados (Tabela 6).

Tabela 6. Comparação pareada das medianas dos grupos DM1 vs Controle

Parâmetro	p	Psdep (X>Y)	Psdep (Y>X)
Área	0,125	1,00	0,00
OD	0,875	0,25	0,25
DEV	0,125	0,25	0,75
IOD	0,125	1,00	0,00
CRC	0,625	0,25	0,75
SLD	0,375	0,25	0,75
ENT	0,125	0,25	0,75

Área = área nuclear (μm^2), OD = Absorbância Média, DEV = Desvio Padrão, IOD = Densidade Óptica Integrada, CRC = Circularidade, SLD = Solidez, ENT = Entropia. Psdep = Probabilidade de superioridade para amostras dependentes. X = DM1, Y = Controle (CDM1). Todos os parâmetros foram comparados utilizando o Teste de Wilcoxon ($p<0,05$).

É possível observar que não há, para qualquer dos parâmetros avaliados, resultados estatisticamente significantes do ponto de vista de diferenças entre as medianas. Contudo, a probabilidade de superioridade evidenciou que para as áreas nucleares, todos os diabéticos apresentaram medianas maiores que as dos indivíduos do grupo controle, sendo essa superioridade observada também para a IOD, uma vez que áreas maiores podem estar associadas com alterações proporcionais no conteúdo Feulgen-DNA. Exceto pela absorbância média encontrada por núcleo (OD), onde não houve qualquer diferença entre os grupos, mesmo do ponto de vista de tamanho do efeito, para os demais parâmetros, 3 em cada 4 indivíduos do grupo controle apresentaram medianas superiores. Dessa forma, há indícios de que o diabetes esteja associado com aumento de conteúdo de DNA nos monócitos de sangue periférico, aumento este associado com áreas nucleares maiores, presumivelmente, sem alterações no grau de compactação da cromatina (OD), mas com mudanças na forma dos núcleos, através da diminuição da circularidade e da solidez, havendo também alteração na distribuição cromatínica no núcleo, com aumento de homogeneidade, sendo esta constatação corroborada pela possível diminuição do desvio padrão dos níveis de cinza (DEV) e da entropia nucleares (Figura 2).

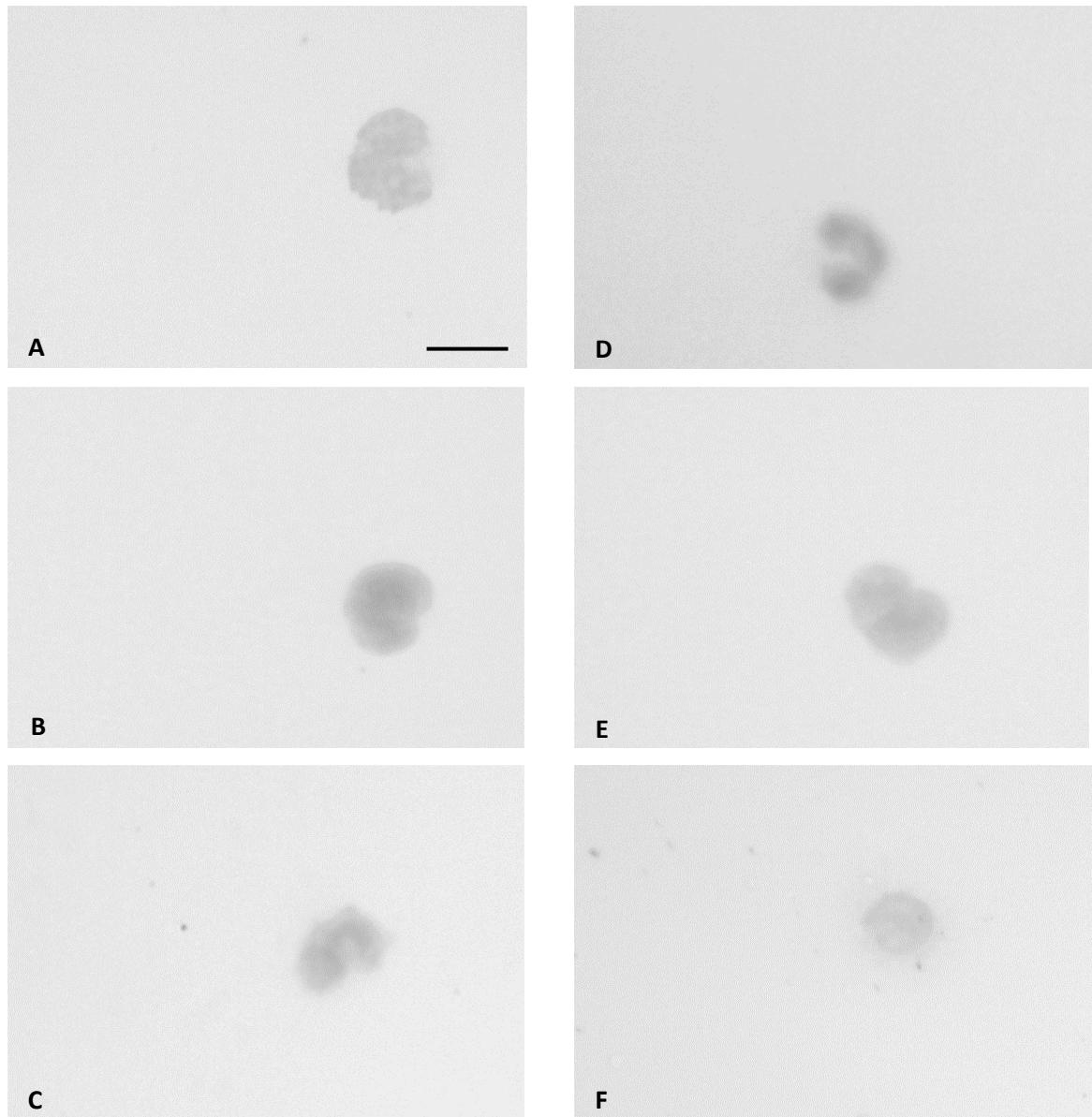


Figura 2. Imagens dos núcleos de monócitos DM1 e Controle corados com Feulgen. As imagens foram convertidas em escala de cinza. Os pacientes portadores de DM1 são representados por A, B e C e não portadores – controles por D, E e F. É possível observar o tamanho do núcleo A em relação a D, apresentando maior área. Em B nota-se a cromatina homogeneamente distribuída em relação a E. O núcleo C, bem como A e B reforçam os resultados obtidos que apontam núcleos menos circulares sem alteração drástica da solidez em relação aos núcleos controles que tendem a ser mais circulares como em F. A barra equivale a 10 μ m.

De forma a confirmar os resultados obtidos nessa análise, propôs-se então comparar, sempre de cada paciente com seu respectivo controle, os dados obtidos a partir de cada núcleo, individualmente, e não mais utilizando uma mediana do parâmetro, mas os dados totais. Os resultados dessa análise estão summarizados na Tabela 7.

Tabela 7. Comparações Intergrupo DM1 vs Controle

Comparação	<i>n</i>	Teste	<i>p</i>	Amplitude do Efeito		
				Índice	valor	I.C
Área						
DM101xC101	50/18	W	0,1000	Δ	0,30 (médio)	0,01 a 0,61
DM102xC102	10/3	W	0,0000	<i>g</i>	2,31 (grande)	0,62 a 3,68
DM103xC103	10/5	W	0,0000	<i>g</i>	1,22 (grande)	0,06 a 2,38
DM105xC105	8/9	MW	<0,001	<i>g</i>	0,87 (grande)	-0,13 a 1,86
OD						
DM101xC101	50/18	ST	<0,001	<i>d</i>	3,94 (grande)	3,02 a 4,84
DM102xC102	10/3	MW	0,4990	<i>g</i>	0,34 (pequeno)	-0,96 a 1,64
DM103xC103	10/5	W	0,0000	<i>g</i>	0,47 (médio)	-0,61 a 1,57
DM105xC105	8/9	W	0,4800	<i>g</i>	0,40 (pequeno)	-0,56 a 1,36
DEV						
DM101xC101	50/18	W	0,0000	Δ	0,76 (grande)	0,60 a 0,89
DM102xC102	10/3	MW	0,1763	<i>g</i>	0,34 (pequeno)	-0,96 a 1,64
DM103xC103	10/5	W	0,0000	<i>g</i>	0,48 (médio)	-0,61 a 1,56
DM105xC105	8/9	MW	1,0000	<i>g</i>	0,40 (pequeno)	-0,56 a 1,36
IOD						
DM101xC101	50/18	W	0,0000	Δ	0,94 (grande)	0,87 a 0,99
DM102xC102	10/3	MW	0,0280	<i>g</i>	0,47 (médio)	-0,83 a 1,77
DM103xC103	10/5	MW	0,0033	<i>g</i>	0,52 (médio)	-0,57 a 1,61
DM105xC105	8/9	W	0,0000	<i>g</i>	0,55 (médio)	-0,42 a 1,52
CRC						
DM101xC101	50/18	ST	<0,001	Δ	0,81 (grande)	0,33 a 1,00
DM102xC102	10/3	W	0,0000	<i>g</i>	0,34 (pequeno)	-0,96 a 1,63
DM103xC103	10/5	W	0,0100	<i>g</i>	0,47 (médio)	-0,62 a 1,56
DM105xC105	8/9	W	0,0400	<i>g</i>	0,39 (pequeno)	-0,57 a 1,35
SLD						
DM101xC101	50/18	MW	0,0188	Δ	0,36 (pequeno)	0,09 a 0,63
DM102xC102	10/3	W	0,3105	<i>g</i>	0,34 (pequeno)	-0,96 a 1,64
DM103xC103	10/5	MW	0,9500	<i>g</i>	0,47 (médio)	-0,61 a 1,56
DM105xC105	8/9	MW	0,0269	<i>g</i>	0,40 (pequeno)	-0,57 a 1,36
ENT						
DM101xC101	50/18	ST	<0,001	<i>d</i>	1,66 (grande)	1,05 a 2,26
DM102xC102	10/3	MW	0,1763	<i>g</i>	0,33 (pequeno)	-0,97 a 1,62
DM103xC103	10/5	W	0,0000	<i>g</i>	0,46 (médio)	-0,63 a 1,55
DM105xC105	8/9	MW	0,3359	<i>g</i>	0,39 (pequeno)	-0,57 a 1,35

Foram utilizados códigos para representar cada paciente do Grupo DM1 = DM101, DM102, DM103, DM105. E para o Grupo Controle = C101, C102, C103, C105. *n* = número total de núcleos de monócitos avaliados. Área = área nuclear (μm^2), OD = Absorbância Média, DEV = Desvio Padrão, IOD = Densidade Óptica Integrada, CRC = Circularidade, SLS = Solidez, ENT = Entropia. Testes de Hipóteses ($p<0,05$) abreviados: W = Wilcox, MW = Mann-Whitney e ST = Teste t simples. Amplitude do Efeito (Effect Size) representados pelas letras e símbolos: Δ = Delta de Cliff, *d* = *d* de Cohen e *g* = *g* de Hedge. I.C. = Intervalo de Confiança em 95%.

Essa análise mais detalhada, paciente a paciente, diferentemente da análise dos grupos como um todo, permite concluir que a glicemia em si, parece não exercer um efeito direto nos parâmetros de análise morfométrica empregados aqui. A exceção reside nas áreas nucleares, cujo aumento significativo do ponto de vista estatístico pode estar associado com o nível de glicemia observado ao longo do tempo nos pacientes avaliados, sendo as maiores diferenças de área nuclear diabético x controle, aquelas associadas com valores maiores de glicemia, mesmo após queda desta após tratamento, confirmando um estado de memória metabólica onde os efeitos da hiperglicemia permanecem por longo tempo, mesmo que os níveis glicêmicos tenham sido normalizados após intervenção terapêutica. O único paciente diabético que apresenta incrementos mais modestos de área nuclear, onde cerca de 30% dos núcleos apresentam áreas nucleares maiores que as observadas no respectivo controle, é o DM101, que é, previsivelmente, a paciente com os menores valores de glicemia no histórico geral de acompanhamento (Tabela 1). Interessantemente, e diferente dos demais sujeitos avaliados, essa paciente diabética apresentou grande aumento do grau de compactação cromatínica (OD), e consequentemente do conteúdo Feulgen-DNA (IOD), uma vez que este é o produto da integração da densidade óptica média de cada núcleo pela área nuclear, apresentando também redistribuição cromatínica considerável, levando ao aumento do desvio padrão dos níveis de cinza por núcleo e da entropia, associados com alteração do formato nuclear, com reflexo na circularidade, mas não na solidez.

Dessa forma, nos demais pacientes, cujas glicemias são em geral as mais altas, mesmo quando são detectadas alterações nesses parâmetros que sejam estatisticamente significativas nos testes de hipóteses, quando avaliadas do ponto de vista de tamanho do efeito, são de baixa relevância do ponto de vista biológico, sendo alterações, portanto, muito pequenas ou pouco comuns entre a população nuclear. Se elas pudessem ser confirmadas, em essência, possivelmente apontariam correlação positiva entre o diabetes e aumento de todos os parâmetros avaliados, sendo os aumentos de área nuclear os únicos confirmados estatisticamente.

Por outro lado, é importante levar em consideração que a paciente 01 é a única a receber injeções de insulina de ação lenta, neste caso, Glargin, enquanto os demais pacientes recebem insulina de ação intermediária (NPH) ou a própria Glargin, mas em associação com uma insulina de ação ultrarrápida, como por exemplo a Glulisina. Os níveis insulinêmicos observáveis para cada um desses tipos de tratamentos podem ser observados na Figura 3.

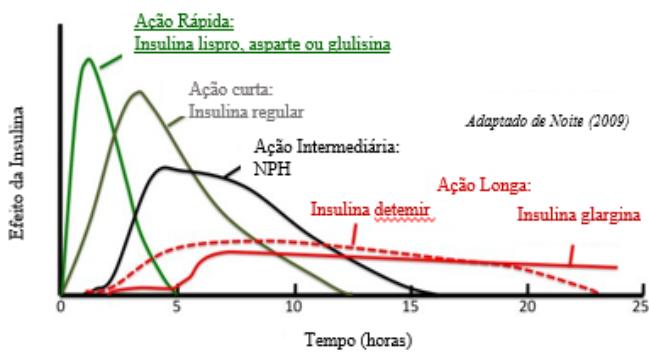


Figura 3. Curvas de insulina associadas a diferentes tratamentos com insulina exógena (Chatterjee et al, 2017).

A paciente 01 é a única a receber Glarginha de forma exclusiva, tendo níveis mais baixos, porém mais duradouros de insulina, diferentemente dos demais tratamentos, cujos picos de insulina de ação ultrarrápida, rápida, ou intermediária, lembram mais o perfil de secreção de insulina observado em um indivíduo não diabético. Dessa forma, à exceção das áreas nucleares, enquanto as alterações decorrentes do diabetes nos pacientes 02 a 05 são fracas, talvez em virtude do tratamento insulínico de ação rápida, no caso da paciente 01, a única com perfil insulínico possivelmente bem diferente dos demais pacientes, as alterações nucleares e cromatínicas são evidentes, o que aponta, no caso desta paciente, para efeitos associados à insulinemia em detrimento da glicemia.

5.4 Condições clínico-laboratoriais dos portadores de DM2 e seus controles

Os resultados obtidos das dosagens de glicemia em jejum e hemoglobina glicada demonstram que os pacientes portadores de diabetes *mellitus* tipo 2 (Grupo DM2) durante o período avaliado estão hiperglicemiantes (Tabela 8), apesar de apenas 3 dos 5 pacientes apresentarem níveis de hemoglobina glicada acima da faixa de referência considerada normal. Já os indivíduos não portadores de diabetes apresentam normoglicemia (Tabela 9). Os dados dos pacientes DM2 se confirmam através das informações relacionadas ao histórico clínico desses indivíduos (Tabela 10). Portanto, o grupo DM2 e o seu grupo controle cumprem com os requisitos para as análises alvo deste estudo.

Tabela 8. Histórico das dosagens da glicemia de jejum e hemoglobina glicada do grupo diabetes – DM2

Paciente	Data da coleta	Glicemia de jejum	HbA1c
Identificação – Sexo – Idade		VR: 70-99mg/dL	VR: 4-6%
0201 – F - 46a	02/06/2016 19/10/2015 23/03/2015	103 115 107	5,9 6,3 *
0202- F - 55a	03/06/2016 24/05/2016 20/05/2015	114 139 140	5,8 * 6,0
0203- F - 55a	06/06/2016 09/11/2015 02/03/2015	187 212 144	8,0 9,4 *
0204- F - 55a	06/06/2016 05/02/2015 29/10/2014	165 146 188	8,7 9,2 10,2
0205- M - 55a	11/06/2016 17/05/2016 13/02/2015	131 120 173	11,1 12,4 11,5

* representa dosagens ausentes, por motivo dos participantes não terem realizado exames anteriores.

VR = valor de referência; F = sexo feminino; M = sexo masculino; a = idade em anos

Tabela 9. Histórico das dosagens da glicemia de jejum e hemoglobina glicada do grupo controle – DM2

Paciente	Data da coleta	Glicemia de jejum	HbA1c
Identificação – Sexo – Idade		VR: 70-99mg/dL	VR: 4-6%
C0201 - F - 46a	13/06/2016 18/09/2015 11/11/2014	91 91 88	5,2 - -
C0202 - F - 55a	20/06/2016 09/06/2016 05/06/2015	97 94 101	- 6,1 -
C0203 - F - 55a	01/07/2016	75	5,0
C0204 - F 55a	20/07/2016	79	5,2
C0205 – M 55a	08/07/2016	95	5,9

* representa dosagens ausentes, por motivo dos participantes não terem realizado exames anteriores.

VR = valor de referência; F = sexo feminino; M = sexo masculino; a = idade em anos

Tabela 10. Histórico Clínico dos portadores de DM2

Identificação-sexo-idade	Tempo de diagnóstico	Histórico Familiar de DM	Tratamento DM2
0201-F-46a	4 anos	SIM	Medicamento oral
0202-F-55a	10 anos	SIM	Medicamento oral
0203-F-55a	5 anos	SIM	Medicamento oral
0204-F-55a	12 anos	SIM	Medicamento oral + insulina
0205-M-55a	12 anos	SIM	Medicamento oral + insulina

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

Ao contrário do que ocorreu com os pacientes do Grupo DM1, as glicemias em jejum não atingem picos de valores exacerbados para esse grupo. Inclusive, contendo dois pacientes (0201 e 0202) que apresentam resultados que caem ao longo do tempo e atingindo valores que são muito próximos ou dentro das metas terapêuticas para ambos os analitos.

E conforme observado nos resultados do Grupo Controle (Tabela 9), confirma-se de forma evidente que os participantes não apresentaram resultados alterados para as dosagens realizadas. Assim como os participantes para o controle do DM1, todos esses indivíduos são normoglicêmicos e não demonstraram condições de disglicemia (níveis glicêmicos alterados que são compatíveis com pré-diabetes) de acordo com o período de avaliação do estudo.

5.5 Alterações nucleares e cromatínicas observadas no diabetes *mellitus* tipo 2

Quanto aos resultados das análises intragrupo para as medianas, onde os indivíduos de um mesmo grupo foram comparados entre si, ficam evidentes, para todos os parâmetros avaliados, seja dos pacientes diabéticos (Tabela 11) ou dos participantes não portadores de DM2 (Tabela 12), diferenças claras que também podem ser visualizadas na Figura 4. Os indivíduos dentro do mesmo grupo possuem, portanto, variações que são bastante visíveis, o que confirma a necessidade se utilizar controles pareados para idade e sexo, e de se fazer uma comparação de cada paciente diabético com seu respectivo controle, ao invés de uma comparação não pareada do grupo experimental como um todo com o grupo controle.

Tabela 11. Comparações Intragrupo do Grupo DM2

Grupos	<i>n</i>	Teste de Hipótese (p-valor)	Amplitude do Efeito	Interpretação	Intervalo de confiança (C.I 95)	
					Inferior	Superior
Área		Wilcox	Δ			
201x202	41/4	0	-0,93	Muito grande	-1,00	-0,80
201x203	41/14	0,26	-0,25	Médio	-0,70	0,18
201x204	41/37	0	-0,35	Grande	-0,57	-0,11
201x205	41/24	0	-0,91	Muito grande	-0,99	-0,79
202x203	4/14	0,2	0,46	Muito grande	-0,14	0,82
202x204	4/37	0	0,95	Muito grande	0,84	1,00
202x205	4/24	0,61	-0,91	Muito grande	-0,99	-0,80
203x204	14/37	0,5	0,22	Pequeno	-0,27	0,71
203x205	14/24	0,12	-0,38	Grande	-0,77	0,03
204x205	37/24	0	-0,88	Muito grande	-0,98	-0,77
OD		Wilcox	Δ			

201x202	41/4	0	0,73	Muito grande	0,38	1,00
201x203	41/14	0,26	0,97	Muito grande	0,89	1,00
201x204	41/37	0	0,98	Muito grande	0,92	1,00
201x205	41/24	0	1,00	Muito grande	1,00	1,00
202x203	4/14	0,2	0,25	Pequeno	-0,50	1,00
202x204	4/37	0	0,24	Pequeno	-0,58	0,95
202x205	4/24	0,6	0,70	Muito grande	0,15	1,00
203x204	14/37	0,5	0,18	Pequeno	-0,22	0,57
203x205	14/24	0,13	0,82	Muito grande	0,61	0,96
204x205	37/24	0	0,72	Muito grande	0,55	0,89
Desvio Padrão		Wilcox	Δ			
201x202	41/4	0,97	0,02	Minúsculo	-0,81	0,90
201x203	41/14	0	0,72	Muito grande	0,43	0,94
201x204	41/37	0,12	0,23	Médio	-0,03	0,47
201x205	41/24	0,07	0,34	Grande	0,03	0,60
202x203	4/14	0,21	0,38	Grande	-0,39	1,00
202x204	4/37	0,85	0,07	Minúsculo	-0,87	0,89
202x205	4/24	0,71	0,19	Médio	-0,74	1,00
203x204	14/37	0	-0,63	Muito grande	-0,93	-0,35
203x205	14/24	0,02	-0,49	Muito grande	-0,81	-0,19
204x205	37/24	0,45	0,14	Médio	-0,14	0,44
IOD		Wilcox	Δ			
201x202	41/4	0,10	-0,50	Muito grande	-0,98	0,22
201x203	41/14	0,31	0,21	Médio	-0,27	0,54
201x204	41/37	0	0,77	Muito grande	0,61	0,90
201x205	41/24	0,01	0,49	Muito grande	0,21	0,70
202x203	4/14	0,04	0,64	Muito grande	0,03	1,00
202x204	4/37	0	0,96	Muito grande	0,84	1,00
202x205	4/24	0,10	0,75	Muito grande	0,29	1,00
203x204	14/37	0,49	0,24	Médio	-0,25	0,66
203x205	14/24	0,96	0,07	Pequeno	-0,45	0,51
204x205	37/24	0,02	-0,45	Muito grande	-0,71	-0,16
Circularidade		Kruskal-Wallis	g			
201x202	41/4	0,09	1,67	Grande	0,59	2,73
201x203	41/14	0	1,42	Grande	0,76	2,07
201x204	41/37	1,00	0,30	Pequeno	-0,27	0,88
201x205	41/24	0,01	1,01	Grande	0,41	1,61
202x203	4/14	1,00	-0,10	Pequeno	-1,16	0,96
202x204	4/37	0,32	-1,10	Grande	-2,19	0,02
202x205	4/24	1,00	-0,52	Médio	-1,58	0,55
203x204	14/37	0	-0,95	Grande	-1,69	-0,21

203x205	14/24	0,49	-0,39	Pequeno	-1,10	0,32
204x205	37/24	0,12	0,62	Médio	-0,08	1,30
<hr/>						
Solidez		Wilcox	Δ			
201x202	41/4	0,08	0,38	Grande	-0,39	1,00
201x203	41/14	0,01	0,55	Muito grande	0,23	0,85
201x204	41/37	0,13	0,18	Médio	-0,12	0,44
201x205	41/24	0,08	0,25	Médio	-0,05	0,51
202x203	4/14	0,70	-0,04	Minúsculo	-1,00	0,72
202x204	4/37	0,13	-0,24	Médio	-1,00	0,51
202x205	4/24	0,32	-0,20	Médio	-0,92	0,60
203x204	14/37	0,01	-0,47	Muito grande	-0,78	-0,07
203x205	14/24	0,09	-0,37	Grande	-0,69	0,02
204x205	37/24	0,37	0,10	Pequeno	-0,18	0,42
<hr/>						
Entropia		Wilcox	Δ			
201x202	41/4	0,10	0,49	Muito grande	-0,07	0,99
201x203	41/14	0	0,70	Muito grande	0,37	0,93
201x204	41/37	0,35	0,10	Pequeno	-0,17	0,38
201x205	41/24	0,02	0,46	Muito grande	0,23	0,65
202x203	4/14	0,58	0,21	Médio	-0,57	0,82
202x204	4/37	0,21	-0,42	Muito grande	-0,97	0,14
202x205	4/24	0,49	-0,17	Pequeno	-0,79	0,56
203x204	14/37	0	-0,68	Muito grande	-0,96	-0,37
203x205	14/24	0,01	-0,44	Muito grande	-0,77	0,02
204x205	37/24	0,09	0,36	Grande	0,04	0,63

Testes de Hipótese considerando diferença estatística para $p<0,05$. Δ = Delta de Cliff e $g = g$ de Hedge. Interpretação da amplitude de efeito segue as seguintes graduações: Muito grande, grande, médio, pequeno e minúsculo efeito para Δ , e grande, médio, pequeno e minúsculo efeito para g . Intervalos de confiança máximos e mínimos em 95%.

Tabela 12. Comparações Intragrupos do Grupo Controle DM2

Grupos	n	Teste de Hipótese (p-valor)	Amplitude do Efeito	Interpretação	Intervalo de confiança (C.I 95)	
					Inferior	Superior
Área		Kruskal-Wallis	g			
C201XC202	10/8	0	-1,93	Grande	-3,01	-0,8
C201XC203	10/13	0	-1,88	Grande	-2,84	-0,89
C201XC204	10/3	0,03	-1,72	Grande	-3,08	-0,29
C201XC205	10/10	0	1,36	Grande	0,40	2,30
C202XC203	8/13	0,01	-0,88	Grande	-1,76	0,02
C202XC204	8/3	0,22	0,18	Minúsculo	-1,04	1,39
C202XC205	8/10	0	2,52	Grande	1,26	3,74
C203XC204	13/3	0,01	0,87	Grande	-0,37	2,09
C203XC205	13/10	0	2,31	Grande	1,24	3,35
C204XC205	3/10	0	2,18	Grande	0,65	3,64
OD		Kruskal-Wallis	g			

C201XC202	10/8	1,00	-1,93	Grande	-3,01	-0,80
C201XC203	10/13	0,03	-1,88	Grande	-2,84	-0,89
C201XC204	10/3	1,00	-1,72	Grande	-3,08	-0,29
C201XC205	10/10	0	1,36	Grande	0,40	2,30
C202XC203	8/13	0,01	-0,88	Grande	-1,76	0,02
C202XC204	8/3	1,00	0,97	Grande	-0,34	2,24
C202XC205	8/10	0,05	-1,41	Grande	-2,40	-0,38
C203XC204	13/3	1,00	-0,64	Médio	-1,84	0,58
C203XC205	13/10	0	-2,70	Grande	-3,82	-1,55
C204XC205	3/10	0,01	-2,45	Grande	-3,99	-0,85
Desvio Padrão		Kruskal-Wallis	<i>g</i>			
C201XC202	10/8	1,00	0,280	Pequeno	-0,62	1,16
C201XC203	10/13	1,00	0,120	Minúsculo	-0,67	0,92
C201XC204	10/3	1,00	0,140	Minúsculo	-1,06	1,34
C201XC205	10/10	1,00	-0,460	Médio	-1,31	0,39
C202XC203	8/13	1,00	-0,130	Minúsculo	-0,98	0,72
C202XC204	8/3	1,00	-0,140	Minúsculo	-1,35	1,08
C202XC205	8/10	0,44	-0,720	Médio	-1,63	0,21
C203XC204	13/3	1,00	0,007	Minúsculo	-1,18	1,19
C203XC205	13/10	0,61	-0,550	Médio	-1,36	0,27
C204XC205	3/10	1,00	-0,580	Médio	-1,79	0,66
IOD		Wilcox	Δ			
C201XC202	10/8	0	-1,00	Muito grande	-1,00	-1,00
C201XC203	10/13	0,08	-0,89	Muito grande	-0,96	-0,74
C201XC204	10/3	0,57	-0,33	Médio	-0,81	0,40
C201XC205	10/10	0,72	-0,10	Pequeno	-0,55	0,40
C202XC203	8/13	0,20	0,10	Pequeno	-0,40	0,55
C202XC204	8/3	0,49	0,17	Pequeno	-0,56	0,75
C202XC205	8/10	0	0,90	Pequeno	0,73	0,97
C203XC204	13/3	0,85	-0,03	Minúsculo	-0,65	0,62
C203XC205	13/10	0,11	0,77	Muito grande	0,49	0,91
C204XC205	3/10	0,58	0,40	Muito grande	0,49	0,91
Circularidade		Wilcox	Δ			
C201XC202	10/8	0,49	0,20	Médio	-0,34	0,64
C201XC203	10/13	0,01	0,65	Muito grande	0,28	0,85
C201XC204	10/3	0,02	1,17	Muito grande	-0,14	2,45
C201XC205	10/10	0,07	-0,48	Grande	-0,78	0,00
C202XC203	8/13	0,11	0,44	Grande	-0,05	0,76
C202XC204	8/3	0,33	0,25	Médio	-0,72	1,76
C202XC205	8/10	0,08	-0,50	Grande	-0,80	0,00
C203XC204	13/3	0,44	-0,28	Médio	-0,78	0,43
C203XC205	13/10	0	-0,74	Muito grande	-0,89	-0,43

C204XC205	3/10	0	-0,80	Muito grande	-0,95	-0,31
Solidez	Kruskal-Wallis		<i>g</i>			
C201XC202	10/8	1,00	-0,410	Médio	-1,30	0,49
C201XC203	10/13	0,62	0,920	Grande	0,07	1,75
C201XC204	10/3	1,00	0,120	Pequeno	-1,08	1,32
C201XC205	10/10	1,00	-0,004	Minúsculo	-0,84	0,84
C202XC203	8/13	0,08	1,160	Grande	0,23	2,07
C202XC204	8/3	1,00	0,530	Médio	-0,72	1,76
C202XC205	8/10	1,00	0,200	Pequeno	-0,69	1,08
C203XC204	13/3	1,00	-0,730	Médio	-1,94	0,50
C203XC205	13/10	0,03	-0,650	Médio	-1,46	0,18
C204XC205	3/10	1,00	-0,060	Minúsculo	-1,25	1,15
Entropia	Kruskal-Wallis		<i>g</i>			
C201XC202	10/8	0,13	1,06	Grande	0,09	2,01
C201XC203	10/13	0,27	0,87	Grande	0,02	1,70
C201XC204	10/3	0,52	1,18	Grande	-0,14	2,45
C201XC205	10/10	1,00	0,11	Pequeno	-0,74	0,95
C202XC203	8/13	1,00	-0,38	Médio	-1,23	0,47
C202XC204	8/3	1,00	-0,09	Minúsculo	-1,30	1,13
C202XC205	8/10	0,11	-0,9	Pequeno	-1,82	0,05
C203XC204	13/3	1,00	0,33	Médio	-0,87	1,52
C203XC205	13/10	0,22	-0,69	Médio	-1,50	0,14
C204XC205	3/10	0,46	-0,91	Grande	-2,14	0,37

Testes de Hipótese considerando diferença estatística para $p<0,05$. Δ = Delta de Cliff e $g = g$ de Hedge. Interpretação da amplitude de efeito segue as seguintes graduações: Muito grande, grande, médio, pequeno e minúsculo efeito para Δ , e grande, médio, pequeno e minúsculo efeito para g . Intervalos de confiança máximos e mínimos em 95%.

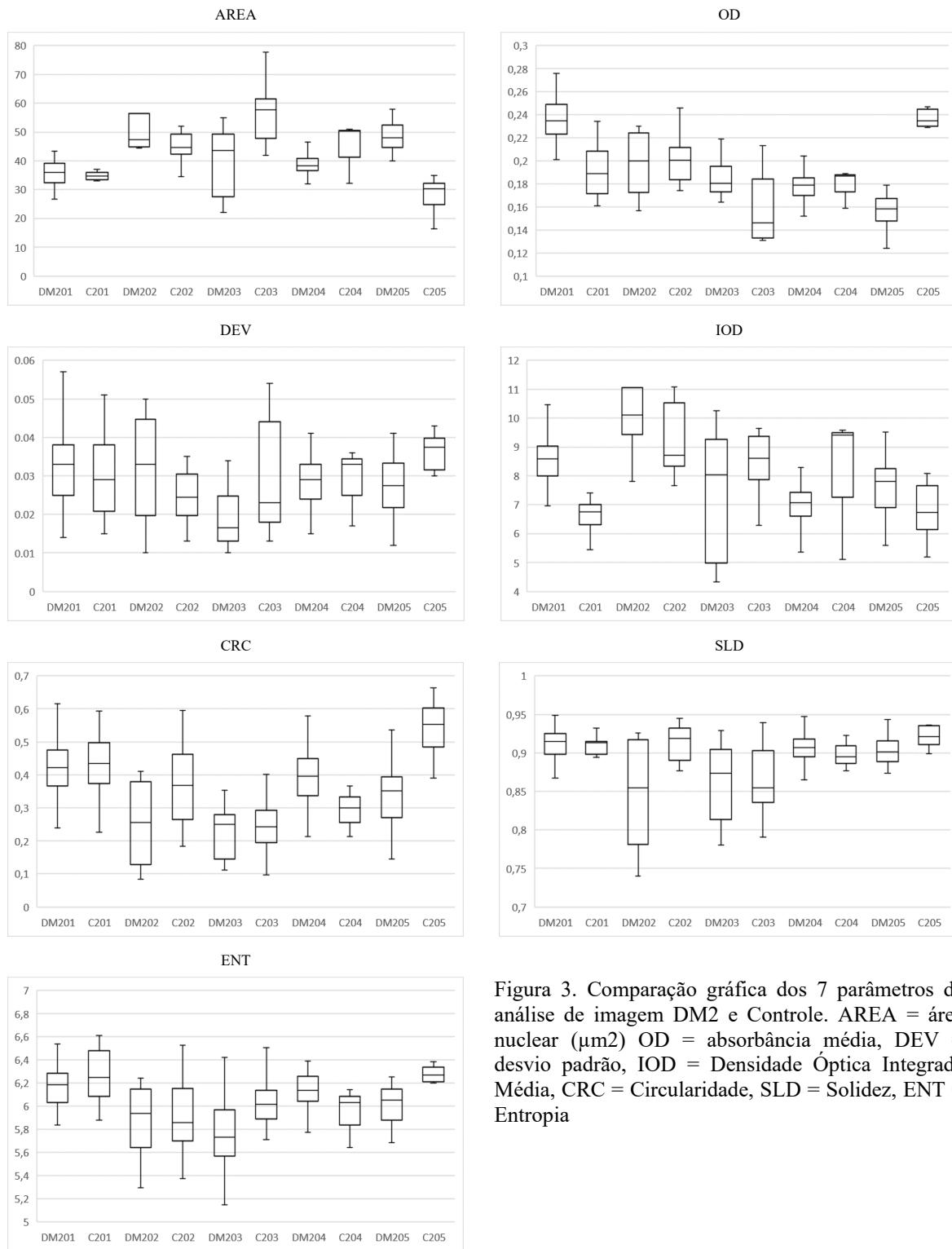


Figura 3. Comparação gráfica dos 7 parâmetros de análise de imagem DM2 e Controle. AREA = área nuclear (μm^2) OD = absorbância média, DEV = desvio padrão, IOD = Densidade Óptica Integrada Média, CRC = Circularidade, SLD = Solidez, ENT = Entropia

Assim como foi realizado para o Grupo DM1 e seus respectivos controles, foi proposta primeiramente uma análise de grupo total dos pacientes diabéticos comparados com seus controles de forma pareada utilizando as medianas para cada indivíduo, para cada um dos parâmetros nucleares avaliados.

Do mesmo modo que ocorreu na análise para DM1, no DM2 não houve, para qualquer um dos parâmetros avaliados, resultados significantes (Tabela 13), assim como a dominância dos valores dos parâmetros dos diabéticos frente aos controles, e vice-versa, também não ultrapassam os 60%, estando, portanto, no limite considerável para alguma diferença relevante.

Tabela 13. Comparação das Medianas dos Grupos DM2 vs Controle

DM2XCDM2			
Parâmetros	<i>p</i>	Psdep (X>Y)	Psdep (Y>X)
Área	1,00	0,6	0,4
OD	0,92	0,6	0,4
DEV	1,00	0,4	0,6
IOD	1,00	0,6	0,4
CRC	0,84	0,4	0,6
SLD	0,84	0,6	0,4
ENT	1,00	0,4	0,6

Área = área nuclear (μm^2), OD = Absorbância Média, DEV = Desvio Padrão, IOD = Densidade Óptica Integrada, CRC = Circularidade, SLS = Solidez, ENT = Entropia. Psdep = Probabilidade de superioridade para amostras dependentes

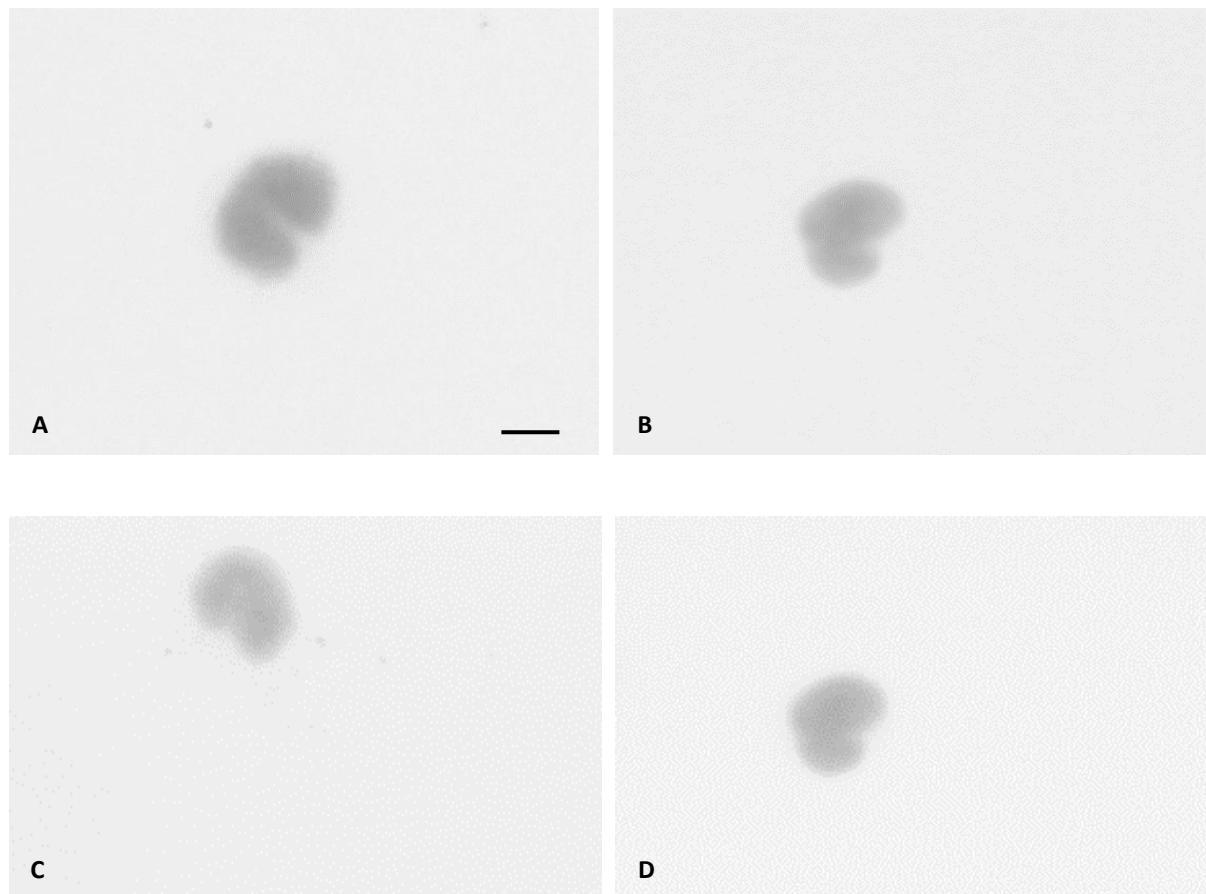


Figura 5. Imagens dos núcleos de monócitos de pacientes portadores de DM2 (A e C) e não portadores - controles (B e D) corados com Feulgen. As imagens foram convertidas em escala de cinza. É possível observar que os núcleos possuem diferenças muitos sutis. A barra equivale a 10 μm .

Passou-se, portanto, à análise dos parâmetros nucleares totais em relação a cada indivíduo portador comparado ao seu respectivo controle de idade e sexo, cujos resultados podem ser vistos na Tabela 14.

Diferentemente do DM1, o DM2, com base nos dados apresentados, não trouxe diferenças relevantes em termos de alterações nucleares e cromatínicas em monócitos de sangue periférico humano. Para todos os parâmetros avaliados, na maioria das comparações, os testes de hipóteses não apresentaram significância estatística e, mesmo quando apresentaram, o tamanho do efeito não resultou em níveis confiáveis de diferença (intervalos de confiança indo de um valor negativo a um positivo). A análise dos boxplots da Figura 4 e das imagens capturadas na Figuras 5 deixam muito claro que as diferenças são, se existirem, extremamente pontuais e sutis. Portanto, nenhuma associação entre alterações nucleares em monócitos circulantes e diabetes pode ser detectada no caso do DM2.

Tabela 14. Comparações Intergrupo DM2 vs Controle

Comparação	<i>n</i>	Teste	<i>p</i>	Amplitude do Efeito		
				Índice	valor	I.C.95
Area						
DM201XC201	41/10	MW	0,54	<i>g</i>	0,27	-0,42 a 0,97
DM202XC202	4/8	MW	0,31	<i>g</i>	0,60	-0,62 a 1,83
DM203XC203	14/13	W	0,01	<i>g</i>	-0,21	-0,97 a 0,54
DM204XC204	37/3	W	0,51	<i>g</i>	-0,07	-1,24 a 1,11
DM205XC205	24/10	W	0,00	<i>g</i>	0,00	-0,74 a 0,74
OD						
DM201XC201	41/10	W	0,00	<i>g</i>	0,21	-0,48 a 0,90
DM202XC202	4/8	MW	0,87	<i>g</i>	0,49	-0,72 a 1,71
DM203XC203	14/13	W	0,07	<i>g</i>	0,39	-0,43 a 1,09
DM204XC204	37/3	MW	0,72	<i>g</i>	0,60	-0,96 a 1,39
DM205XC205	24/10	W	0,00	<i>g</i>	0,38	-0,48 a 1,00
DEV						
DM201XC201	41/10	W	0,23	<i>g</i>	0,21	-0,48 a 0,90
DM202XC202	4/8	MW	0,73	<i>g</i>	0,49	-0,72 a 1,71
DM203XC203	14/13	MW	0,07	<i>g</i>	0,33	-0,43 a 1,09
DM204XC204	37/3	MW	0,43	<i>g</i>	0,21	-0,96 a 1,39
DM205XC205	24/10	MW	0,01	<i>g</i>	0,26	-0,48 a 1,00
IOD						
DM201XC201	41/10	W	0,00	<i>g</i>	0,29	-0,40 a 0,99
DM202XC202	4/8	MW	0,61	<i>g</i>	0,51	-0,71 a 1,12
DM203XC203	14/13	MW	0,23	<i>g</i>	0,39	-0,47 a 1,05
DM204XC204	37/3	MW	0,16	<i>g</i>	0,17	0,60 a 1,01
DM205XC205	24/10	MW	0,01	<i>g</i>	0,38	-0,45 a 1,04
CRC						
DM201XC201	41/10	W	0,00	<i>g</i>	0,21	-0,48 a 0,90
DM202XC202	4/8	MW	0,17	<i>g</i>	0,49	-0,73 a 1,71
DM203XC203	14/13	MW	0,70	<i>g</i>	0,33	-0,43 a 1,09
DM204XC204	37/3	MW	0,04	<i>g</i>	0,22	-0,96 a 1,40
DM205XC205	24/10	W	0,00	<i>g</i>	0,26	-0,48 a 1,00
SLD						
DM201XC201	41/10	MW	0,19	<i>g</i>	0,21	-0,48 a 0,90
DM202XC202	4/8	MW	0,61	<i>g</i>	0,49	-0,73 a 1,71
DM203XC203	14/13	MW	0,81	<i>g</i>	0,33	-0,43 a 1,09
DM204XC204	37/3	MW	0,34	<i>g</i>	0,21	-0,96 a 1,39
DM205XC205	24/10	MW	0,02	<i>g</i>	0,20	-0,48 a 1,00
ENT						
DM201XC201	41/10	MW	0,18	<i>g</i>	0,20	-0,49 a 0,90
DM202XC202	4/8	MW	0,73	<i>g</i>	0,49	-0,73 a 1,71
DM203XC203	14/13	MW	0,04	<i>g</i>	0,32	-0,44 a 1,08
DM204XC204	37/3	MW	0,08	<i>g</i>	0,22	-0,95 a 1,40
DM205XC205	24/10	W	0,34	<i>g</i>	0,25	-0,49 a 0,99

Foram utilizados códigos para representar cada paciente do Grupo DM2 = DM201, DM202, DM203, DM 204, DM205. E para o Grupo Controle = C201, C202, C203, C204, C205. Area = área nuclear (μm^2), OD = Absorbância Média, DEV = Desvio Padrão, IOD = Densidade Óptica Integrada, CRC = Circularidade, SLS = Solidez, ENT = Entropia. Testes de Hipóteses ($p < 0,05$) abreviados: W = Wilcox, MW = Mann-Whitney. Amplitude do Efeito (Effect Size) representado por $g = g$ de Hedge. I.C.95 = Intervalo de Confiança em 95%.

6 DISCUSSÃO

Um dos princípios mais básicos dentro da ciência aplicada a saúde é que todas as doenças têm origem em nível celular. Deste modo, quando é relatado neste trabalho, anteriormente, tais alterações celulares tanto dentro do contexto hiperglicêmico causado pelo DM, quanto pela variabilidade de cenários que influenciam nas desregulações dos mecanismos de replicação da célula, é perceptível que ainda não há um total esclarecimento. Apesar disso, em estudos utilizando células epiteliais renais ressaltou-se que condições hiperglicemiantes relacionada ao DM leva a respostas aberrantes associados a danos ao reparo do DNA contribuindo para a maior taxa de mutação nestas células, reforçando portanto, a importância de ambientes euglicêmicos (ZHONG et al., 2018). Kumar e colaboradores (2020) demonstram que experimentalmente o DM1 e o DM2 não apenas danificam o reparo do DNA como também levam a senescência celular e ao desenvolvimento de fenótipos inflamatórios. Ainda, a glicotoxicidade decorrente do DM pode desencadear instabilidade genômica (CIMINERA; SHUCK; TERMINI, 2021), indução de apoptose celular (ALLEN; YAQOOB; HARWOOD, 2005) e desregulação da expressão gênica (OTTOSSON-LAAKSO et al., 2017), além de outras alterações celulares. Já foi descrito que a hiperglicemia age como um indutor de remodelação, conformação e dinâmica da cromatina (GHIRALDINI; CRISPIM; MELLO, 2013) e que tais alterações podem acontecer em diferentes células do sistema imunológico como em monócitos (BRASACCHIO et al., 2009), também observado neste estudo, e que pode afetar a expressão gênica e gerar todas as consequências celulares citadas acima.

Anterior aos resultados das análises intragrupo e intergrupo, foi importante observar possíveis alterações cromatinicas relacionadas a condição hiperglicêmica. Neste estudo, existem pacientes que conseguiram alcançar as metas terapêuticas para o DM1 (SAÚDE, 2018) e DM2 (SAÚDE, 2020), entretanto é notável observar que as células passaram por uma situação que deslocou o equilíbrio bioquímico e que pode ter gerado consequências a longo prazo como a memória metabólica (LACHIN; NATHAN, 2021) e/ou influência desta na regulação das funções imunes (GÖKHAN S. HOTAMISLIGIL, 2017). Esses processos serão relacionados aos resultados obtidos no trabalho mais adiante, em detalhes.

Os resultados da análise intragrupo, em que se propôs a comparar os pacientes portadores de diabetes (DM1 e DM2) entre eles e os participantes não portadores de diabetes também entre eles, evidenciaram uma enorme variação individual para todos os parâmetros, e em todos os grupos. Skinner e Johnson (2017) indicaram que diversos tipos de células podem ter formas nucleares muito diferentes naturalmente, que trabalhos recentes mostraram que a

regulação da expressão gênica pode ser influenciada pela morfologia nuclear e que as células podem remodelar drasticamente sua cromatina durante a diferenciação. Também destacam que durante a etapa de diferenciação, patologias podem desencadear mudanças estruturais importantes nos núcleos de células do sistema imune. Xiaoyin e colaboradores (2017) em seu estudo utilizando células-tronco humanas primárias derivadas de tecido adiposo humano (ASC) em comparação com fibroblastos pareados por idade demonstram mudanças sutis relacionada a idade. Em outro estudo, o uso de núcleos selecionados de cérebro permitiu a identificação de alterações específicas dependente do sexo na estrutura da cromatina (BARRERA et al., 2021). É possível concluir, portanto, que para esse trabalho não existe uma influência do sexo e idade, que tais variações podem estar relacionadas tanto para condição hiperglicêmica desencadeada pelo diabetes ou a qualquer outro fator. Logo, as comparações das medianas do DM1/DM2 e seus respectivos controles podem ser realizadas para verificar a possibilidade de correlações entre hiperglicemia, controle glicêmico e suas consequências para a arquitetura da cromatina.

Nossos resultados para análise dos grupos diabéticos comparados com seus controles de forma pareada utilizando as medianas para cada indivíduo, e para cada um dos parâmetros nucleares avaliados, indicaram que no DM1 os núcleos dos monócitos humanos estejam associados principalmente com aumento do conteúdo total de DNA. Visto que consequentemente houve também um aumento no volume de forma proporcional ao aumento do conteúdo cromossômico é possível que eventos de proliferação ou poliploidização possam ser considerados. A poliploidia ou duplicação do genoma inteiro, é uma condição em que o organismo ou célula contém conjuntos adicionais de cromossomos. É distinto da aneuploidia, que se trata de um desvio do número de múltiplos cromossomos, onde um ou mais dos cromossomos estão ausentes ou presentes em excesso (DONNE et al., 2021). Um dado um tanto quanto curioso, pois pouco é descrito sobre processos de ploidia em monócitos.

Entretanto, estudos atuais descreveram que um aumento no conteúdo de DNA (ploidia) foi observado em alguns tipos de células humanas, como por exemplo os osteoclastos, megacariócitos, cardiomiócitos ou hepatócitos (SLADKY et al., 2021). Estudos *in vitro* utilizando radiação em leucócitos demonstrou que estas células podem apresentar poliploidia como uma característica proeminente (NASJLETI; SPENCER, 1969). Outro estudo apontou que processos de poliploidia (SAADAT; IKUTA; YOSHIDA, 1998) ou aneuploidia (CHEN et al., 2013) acometem células imunes quando estão relacionadas a processos patológicos. A poliploidia também foi relacionada a ambiente hiperglicêmicos em outros estudos, indicando que o aumento do conteúdo de DNA pode ser causado pelo DM (GHIRALDINI; SILVA; MELLO, 2012).

Associado ao aumento de conteúdo de DNA, os resultados também indicaram que os núcleos aumentaram de tamanho, com mudanças na arquitetura (forma) do núcleo e na distribuição da cromatina. É possível que tais alterações na forma estejam relacionadas com a natureza dinâmica do envelope nuclear (EN) (MAGISTRIS; ANTONIN, 2018). Porém, é possível que tais mudanças estejam sendo causadas pelo DM, pois de acordo com Gauthier e Comaills (2021) a dinâmica nuclear está associada a doenças que possuem processos inflamatórios na sua patogenia e que por sua vez se correlaciona com a instabilidade cromossômica gerando profundas mudanças nos núcleos.

A análise, paciente a paciente, comparados com seus respectivos controles para idade e sexo, diferentemente da análise dos grupos como um todo, permitiu concluir que a glicemia em si, parece não exercer um efeito direto nos parâmetros de análise morfométrica tanto para o DM1 como para o DM2. Logo, os resultados para DM1, em especial para o paciente 01, indicou que os núcleos dos monócitos estão sofrendo alterações estruturais importantes causados pelo ambiente hiperglicêmico sustentando ao longo do tempo e não apenas no momento da coleta. Neste paciente, os núcleos estão sofrendo uma diminuição em seu tamanho decorrente da compactação cromatínica pelo aumento do conteúdo Feulgen-DNA. Esses resultados corroboram com dados anteriores, demonstrando que indivíduos diabéticos sofrem remodelação cromatínica e que consequentemente podem gerar alterações em processos de transcrição gênica (MIAO et al., 2004; SCHONES et al., 2015; GHIRALDINI; SILVA; MELLO, 2012; ZHENG et al., 2019).

A compactação cromatínica observada neste trabalho foi relatada por Meng e colaboradores (2017) quando utilizados neurônios de córtex cerebral. Neste estudo, os resultados sugerem que houve uma condensação da cromatina nuclear e encolhimento citoplasmático no córtex cerebral nos ratos diabéticos e uma associação com indução de apoptose. Em outro estudo experimental utilizando células HepG2 de carcinoma hepático, a investigação demonstrou que a glicose elevada induz quimiorresistência associada com compactação da cromatina, efeitos suprimidos quando as células foram tratadas com curcumina (SONI et al., 2021). Tais eventos podem ainda ter uma origem em mecanismos ainda mais intrínsecos, sendo os dois principais a metilação, acetilação de DNA e proteínas histonas que resultam no relaxamento ou condensação das unidades de cromatina.

A metilação do DNA envolve a ligação de um grupo metil ao quinto carbono do resíduo de citosina presente nos dinucleotídeos CG (CpG). Esse processo catalisado por metiltransferases causa uma sequência de modificações que resulta no silenciamento da expressão gênica (ŚWIATOWY et al., 2021). A acetilação de proteínas é um dos processos

altamente dinâmicos que compõe o grupo de modificações pós-translacionais (do inglês PTM - *posttranslational modification*) e está relacionada na transcrição de genes e sinais de transdução. A acetilação de proteínas é principalmente dependente de lisina *acetiltransferases* e lisina *desacetilases* (XIA et al., 2020). Ambos os fenômenos estão ligados com processos fisiológicos e patológicos importantes.

A acetilação por exemplo, foi encontrada reduzida em histonas H3 e os núcleos de células epiteliais da córnea de ratos diabéticos estavam com a cromatina compactada, com aumento de tamanho, modificação em suas formas e ploidia elevada de DNA (HERENCIA-BUENO et al., 2018). Outras pesquisas indicaram que a metilação está associada com remodelação drástica da cromatina e tem um papel fundamental na manutenção da "memória metabólica", da resistência à insulina e células β pancreáticas disfuncionais em pacientes diabéticos (PARK et al., 2014, RACITI et al., 2021, VOLKMAR et al., 2012, DHAWAN et al., 2011, ZHAO et al., 2012).

Como já foi dito, o ambiente hiperglicêmico decorrente do DM1, evidenciou que ambos os analitos dosados, altos o tempo todo, indicam a possibilidade de uma memória metabólica nos monócitos. Berezin (2016) destaca que um controle metabólico deficiente ou eventos transitórios de hiperglicemia causados pelo DM estão associados com alterações cromatínicas e epigenéticas desencadeando modificações em diversos grupos celulares entre eles células progenitoras e suas linhagens maduras produzindo um efeito de memória metabólica. De acordo com esta hipótese, existe a possibilidade de que tais alterações impliquem em todo o processo de hematopoiese, em especial a monopoiese, comprometendo as linhagens futuras e sua função. Estudos recentes indicaram que a hipótese se confirma, espera-se que quando ocorre uma desregulação metabólica resultante do diabetes, as implicações diretas nas funções das células persistem mesmo após o retorno à normoglicemia (RODRIGUES et al., 2015).

Entretanto, apesar do forte indício que os núcleos de monócitos retêm um processo de memória metabólica, este não é o único responsável pelas consequências que estão repercutindo na estrutura do conteúdo nuclear dessas células. A escolha do tratamento farmacológico para os pacientes DM1 determinou como que ao longo do tempo um ambiente hiperglicêmico poderia afetar os núcleos, principalmente relacionado a intervenção utilizando insulina glarginha. Este tipo de insulina é um análogo da insulina humana preparado por tecnologia de DNA recombinante e é amplamente aceita como uma terapia basal eficaz sendo bem tolerada quando administrada em uma única injeção subcutânea diária em pacientes com diabetes (GYSLING, 2003). Apesar de segura, a glarginha pode não ser a terapia de insulina ideal para todos os pacientes diabéticos. Ao longo de um total de 24 horas, determinados pacientes portadores de

DM1 apresentaram adequado controle glicêmico, outrora em pacientes com resistência significativa à insulina, com necessidades de insulina excedendo 100 unidades diariamente, uma injeção uma vez ao dia era insuficiente (GOYKHMAN et al., 2009).

Portanto, fica claro que o tratamento utilizando insulina glargina pode resultar em um controle glicêmico instável dependente das condições de hiperinsulinemia que são desencadeadas dentro do ambiente hiperglicêmico no DM1. É possível que esse ambiente altamente instável gere um processo glicotóxico para as células e que este efeito altere o comportamento da paisagem cromatínica. Os resultados de Senapati e col (2019) corroboram com essa hipótese. Através dos seus resultados utilizando células MDA-MB-231 (adenocarcinoma mamário) xenoenxertadas em camundongos hiperinsulinêmicos e do tipo selvagem foi verificado que houve um aumento global na acetilação de histonas associada à cromatina, em particular na histona H3K9. Ademais, a insulina induziu níveis elevados de espécies reativas de oxigênio (ROS) e danos ao DNA nas células.

Uma possível explicação para que os pacientes portadores de DM2 não apresentarem alterações cromatinicas significantes pode ser explicado pelo controle glicêmico e intervenção farmacológica que acontecem em um contexto diferente do DM1. Neste caso, os valores ao longo do tempo de glicemia em jejum não atingem valores tão elevados se comparados com os pacientes DM1, até mesmo para hemoglobina glicada. Isso combinado com o tratamento, que em sua totalidade é o uso de antidiabéticos orais associados ou não a insulina produz uma combinação que se destoa do contexto de alterações do paciente portador de DM1.

Entretanto, apesar das alterações não serem notáveis neste trabalho para o DM2, Kumari e col. (2018) comentam sobre processos de acetilação e desacetilação em histonas (H4) no gene BDNF (fator neurotrófico derivado do cérebro) em ratos diabéticos e como estes formam uma importante rede regulatória nas células da retina. Neste caso e também através de outros estudos, como Patel e col. (2011) é possível observar a instabilidade dos mecanismos epigenéticos e que, apesar da melhora do diabetes, não é possível estabelecer com precisão essa correlação bem como se tais processos não produziram efeitos prejudiciais, como ainda mais dano ao DNA.

7 CONCLUSÃO

Tomados em conjunto, este trabalho indica um certo nível de reorganização da cromatina nos núcleos de monócitos de pacientes portadores de DM1. Mais especificamente, houve para um dos pacientes uma correlação com a instabilidade do controle glicêmico associado ao uso da insulina glargina. O ambiente hiperglicêmico e hipoinsulinêmico provocou compactação nuclear com aumento do conteúdo total de DNA, com redistribuição das áreas cromatinicas indicando um possível processo compatível com poliploidia, além de alterações no formato nuclear. Para o DM2, as alterações estruturais na cromatina foram sutis, independente do tratamento ou características da patogenia.

Concluímos que o tratamento no DM1 ou mesmo a sua cura é insuficiente para preservar completamente a homeostasia e prevenir complicações diabéticas futuras, sendo em alguns casos, especialmente se as modificações na cromatina em resposta à hiperglicemia já tiverem ocorrido.

Apesar dos resultados relatados neste trabalho, não é possível afirmar com precisão as correlações através apenas deste estudo, necessitando de experimentos complementares e maior investigação para se concluir se a cromatina está de fato sofrendo alterações ocasionadas por um controle glicêmico instável decorrente de um tratamento inadequado, além de investigar quais marcadores e regiões estarão sendo expressas no genoma, consequentemente quais vias estarão sendo afetadas e os efeitos fisiopatológicos finais. E também se, por exemplo para o DM2, não há expressão de marcadores epigenéticos específicos mesmo com ausência de alterações estruturais na cromatina.

8 REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K. **Imunologia Básica**. 4º ed. San Francisco, California: Elsevier, 2014.

ALBERTS, B. et al. **Fundamentos da Biologia Celular**. Porto Alegre: Artmed, 2011.

ALLEN, D. A.; YAQOOB, M. M.; HARWOOD, S. M. Mechanisms of high glucose-induced apoptosis and its relationship to diabetic complications. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 16, n. 12, p. 705–713, 2005.

ARTASENSI, A. et al. Type 2 diabetes mellitus: A review of multi-target drugs. **Molecules**, v. 25, n. 8, p. 1–20, 2020.

ASHCROFT, F. M.; RORSMAN, P. Europe PMC Funders Group Diabetes mellitus and the β -cell : the Last Ten Years. **University of Oxford**, v. 148, n. 6, p. 1160–1171, 2018.

BARRERA, J. et al. Sex dependent glial-specific changes in the chromatin accessibility landscape in late-onset Alzheimer's disease brains. **Molecular Neurodegeneration**, v. 16, n. 1, p. 1–22, 2021.

BERBUDI, A. et al. Type 2 Diabetes and its Impact on the Immune System. p. 442–449, 2020.

BEREZIN, A. Metabolic memory phenomenon in diabetes mellitus: Achieving and perspectives. **Diabetes and Metabolic Syndrome: Clinical Research and Reviews**, v. 10, n. 2, p. S176–S183, 2016.

BRASACCHIO, D. et al. Hyperglycemia induces a dynamic cooperativity of histone methylase and demethylase enzymes associated with gene-activating epigenetic marks that coexist on the lysine tail. **Diabetes**, v. 58, n. 5, p. 1229–1236, 2009.

BONILLA, F. A.; OETTGEN, H. C. Adaptive immunity. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 125, n. 2 SUPPL. 2, p. S33–S40, 2010.

BURTIS, C. A. et al. Fundamentos de Química Clínica e Diagnóstico Molecular. 7º Edição. Elsevier, 2016.

CARRILLO, J. L. M. et al. Physiology and Pathology of Innate Immune Response Against Pathogens. **InTech**, p. 16, 2017.

CHATTERJEE, S; Davies, M.J; Tarigopula,G; Pharmacological control of blood sugar, **Anaesthesia & Intensive Care Medicine**, volume 18, Issue 10, 2017, Pages 532-534.

CHEN, Y. HUI et al. Prevalence of Heterotypic Tumor/Immune Cell-In-Cell Structure In Vitro and In Vivo Leading to Formation of Aneuploidy. **PLOS ONE**, v. 8, n. 3, p. 3–10, 2013.

CIMINERA, A. K.; SHUCK, S. C.; TERMINI, J. Elevated glucose increases genomic instability by inhibiting nucleotide excision repair. **Life Science Alliance**, v. 4, n. 10, p. 1–15, 2021.

COBAS, R. A.; GOMES, M. DE B. Diabetes Mellitus. **Revista do Hospital Universitário Pedro Ernesto**, v. 53, n. 9, p. 69–75, 2010.

CONOVER, W. J. **Practical Nonparametric Statistics**. 3rd. ed. New Jersey, Hoboken: Wiley, 1999.

CONOVER, W. J.; IMAN, R. L. Rank transformations as a bridge between parametric and nonparametric statistics. **American Statistician**, v. 35, n. 3, p. 124–128, 1981.

COSTANTINO, S. et al. Impact of glycemic variability on chromatin remodeling, oxidative stress, and endothelial dysfunction in patients with type 2 diabetes and with target HbA1c levels. **Diabetes**, v. 66, n. 9, p. 2472–2482, 2017.

COSTELLO, K. R.; SCHONES, D. E. Chromatin modifications in metabolic disease: Potential mediators of long-term disease risk. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine**, v. 10, n. 4, p. 1–12, 2018.

DAG, O.; DOLGUN, A.; KONAR, N. M. Onewaytests: An R package for one-way tests in independent groups designs. **R Journal**, v. 10, n. 1, p. 175–199, 2018.

DANNUNZIO, G.; RAMONA TALLONE, C. R.; LORINI, R. Autoimmune Disorders Associated to Type 1 Diabetes Mellitus in Children and Adolescents. **Autoimmune Disorders - Current Concepts and Advances from Bedside to Mechanistic Insights**, n. November 2011, p. 2–26, 2011.

DIB, S. A. Heterogeneidade do diabetes melito tipo 1. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, v. 52, n. 2, p. 205–218, 2008.

DHAWAN, S. Pancreatic beta cell identity is maintained by DNA methylation- mediated repression of Arx. **Dev Cell**, v. 23, n. 1, p. 1–7, 2011.

DOWNEY, R. et al. A Bittersweet Response to Infection in Diabetes; Targeting Neutrophils to Modify Inflammation and Improve Host Immunity. **Frontiers in Immunology**, v. 12, n. June, p. 1–21, 2021.

DONNE, R. et al. Hepatocyte polyploidy: Driver or gatekeeper of chronic liver diseases. **Cancers**, v. 13, n. 20, p. 1–19, 2021.

DURRUTY, P.; SANZANA, M.; SANHUEZA, L. Pathogenesis of Type 2 Diabetes Mellitus. In: AUTHOR(S), T. (Ed.). **Type 2 Diabetes - From Pathophysiology to Modern Management**. Pathogenes ed. Santiago, Chile: IntechOpen, 2019. p. 1–3.

DZIADKOWIEC, O. Use of Statistical Power Analysis in Prospective and Retrospective Research. **JOGNN - Journal of Obstetric, Gynecologic, and Neonatal Nursing**, v. 50, n. 2, p. 119–121, 2021.

GAUTHIER, B. R.; COMAILLS, V. Nuclear envelope integrity in health and disease: Consequences on genome instability and inflammation. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 14, 2021.

GHIRALDINI, F. G.; CRISPIM, A. C. V.; MELLO, M. L. S. Effects of hyperglycemia and aging on nuclear sirtuins and DNA damage of mouse hepatocytes. **Molecular Biology of the Cell**, v. 24, n. 15, p. 2467–2476, 2013.

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 Part A**, v. 81 A, n. 9, p. 755–764, 2012.

GÖKHAN S. HOTAMISLIGİL. Foundations of Immunometabolism and Implications for Metabolic Health and Disease. **Immunity**, v. 176, n. 1, p. 139–148, 2017.

GOYKHMAN, S. et al. Insulin Glargine: A review 8 years after its introduction. **Expert Opinion on Pharmacotherapy**, v. 10, n. 4, p. 705–718, 2009.

GYSLING, E. Insulin-glargin. **Pharma-Kritik**, v. 25, n. 9, p. 33–35, 2003.

HAMMAD, M. A. et al. Prescribing statins among patients with type 2 diabetes: The clinical gap between the guidelines and practice. **Journal of Research in Medical Sciences**, v. 24, n. 1, 2019.

HALL, J. E. **Tratado de Fisiologia Médica**. 13º ed. Rio de Janeiro: Elsevier Editora Ltda, 2017.

HERENCIA-BUENO, K. E. et al. Reduction in Histone H3 Acetylation and Chromatin Remodeling in Corneas of Alloxan-Induced Diabetic Rats. **Cornea Journal**, v. 37, n. 5, p. 624–632, 2018.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Pesquisa Nacional de Saúde 2013: percepção do estado de saúde, estilos de vida e doenças crônicas**. Brasil, grandes regiões e unidades da federação. Rio de Janeiro; 2014.

International Diabetes Federation. IDF Atlas. 8. ed. Bruxelas: **International Diabetes Federation**; 2017.

JIANG, G.; ZHANG, B. B. Glucagon and regulation of glucose metabolism. **American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism**, v. 284, n. 4 47-4, p. E-671, 2003.

KANOF, M. E.; SMITH, P. D.; ZOLA, H. Isolation of Whole Mononuclear Cells from Peripheral Blood and Cord Blood. **Current Protocols in Immunology**, v. 19, n. 1, p. 1–7, 1996.

KEATING, S. T.; EL-OSTA, A. Chromatin modifications associated with diabetes. **Journal of Cardiovascular Translational Research**, v. 5, n. 4, p. 399–412, 2012.

KIMBALL, A. et al. Ly6CHi Blood Monocyte/Macrophage Drive Chronic Inflammation and Impair Wound Healing in Diabetes. v. 38, n. 5, p. 1102–1114, 2019.

KHATUN, N. Applications of Normality Test in Statistical Analysis. **Open Journal of Statistics**, v. 11, n. 01, p. 113–122, 2021.

KUMAR, V. et al. Compromised DNA repair is responsible for diabetes-associated fibrosis. **The EMBO Journal**, v. 39, n. 11, p. 1–20, 2020.

KUMARI, S. et al. Epigenetic Modification Through Acetylation In BDNF Gene & Potential New Treatment Targets In Type 2 Diabetic Retinopathy . **Ijirset**, v. 7, n. 2, p. 1508–1515, 2018.

LACHIN, J. M.; NATHAN, D. M. Understanding Metabolic Memory: The Prolonged Influence of Glycemia During the Diabetes Control and Complications Trial (DCCT) on Future Risks of Complications During the Study of the Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications (EDIC). **Diabetes Care**, v. 44, n. 10, p. 2216–2224, 2021.

LYRA, R. et al. **DIRETRIZES DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES 2019-2020**. 2019–2020. ed. Brasil: Clannad, 2020. v. 5.

MAGISTRIS, P.; ANTONIN, W. The Dynamic Nature of the Nuclear Envelope. **Current Biology**, v. 28, n. 8, p. R487–R497, 2018.

MARTINEZ, N. Chromatin Decondensation and T Cell Hyperresponsiveness in Diabetes-Associated Hyperglycemia. **J Immunol**, v. 18, n. 5, p. 199–209, 2014.

MARGUERON, R.; REINBERG, D. Chromatin structure and the inheritance of epigenetic information. **Nature Reviews Genetics**, v. 11, n. 4, p. 285–296, 2010.

MENG, Y. et al. Role of the PI3K/AKT signalling pathway in apoptotic cell death in the cerebral cortex of streptozotocin-induced diabetic rats. **Experimental and Therapeutic Medicine**, v. 13, n. 5, p. 2417–2422, 2017.

MIAO, F. et al. In Vivo Chromatin Remodeling Events Leading to Inflammatory Gene Transcription under Diabetic Conditions. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 17, p. 18091–18097, 2004.

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**. 2008; 57:3189–98.

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.** 2007 282: 13854-13863.

MOSSEL, D. M. et al. Epigenetic Regulation of S100A9 and S100A12 Expression in Monocyte-Macrophage System in Hyperglycemic Conditions. **Frontiers in Immunology**, v. 11, n. June, p. 1–19, 2020.

NASJLETI, C. E.; SPENCER, H. H. Chromosome Polyploidization in Human Leukocytes Induced By Radiation. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 155, n. 2, p. 748–758, 1969.

NOBLE, J. A.; VALDES, A. M. Genetics of the HLA region in the prediction of type 1 diabetes. **Current Diabetes Reports**, v. 11, n. 6, p. 533–542, 2011.

NUÑEZ-OLVERA, S. I. et al. Three-dimensional genome organization in breast and gynecological cancers: How chromatin folding influences tumorigenic transcriptional programs. **Cells**, v. 11, n. 1, 2022.

- OTTOSSON-LAAKSO, E. et al. Glucose-induced changes in gene expression in human pancreatic islets: Causes or consequences of chronic hyperglycemia. **Diabetes**, v. 66, n. 12, p. 3013–3028, 2017.
- OTTON, R.; MENDONÇA, J. R.; CURI, R. Diabetes causes marked changes in lymphocyte metabolism. **Journal of Endocrinology**, v. 174, n. 1, p. 55–61, 2002.
- PANDEY, A.; CHAWLA, S.; GUCHHAIT, P. Type-2 diabetes: Current understanding and future perspectives. **IUBMB Life**, v. 67, n. 7, p. 506–513, 2015.
- PARK, L. K. et al. Genome-wide DNA methylation analysis identifies a metabolic memory profile in patient-derived diabetic foot ulcer fibroblasts. **Epigenetics**, v. 9, n. 10, p. 1339–1349, 2014.
- PATEL, T. et al. Chromatin remodeling resets the immune system to protect against autoimmune diabetes in mice. **Immunology and Cell Biology**, v. 89, n. 5, p. 640–649, 2011.
- PREISER, J. C.; THOOFT, A.; TIRONI, R. M. Stress hyperglycemia. **BioMed Central**, p. 2–3, 2016.
- PENG, T. et al. A BaSiC tool for background and shading correction of optical microscopy images. **Nature Communications**, v. 8, p. 1–7, 2017.
- PEREIRA, V. C. S. Avaliação das alterações nucleares e cromatínicas em linfócitos do sangue periférico de portadores de diabetes. **Universidade Federal de Uberlândia**, 2017.
- RAJEEV GOYAL; ISHWARLAL JIALAL. Diabetes Mellitus. **Southern Illinois University School of Medicine**, v. 1, n. 16 February 2020, p. 13, 2019.
- RACITI, G. A. et al. Dna methylation and type 2 diabetes: Novel biomarkers for risk assessment? **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 21, 2021.
- RAZALI, N. M.; WAH, Y. B. Power comparisons of Shapiro-Wilk, Kolmogorov-Smirnov, Lilliefors and Anderson-Darling tests Nornadiah. **Journal of Statistical Modeling and Analytics**, v. 2, n. 1, p. 21–33, 2011.
- ROBERTIS, E. M. DE; HIB, J. Biologia Celular e Molecular. EDITORA GU ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012.
- RODRIGUES, M. et al. Progenitor Cell Dysfunctions Underlie Some Diabetic Complications. **American Journal of Pathology**, v. 185, n. 10, p. 2607–2618, 2015.
- ROEP, B. O. et al. Type 1 diabetes mellitus as a disease of the β -cell (do not blame the immune system?). **Nature**, v. 17, n. 3, p. 150–161, 2021.
- ROSEN, E. D. et al. Epigenetics and epigenomics: Implications for diabetes and obesity. **Diabetes**, v. 67, n. 10, p. 1923–1931, 2018.
- SAADAT, M.; IKUTA, K.; YOSHIDA, M. C. Chromosome aberrations in peripheral blood

mononuclear cells infected with human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1). **Chromosome Science**, v. 2, p. 39–41, 1998.

SALKIND, N. Heteroscedasticity and Homoscedasticity. **SAGE Publication**, 2013. (Nota técnica).

SAÚDE, M. DA. **Portaria 8/2018 - Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas da Diabete Melito Tipo 1**Secretaria De Atenção À Saúde Secretaria De Ciência, Tecnologia E Insumos Estratégicos. Disponível em: <<http://portalms.saude.gov.br/protocolos-e-diretrizes>>. 2018.

SAÚDE, M. DA. **Relatório de Recomendação - Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas do Diabete Melito Tipo 2**. 2020.

SCHONES, D. E. ET AL. Chromatin modifications associated with diabetes and obesity. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 35, n. 7, p. 1557–1561, 2015.

SCHULTZE, J. L. **Chromatin Remodeling in Monocyte and Macrophage Activation**. 1. ed. Bonn, Germany: Elsevier Inc., 2017. v. 106.

SENAPATI, P. et al. Hyperinsulinemia promotes aberrant histone acetylation in triple-negative breast cancer. **Epigenetics and Chromatin**, v. 12, n. 1, p. 1–15, 2019.

SLADKY, V. C. et al. Polyploidy control in hepatic health and disease. **Journal of Hepatology**, v. 75, n. 5, p. 1177–1191, 2021.

SHI, C.; PAMER, E. G. Monocyte recruitment during infection and inflammation. **Nature**, v. 11, n. 11, p. 762–774, 2011.

ŚWIATOWY, W. J. et al. Physical activity and DNA methylation in humans. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 23, 2021.

SLADKY, V. C. et al. Polyploidy control in hepatic health and disease. **Journal of Hepatology**, v. 75, n. 5, p. 1177–1191, 2021.

SKINNER, B. M.; JOHNSON, E. E. P. Nuclear morphologies: their diversity and functional relevance. **Chromosoma**, v. 126, n. 2, p. 195–212, 2017.

SKYLER, J. S. et al. Differentiation of diabetes by pathophysiology, natural history, and prognosis. **American Diabetes Association**, v. 66, n. 2, p. 241–255, 2017.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. Diagnóstico e Classificação do Diabetes Mellitus e tratamento do Diabetes Mellitus tipo 2. Biblioteca Virtual em Saúde, v. 1, n. 1, p. 1–71, 2000.

SONI, V. K. et al. Counteracting Action of Curcumin on High Glucose-Induced Chemoresistance in Hepatic Carcinoma Cells. **Frontiers in Oncology**, v. 11, n. October, p. 1–20, 2021.

SONG, R. et al. IRF1 governs the differential interferon-stimulated gene responses in human

monocytes and macrophages by regulating chromatin accessibility. **Cell Reports**, v. 34, n. 12, p. 108891, 2021.

TYAGI, M. et al. Chromatin remodelers: We are the drivers!! **Nucleus**, v. 7, n. 4, p. 388–404, 2016.

VILLENEUVE, L.M.; NATARAJAN, R. The role of epigenetics in the pathology of diabetic complications. *Am J Physiol*. 2010; 299:F14–25.

VOLKMAR M, et al. (2012) DNA methylation profiling identifies epigenetic dys- regulation in pancreatic islets from type 2 diabetic patients. **EMBO J** 31(6): 1405–1426.

Wilcox, R. R. Introduction to Robust Estimation and Hypothesis Testing 4th Edition. San Diego, CA: **Academic Press**. 2017.

WONG, F. S.; WEN, L. Type 1 diabetes therapy beyond t cell targeting: Monocytes, B cells, and innate lymphocytes. **Review of Diabetic Studies**, v. 9, n. 4, p. 289–304, 2012.

WOOLSON, R. F. **WILCOXON SIGNED-RANK TEST**: 0. Charleston, SC, USA. 2008.

World Health Organization, editor. Global health risks: mortality and burden of disease attributable to selected major risks. Geneva: **World Health Organization**; 2009.

XIAOYIN SHAN, CLERESA ROBERTS, EUN JI KIM, ARIANA BRENNER, G. G. AND I. P. Transcriptional and Cell Cycle Alterations Mark Aging of Primary Human Adipose-Derived Stem Cells. **Physiology & behavior**, v. 176, n. 3, p. 139–148, 2017.

XIA, C. et al. Protein acetylation and deacetylation: An important regulatory modification in gene transcription (Review). **Experimental and Therapeutic Medicine**, p. 2923–2940, 2020.

ZHAO, J. et al. Global DNA methylation is associated with insulin resistance: A monozygotic twin study. **Diabetes**, v. 61, n. 2, p. 542–546, 2012.

ZHENG, Q. et al. Reversible histone glycation is associated with disease-related changes in chromatin architecture. **Nature Communications**, v. 10, n. 1, 2019.

ZHENG, Y.; LEY, S. H.; HU, F. B. Global aetiology and epidemiology of type 2 diabetes mellitus and its complications. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 14, n. 2, p. 88–98, 2018.

ZHONG, A. et al. Aberrant DNA damage response and DNA repair pathway in high glucose conditions. **HHS Public Access**, v. 7, n. 3, p. 64–74, 2018.

ZHOU, T. et al. Role of Adaptive and Innate Immunity in Type 2 Diabetes Mellitus. **Journal of Diabetes Research**, v. 2018, p. 9, 2018.

ZHOU, Q.; MELTON, D. A. Pancreas regeneration HHS Public Access. **Nature**, v. 557, n. 7705, p. 351–358, 2018.

ZMORA, N. et al. The Role of the Immune System in Metabolic Health and Disease. *Cell Metabolism*, v. 25, n. 3, p. 506–521, 2017.