**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA**

DANILO JORDÃO XAVIER

Influência da hiperglicemia sobre os perfis de expressão
transcricional de mRNAs e microRNAs em linfócitos de
pacientes com Diabetes Mellitus tipo 2

Ribeirão Preto

2013

DANILO JORDÃO XAVIER

Influência da hiperglicemia sobre os perfis de expressão transcricional
de mRNAs e microRNAs em linfócitos de pacientes com Diabetes
Mellitus tipo 2

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo,
para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Genética

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Elza Tiemi Sakamoto Hojo

Ribeirão Preto

2013

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

FICHA CATALOGRÁFICA

Xavier, Danilo Jordão

Influência da hiperglicemia sobre os perfis de expressão transcricional de mRNAs e microRNAs em linfócitos de pacientes com Diabetes Mellitus tipo 2/ Ribeirão Preto, 2013

167f.:il; 30 cm

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/ USP. Área de Concentração: Genética
Orientadora Sakamoto-Hojo, Elza Tiemi

1. Diabetes Mellitus tipo 2. 2. *microarrays*. 3. hiperglicemia. 4. GSA e GSEA. 5. microRNA.

Nome: XAVIER, Danilo Jordão

Título: Influência da hiperglicemia sobre os perfis de expressão transcricional de mRNAs e microRNAs em linfócitos de pacientes com Diabetes Mellitus tipo 2

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, para
obtenção do título de Doutor em Ciências.
Área de concentração: Genética

Aprovado em: __/__/__

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Apoio e Suporte Financeiro

Este trabalho foi realizado com o apoio financeiro das seguintes entidades e instituições:

- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP (Proc. n° 2008/56594-8, 2010/00932-2, 2010/12069-7, 2010/05622-1).
- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq.
- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES.
- Fundação de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Assistência – FAEPA – FMRP/USP.
- Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – FMRP/USP.
- Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto – FFCLRP/USP.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha orientadora, **Profa. Dra. Elza Tiemi Sakamoto Hojo**, pela orientação e por ter me disponibilizado de todas as condições para o desenvolvimento deste trabalho, além de me aturar por tanto tempo! Agradeço por toda a paciência, amizade e suporte em todos os momentos, principalmente nos de necessidade. Obrigado de novo!

À **Profa. Dra. Catarina Satie Takahashi** por todo o incentivo e apoio, pela amizade e convivência durante este período de trabalho. Sem falar nas famosas festinhas do laboratório, que ficarão gravadas em minha memória.

Ao **Prof. Dr. Wilson Araújo da Silva Junior**, chefe do Departamento de Genética da FMRP/USP, e ao **Prof. Dr. Aguinaldo Luiz Simões** (ex-chefe) pela atenção e apoio prestados.

Ao **Prof. Dr. Ademilson Espencer E. Soares**, coordenador da Pós-graduação do Departamento de Genética da FMRP/USP pelo apoio em momentos cruciais para o desenvolvimento desta tese. Perdi as contas das vezes que o senhor me ajudou e agradeço muito pela amizade e disposição que sempre demonstrou.

À **Profa. Dra. Zilá Luz Paulino Simões**, por gentilmente disponibilizar o uso de alguns aparelhos de seu laboratório e também à todo o pessoal do Laboratório de Biologia e Genética de abelhas (Bloco A), sempre dispostos a ajudar.

Ao **Profa. Dra Maria Cristina Foss Freitas**, por sempre ter me ajudado em todas as coletas, por ser sempre solícita e topar tudo pela pesquisa

Aos membros da banca examinadora, pela disponibilidade e paciência em analisar este trabalho, enriquecendo-o com suas críticas e sugestões.

Aos técnicos do Laboratório de Citogenética e Mutagenese do Departamento de Genética da FMRP/USP, **Luiz Augusto da Costa Júnior (Junão)** e **Sueli Aparecida Neves (Su)**, por toda a assistência prestada, ensinamentos e principalmente pela amizade. Muito obrigado por todas as risadas nesses anos de convívio!

À secretaria do Departamento de Genética, principalmente a Sra **Silvia Sant'anna Consiglieri** e Sra **Susie Adriana Nalon**, pela atenção e atendimentos prestados. Muito obrigado Susie, por segurar todo rabo de foguete que joguei em você!

Às instituições **FAPESP, CNPq e Capes** pelo auxílio financeiro, sem o qual a realização deste trabalho seria possível.

Aos amigos de Laboratório de Citogenética e Mutagenese Ambiental: Paulo (cop), sempre foi um dos meus melhores amigos e sou grato por toda caminhada que fizemos juntos até hoje, mas que perde no video-game é você!; Giovana que sempre foi uma boa amiga e me ajudou quando precisei quando precisei; Ana Paula, Leo, Tiago, Andrés, William, Fernada C., Fernanda P., e Veronica, muito obrigado pelo ótimo ambiente de trabalho.

Aos ex-alunos deste laboratório, mas que de alguma forma ajudaram neste trabalho: Raquel, Gustavo, Danillo, Filipe, e Flávia.

Aos amigos de longa data de Ribeirão: Cop, Biscuit, Kaba, Baba, Trava, Xato, Michael, Miojo, Rosca. Muito obrigado a todos vcs!

Aos meus pais, Kleber e Rosa, por todo esforço e dedicação que sempre tiveram por mim. Passamos por muitas coisas nos últimos anos, mas tenho certeza que só crescemos com isso! Por todo amor incondicional que vocês têm por mim e pela Brunna.

Aos meus grandes amigos que me acompanham desde o colegial: Mateus (Max), Nilton (Bigfoot) e os novos agregados, Rodrigo e Ricardo. Já disse e repito... Pode na ser fácil fazer amigos, mas amigos de verdade, com certeza não é.... por isso, vocês são muito importantes para mim!

À minha namorada Paulinha, eu sinceramente não sei o que seria de mim sem vc meu amor! Tenho muito a agradecer, não só por toda ajuda que você me deu, mas porque eu sinto que essa ajuda é incondicional e que você tem uma força que te deixa ainda mais linda do que você já é! Cada dia eu aprendo a te admirar e e amar mais!

RESUMO

XAVIER, D. J. **Influência da hiperglicemia sobre os perfis de expressão transcricional de mRNAs e microRNAs em linfócitos de pacientes com Diabetes Mellitus tipo 2.** 2013, Tese de doutorado – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

O Diabetes Mellitus é uma das maiores causas de morte no mundo. O desenvolvimento do Diabetes Mellitus tipo 2 (DM2) está relacionado com uma série de fatores genéticos e ambientais, culminando com o desenvolvimento do DM2. Já a hiperglicemia, característica marcante da doença, está associada a uma série de complicações metabólicas e comorbidades. No entanto, não se sabe a influência de um controle apropriado da doença, com menores níveis glicêmicos. No presente trabalho, foi utilizada a técnica de *microarrays* para comparar os perfis transcricionais (mRNA e microRNA) de células mononucleares de sangue periférico (PBMCs) em três grupos distintos: um grupo de pacientes DM2 descompensados (DM2-D, n=13); um grupo de pacientes DM2 compensados (DM2-C, n=14), e um grupo controle (n=10). Os dados foram analisados por meio de duas linguagens de programação: R e PERL. Após a extração dos dados utilizando-se o software Feature Extraction, versão 10.7 (Agilent Technologies), foram realizadas correção do background, exclusão dos outliers, normalização dos dados pelo método quantile e, por fim, o ajuste de variações não-biológicas. Os dados foram então submetidos a análise estatística rank products, sendo identificados 415 mRNAs diferencialmente expressos no grupo DM2-C relativamente aos controles, 285 no grupo DM2-D em comparação aos controles e 478 em pacientes DM2-D comparados aos DM2-C. Posteriormente, os genes diferencialmente expressos foram submetidos à análise de enriquecimento funcional (DAVID). Foram encontrados 22 e 56 termos biológicos enriquecidos (p-corrigido Benjamini-Hochberg < 0,05) para as comparações DM2-C *versus* controle e pacientes DM2-D *versus* DM2-C, respectivamente. Em ambas as comparações, um processo biológico foi considerado de interesse para o presente trabalho: resposta inflamatória. Na análise por GSEA e GSA, foram identificados 110 grupos gênicos diferencialmente expressos na comparação DM2-C *versus* controle. Já para a comparação DM2-D *versus* controles foram encontrados 297 grupos gênicos diferencialmente expressos, enquanto que na comparação DM2-D *versus* DM2-C, 161 grupos gênicos diferencialmente expressos. Dentre os grupos gênicos diferencialmente

expressos, três merecem destaque: regulação do reparo do DNA (GO: 0006282), resposta ao superóxido (GO: 0000303) e resposta ao estresse do retículo endoplasmático (GO: 0034976). Ainda, 97 microRNAs foram diferencialmente expressos na comparação DM2-C *versus* controles, 54 na comparação DM2-D *versus* controles e 101 na comparação DM2-D *versus* DM2-C. Assim, diferentes grupos gênicos provavelmente foram modulados pela hiperglicemia, além de terem sido descobertos novos microRNAs relacionados a altos níveis de glicose.

Keywords: Diabetes Mellitus tipo 2, *microarrays*, hiperglicemia, GSA e GSEA, microRNA

ABSTRACT

XAVIER, D. J. **Influence of hyperglycemia in the transcriptional expression profiles of mRNAs and microRNAs in lymphocytes of patients with Type 2 Diabetes Mellitus.** 2013, Tese de doutorado – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

Diabetes mellitus is a major cause of death worldwide. The development of type 2 Diabetes Mellitus (T2D) is associated with a number of genetic and environmental factors, culminating in the development of T2D. Hyperglycemia, a hallmark of the disease, is associated with a number of metabolic complications and comorbidities. However, the influence of a proper control of the disease, with lower glucose levels is unknown. In this study, we used the microarrays technique to compare the transcriptional profiles (mRNA and microRNA) of peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) in three distinct groups: a group of patients with uncontrolled T2D patients (T2D-U, n = 13) a group of controlled T2D patients (T2D-C, n = 14) and control group (n = 10). Data were analyzed using two programming languages: R and PERL. After extracting the data using the Feature Extraction software, version 10.7 (Agilent Technologies), background correction, outliers exclusion, data normalization by quantile and adjustment of non-biological variations were performed. The data were then statistically analyzed by the rank products test, which identified 415 differentially expressed mRNAs in T2D-C group compared to controls, 285 in group T2D-U in comparison with controls and 478 when T2D-U and T2D-C are compared. Thereafter, the differentially expressed genes were subjected to functional enrichment analysis (DAVID). 22 and 56 biologically enriched terms were found (Benjamini-Hochberg-corrected p value<0.05), when comparing T2D-C with controls and T2D-U with T2D-C, respectively. In both comparisons, inflammatory response was selected as a biological process of interest. The analysis by GSEA and GSA identified 110 differentially expressed gene sets in comparison T2D-C *versus* control. As for the comparison T2D-U *versus* control, 297 gene sets were found differentially expressed, whereas in comparison T2D-U *versus* T2D-C, 161 differentially expressed gene sets were found. Among the differentially expressed gene sets, three stand out: regulation of DNA repair (GO: 0006282), superoxide response (GO: 0000303) and response to endoplasmic reticulum stress (GO: 0034976). Still, 97 microRNAs were differentially expressed in the T2D-C *versus* controls comparison, 54 when comparing T2D-U *versus* controls and 101 in the comparison of T2D-U *versus* T2D-C. Thus, different

gene sets were probably modulated by hyperglycemia, and new microRNAs related to high levels of glucose were discovered.

Palavras-chave: Type 2 Diabetes Mellitus, microarrays, hyperglycemia, GSA and GSEA, miRNA.

LISTA DE ABREVIATURAS

8-oxoG: 8-oxo-guanina
AGEs: *Advanced Glycation End Products*
ALAS2: *Aminolevulinate, Delta-, Synthase 2*
ANK1: *Ankyrin 1, Erythrocytic*
AP: Sítio Apurínico
ATGL: *Adipode Triglyceride Lipase*
ATM: *Ataxia Telangiectasia Mutated*
AT: *Ataxia Telangiectasia*
ATF3: *Activating Transcription Factor 3*
ATP: *Adenosine Triphosphate*
ATR: *Ataxia Telangiectasia and Rad3 Related*
BER: *Base Nucleotide Excision*
C1QB: *Complement Component 1, Q Subcomponent, B Chain Complement Component 1, Q Subcomponent, B Chain*
CAPN10: *Calpain 10*
CAT: *Catalase*
CCL2: *Chemokine (C-C Motif) Ligand 2*
CCL3: *Chemokine (C-C Motif) Ligand 3*
CCL3L3: *Chemokine (C-C Motif) Ligand 3-Like 3*
CDC14A: *Cell Division Cycle 14A*
CD46: *CD46 Molecule, Complement Regulatory Protein*
CXCL1: *Chemokine (C-X-C Motif) Ligand 1 (Melanoma Growth Stimulating Activity, Alpha)*
CXCL2: *Chemokine (C-X-C Motif) Ligand 2*
CXCL3: *Chemokine (C-X-C Motif) Ligand 3*
DAVID: *Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery*
DDX17: *DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) Box Helicase 17*
DDX3Y: *DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) Box Polypeptide 3, Y-Linked*
DEPC: *Diethyl pyrocarbonate*
DHFR: *Dihydrofolate Reductase*
DLP: *Dislipidemia*
DM: *Diabetes Mellitus*
DM1: *Diabetes Mellitus Tipo 1*
DM2: *Diabetes Mellitus Tipo 2*
DM2-C: *Pacientes com Diabetes Mellitus Tipo 2 compensados*
DM2-D: *Pacientes com Diabetes Mellitus Tipo 2 descompensados*
DSB: *Double Strand Breaks*
DSP: *Desmoplakin*
DUSP1: *Dual Specificity Phosphatase 1*
DUT: *Deoxyuridine Triphosphatase*
EDTA: *Ethylenediamine Tetraacetic Acid*
ENPP1: *Ectonucleotide Pyrophosphatase/Phosphodiesterase 1*
EGR2: *Early Growth Response 2*
ERG: *V-Ets Erythroblastosis Virus E26 Oncogene Homolog (Avian)*
FANCC: *Fanconi Anemia, Complementation Group C*
FGFR1: *Fibroblast Growth Factor Receptor 1*
FN1: *Fibronectin 1*
Foxa2: *Forkhead Box A2*
FOXC1: *Forkhead Box C1*
Foxo1: *Forkhead box O1*
Foxo2: *Forkhead Box O3*
G0S2: *G0/G1Switch 2*
GFAP: *Glial Fibrillary Acidic Protein*
GHR: *Growth Hormone Receptor*

GLUT4: Solute Carrier Family 2 (Facilitated Glucose Transporter), Member 4
 GGR: *Global Genomic Repair*
 GPx: Glutathione Peroxidase
 GSA: *Gene Set Analysis*
 GSEA: *Gene Set Enrichment Analysis*
 HAS: Hipertensão Arterial Sistêmica
 HbA1c: Hemoglobina glicada
 HIP1: *Huntingtin Interacting Protein 1*
 HNF4A: *Hepatocyte Nuclear Factor 4, alpha*
 HNRPA1: *Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein A1*
 HP: *Haptoglobin*
 HRR: *Homologous Recombinational Repair*
 ICEBERG: *Caspase Recruitment Domain Family, Member 18*
 IGFBP5: *Insulin-Like Growth Factor Binding Protein 5*
 IL1A: *Interleukin 1, Alpha*
 IL1 β : *Interleukin 1, Beta*
 IL6: *Interleukin 6*
 IL8: *Interleukin 8*
 IL27: *Interleukin 27*
 IMC: Índice de Massa Corporal
 IRS1: Substrato do Receptor de Insulina 1
 IRS2: Substrato do Receptor de Insulina 2
 KCNJ: *Potassium Inwardly-Rectifying Channel, Subfamily J, Member 1*
 Kir6.2: *Potassium Inwardly-Rectifying Channel, Subfamily J, Member 11*
 KLF6: *Kruppel-like factor 6*
 KRAS: *V-Ki-Ras2 Kirsten Rat Sarcoma Viral Oncogene Homolog*
 KRT1: *Keratin 1*
 LTF: *Lactotransferrin*
 MARS: *Methionyl-Trna Synthetase*
 MASP1: *Mannan-Binding Lectin Serine Peptidase 1 (C4/C2 Activating Component Of Ra-Reactive Factor)*
 MIP-3 α : *Macrophage Inflammatory Protein-3 alpha*
 MMR: *Mismatch Repair*
 MSX1: *Msh Homeobox 1*
 MTPN: *myotrophin*
 MYOM2: *Myomesin 2*
 NFE2L1: *Nuclear Factor (Erythroid-Derived 2)-Like 1*
 NF- κ B: *Nuclear Factor kappa B*
 NHEJ: *Non-Homologous End Joining*
 NHEJ1: *Non-Homologous End-Joining Factor 1*
 NER: *Nucleotide Excision Repair*
 NOL4: *Nucleolar Protein 4*
 NPH: Protamina Neutra de Hagedorn
 OGG1: *8-oxoguanine DNA glycosylase*
 PARP4: *Poly (ADP-ribose) Polymerase Family, Member 4*
 PAX3: *Paired Box 3*
 PCK1: *Hosphoenolpyruvate Carboxykinase 1 (Soluble)*
 PBMCs: *Peripheral Blood Mononuclear Cells*
 PCA: Análise do Componente Principal
 PDPN: *Podoplanin*
 Pdx1: *Pancreatic and Duodenal Homeobox 1*
 PFP: *False Positive Predictions*
 PI3K: *Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase*
 PLA2G4C: *Phospholipase A2, Group IVC (Cytosolic, Calcium-Independent)*
 PLK4: *Polo-Like Kinase 4*

PPAR γ /PPARG: Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma
PTGS2: Prostaglandin-Endoperoxide Synthase 2 (Prostaglandin G/H Synthase And Cyclooxygenase)
PTX3: Pentraxin-Related Gene, Rapidly Induced By IL-1 Beta
RBP4: Retinol Binding Protein 4, Plasma
RE: Reticulo Endoplasmático
REST: RE1-Silencing Transcription Factor
RIN: RNA Integrity Number
ROS: Reactive Oxygen Species
RPL24: Ribosomal Protein L24
RPN1: Ribophorin I
SAM: Significance Analysis of Microarrays
SCRT2: Scratch Homolog 2, Zinc Finger Protein (Drosophila)
SEC31A: SEC31 Homolog A (S. cerevisiae)
SELE: Selectin E
SET: SET Nuclear Oncogene
SLC23A3: Solute Carrier Family 23 (Nucleobase Transporters), Member 3
SF3A1: Splicing Factor 3a, Subunit 1, 120kDa
SIRT1: Sirtuin 1
SOD: Superóxido Dismutase
SPP1: Secreted Phosphoprotein 1
SRXN1: Sulfiredoxin 1
SSB: Single Strand Break
Sur-1: ATP-Binding Cassette, Sub-Family C (CFTR/MRP), Member 8
TCF7L2: Transcription Factor 7-Like 2 (T-cell specific, HMG-box)
TG: Timina Glicol
TCR: Transcription Coupled Repair
TEP1: Telomerase-Associated Protein 1
TNF: Tumor Necrosis Factor
TNF- α : Tumor Necrosis Factor-alpha
TP53: Tumor Protein P53
TSHR: Thyroid Stimulating Hormone Receptor
UCP3: Uncoupling Protein 3 (Mitochondrial, Proton Carrier)
UI: Unidades
UPR: Unfolded Protein Response
UTR: Região Não Traduzida

Sumário

RESUMO	21
ABSTRACT	23
1. INTRODUÇÃO	31
1.1. Diabetes Mellitus Tipo 2	31
1.2. Estresse oxidativo e o Diabetes	34
1.3. Ação das ROS sobre o material genético e mecanismos de reparo do DNA	35
1.4. MicroRNA e Diabetes Mellitus	39
1.5. Hipótese	43
2. OBJETIVOS	45
2.1. Objetivo Geral	45
2.2. Objetivos Específicos	45
3. MATERIAL E MÉTODOS	48
3.1. Casuística	48
3.1.1. Pacientes com Diabetes Mellitus Tipo 2 e Indivíduos Sadios Não-Diabéticos	49
3.2. Coleta de Sangue e Separação de Células Mononucleares do Sangue Periférico (PBMCs)	51
3.3. Extração de RNA, Quantificação e Avaliação de sua Qualidade	51
3.4. Microarranjos para Detecção da Expressão de RNAm (Transcriptoma)	53
3.4.1. Amplificação e Marcação do RNA	53
3.4.2. Purificação e Quantificação do RNA Amplificado e Marcado	54
3.4.3. Hibridação das Amostras com as Lâminas de Microarranjos	54
3.4.4. Lavagem das Lâminas de Microarranjos e Aquisição de Imagens	55
3.5. Microarranjos para Detecção da Expressão de microRNA (miRnoma)	55
3.5.1. Amplificação e Marcação de microRNAs	55
3.5.2. Hibridação das Amostras com as Lâminas de Microarranjos	58

3.5.3. Lavagem das Lâminas de Microarranjos e Aquisição de Imagens.....	58
4. FORMA DE ANÁLISE DOS RESULTADOS	59
4.1. Análise dos dados.....	59
4.2. Quantificação, Normalização e Ajuste dos Dados	60
4.3. Análise Estatística Rank Products	61
4.4. Análise de Enriquecimento Funcional (RNAm).....	61
4.5. Priorização gênica (RNAm)	62
4.6. Análise de Grupos Gênicos (GSA, do inglês Gene Set Analysis) e Análise de Enriquecimento de Grupos Gênicos (GSEA, do inglês Gene Set Enrichment Analysis) (RNAm)	64
4.7. Predição de Interações microRNA-RNAm	66
5. RESULTADOS	69
5.1. Caracterização das Amostras de Pacientes DM2 e Controles Estudados	69
5.2. Avaliação da Qualidade e Integridade das Amostras de RNA	69
5.2. Normalização e Ajuste dos Dados de Expressão (RNAm e microRNA)	71
5.3. Análise Estatística Rank Products, Priorização Gênica e Análise de Enriquecimento Funcional	75
5.4. GSA e GSEA	80
5.5. Análise Estatística Rank Products e Predição de Interações RNAm-microRNA	82
6. DISCUSSÃO.....	89
7. Conclusões	103
8. Referências bibliográficas.....	106
ANEXOS	116

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

O Diabetes Mellitus (DM) é uma doença caracterizada pelo aumento do estresse oxidativo, indicado por elevadas concentrações de produtos da peroxidação de lipídeos (Lyons e Jenkins, 1997). Uma das características mais marcantes da doença é a hiperglicemia, caracterizada pelo aumento dos níveis de glicose no sangue acima dos níveis apresentados por indivíduos normais, sendo esta a principal consequência da secreção deficiente da insulina ou da falha em compensar uma resposta menos eficiente à insulina nos tecidos alvos (White, 1997; Taylor, 1999). A insulina é um hormônio secretado pelas células β do pâncreas, responsável pelo controle das reservas de energia do corpo. Assim, regula a captação de glicose pelas células, promove a formação de reservas de glicogênio no fígado e de gordura nas células adiposas (White, 1997; Taylor, 1999). Sem o controle dos níveis de insulina secretada, o organismo não utiliza a glicose disponível no sangue e também deixa de formar reservas, gerando a hiperglicemia.

O diabetes leva à redução da expectativa e da qualidade de vida dos pacientes, assim como ao aumento de risco às doenças do coração, infarto, neuropatias periféricas, doenças renais, cegueira e amputações (Brownlee, 2001). O aumento do estresse oxidativo provocado pela hiperglicemia é o principal fator que leva às complicações do diabetes. A hiperglicemia estimula a formação de ROS por uma variedade de fontes, como a fosforilação oxidativa e a oxidação da glicose, por exemplo (Valko et al., 2006).

As formas mais comuns do diabetes são o de tipo 1 (DM1) e o do tipo 2 (DM2). Uma parcela relativamente pequena (cerca de 10%) dos pacientes apresentam o DM1, a qual é dependente de insulina (Niedowicz e Daleke, 2005). Entretanto, a maioria dos pacientes são portadores do DM2, que é a forma mais comum da doença. Estes são capazes, pelo menos inicialmente, de produzirem insulina, mas são deficientes em sua resposta celular.

1.1. Diabetes Mellitus Tipo 2

O DM2 é a forma mais comum de Diabetes, chegando a afetar mais de 90% dos pacientes. A doença é caracterizada principalmente pela resistência à ação da insulina e também pela deficiência na secreção deste hormônio, apresentando grande relação com o envelhecimento, obesidade e sedentarismo (Golay e Ybarra, 2005). Não se sabe se durante o desenvolvimento da doença ocorre primeiro a resistência à insulina ou a sua secreção deficiente; no entanto, a resistência à insulina parece ser um fator determinante, principalmente relacionado à obesidade, sendo que cerca de 60 a 90% de todos os pacientes com DM2 são ou foram obesos (Gerich, 1999; Golay e Ybarra, 2005; Stumvoll et al., 2005).

A obesidade provoca uma resposta inflamatória crônica localizada no tecido adiposo e caracterizada por uma produção anormal de citocinas, que inclui em sua maior parte, moléculas de resposta ao estresse (Sethi e Hotamisligil, 1999). Estas células adiposas liberam grandes quantidades de TNF- α (*Tumor Necrosis Factor*), que por sua vez atuam no receptor de insulina, inibindo a sua atividade de tirosina quinase, culminando com a resistência à insulina (Sethi e Hotamisligil, 1999; Kohn et al., 2005). Além disso, o excesso de gordura leva a um aumento no número de moléculas de ácidos graxos livres no sangue. Como consequência, ocorre uma utilização preferencial de lipídeos como fonte de energia, principalmente pelos músculos, o que impede a utilização da glicose e a síntese de glicogênio, levando à hiperglicemia. Com a resistência do receptor, há um aumento na secreção de insulina para compensar tal efeito, mas essa condição leva gradualmente ao desenvolvimento da doença (Lam et al., 2003; Golay e Ybarra, 2005).

Muitos estudos sugerem que a disfunção das células β resulta de uma exposição prolongada a altos níveis de glicose, ácido graxo, ou da combinação de ambos (Evans et al., 2003). As células β são particularmente sensíveis às ROS por apresentarem baixos níveis de enzimas antioxidantes (catalase, gultationa peroxidase e superóxido dismutase). Portanto, o estresse oxidativo leva a um sério comprometimento ao nível das mitocôndrias e ao bloqueio da secreção de insulina (Valko et al., 2007).

Os mecanismos bioquímicos e processos fisiológicos que caracterizam a DM2 ainda não são bem elucidados. Alguns genes de susceptibilidade já foram detectados, entre eles, os genes de metabolismo celular *PPAR γ* (*PPARG*) (Barroso et al., 2006), *KCNJ* (Schwanstecher e Schwanstecher, 2002) e *CAPN10* (Cox et al., 2004), os fatores de transcrição *HNF4A* (Damcott et al., 2004; Hara et al., 2006) e

TCF7L2 (Florez et al., 2003; Barroso et al., 2006). Os genes ENPP1, RBP4 e SIRT1 são fortes candidatos a fatores de susceptibilidade à DM2, embora ainda necessitem ser validados (Freeman e Cox, 2006). ENPP1 atua tanto na resistência à insulina quanto no desenvolvimento da obesidade (Meyre et al., 2005). A proteína RBP4 promove resistência sistêmica à insulina quando se encontra em altas concentrações e, quando presente em baixos níveis, promove uma maior sensibilidade à mesma (Yang et al., 2005). A superexpressão de SIRT1 aumenta a secreção de insulina pelas células B, provavelmente devido à maior eficiência na produção de ATP no processo de fosforilação oxidativa (Moynihan et al., 2005).

Os pacientes com DM2 podem apresentar uma redução na eficiência dos mecanismos de defesa antioxidantes, devido à diminuição nas atividades das enzimas glutathione peroxidase, catalase e superóxido dismutase, além da diminuição dos níveis de antioxidantes. Em consequência, os pacientes podem apresentar um elevado risco ao aparecimento de doenças relacionadas ao estresse (Blasiak et al., 2004).

Atualmente, o tratamento do DM2 é limitado a terapias com medicamentos que melhoram as condições da doença, como a resistência insulínica, porém, estas não visam a restauração do metabolismo normal da glicose, fato que deixa os pacientes expostos aos riscos das complicações dessa doença. Normalmente, o tratamento dos pacientes consiste na injeção de insulina para compensar a deficiência desta, mas o tratamento é complicado, principalmente devido à falta de controle da secreção, que é feita pelas células β , ajustando com precisão a quantidade de insulina secretada de acordo com as necessidades do organismo. Como consequência, freqüentemente os pacientes apresentam quadros de hipoglicemia e hiperglicemia, ambas com sérias consequências para o diabético, pois a primeira pode levar ao coma, enquanto que a segunda pode levar à cegueira, falha renal e doenças vasculares (Taylor, 1999; Kruger et al., 2006).

Assim, o tratamento do DM2 visa principalmente a diminuição da hiperglicemia, por meio de dois mecanismos principais: aumento da secreção de insulina por parte do pâncreas ou pela diminuição na produção de glicose pelo fígado. Uma das drogas mais utilizadas no tratamento dessa doença é a metformina, mas são utilizados também antagonistas de PPAR γ (*peroxisome proliferator-activated receptor- γ*), que atuam aumentando a sensibilidade do receptor de insulina, além da própria insulina, que suprime a produção de glicose e aumenta a

sua utilização. No entanto, o tratamento, apesar de ser bem assimilado pela maioria dos pacientes, pode apresentar efeitos colaterais, como acidose do sangue, hipoglicemia e distúrbios gastro-intestinais (Moller, 2001).

1.2. Estresse oxidativo e o Diabetes

O genoma das células eucarióticas encontra-se constantemente a agressões por agentes endógenos, além dos exógenos. Os agentes endógenos resultam de produtos do metabolismo celular normal, sendo que os principais são as espécies reativas de oxigênio (ROS- *reactive oxygen species*), geradas por diversas condições, normais ou patológicas. No diabetes, a hiperglicemia estimula a formação de ROS por uma variedade de fontes, como a fosforilação oxidativa e a oxidação da glicose (Zhou e Bartek, 2004; Valko et al., 2007). Entretanto, ainda não é bem conhecido se o aumento do estresse oxidativo provocado pelo excesso de glicose no sangue é responsável pelo desenvolvimento das complicações clínicas apresentadas pelos diabéticos, ou ainda, se o mesmo compromete o funcionamento das células beta-pancreáticas.

Entre as ROS, destacam-se os ânions superóxidos, radicais hidroxilas e peróxido de hidrogênio, derivados de forma endógena no organismo, como subprodutos da fosforilação oxidativa e da peroxidação de lipídeos (Houtgraaf et al., 2006).

As células são dotadas de mecanismos de defesa que as tornam capazes de combater os radicais livres, ou mesmo prevenir a sua formação. Tais mecanismos incluem os processos de reparo do DNA e os antioxidantes não enzimáticos, como as glutationas, bem como sistemas enzimáticos que envolvem a participação da superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutational peroxidases (GPx) (Remacle et al., 1992; Michiels et al., 1994). Assim, o estresse oxidativo resulta da falta de equilíbrio entre a geração de radicais livres e a eficácia dos mecanismos de defesa antioxidante existentes na célula, que podem atuar diretamente nas ROS, neutralizando os efeitos de sua alta reatividade (Saha et al., 2005).

As ROS são instáveis e apresentam um ou mais elétrons desemparelhados, resultando em certo grau de reatividade (Valko et al., 2004). Sob elevadas concentrações, as ROS podem danificar gravemente as estruturas celulares (Poli et

al., 2004). As espécies reativas podem causar danos oxidativos em grande número de moléculas, como carboidratos, proteínas, lipídeos e também DNA. Em condições de desequilíbrio, as células se tornam expostas aos efeitos maléficos dos danos oxidativos (Nuttall et al., 1999).

Em diabéticos, o excesso de glicose contribui significativamente para a produção de radicais livres, sendo que nesses pacientes, os mecanismos de defesa antioxidante não são capazes de compensar ou neutralizar a quantidade de radicais formados, havendo evidência de atividade reduzida das enzimas antioxidantes, como a SOD, a catalase e a glutathione redutase (Seghrouchni et al., 2002). Assim, ocorre aumento na geração de ROS e, conseqüentemente, aumento de dano oxidativo (Nishikawa et al., 2000; Blasiak et al., 2004). Adicionalmente, existe ainda a contribuição de alguns outros processos, como o de formação de AGEs (*advanced glycation end products*), por exemplo, que iniciam as cascatas relacionadas ao dano oxidativo e são tóxicos para as células, incluindo as células β do pâncreas (Piperi et al., 2012).

A 8-oxoG (8-oxo-guanina) é uma base modificada que pode servir como marcador de estresse oxidativo no DNA (Collins et al., 1998; Valko et al., 2006). A comprovação da presença da 8-oxoG em pacientes com diabetes seria interessante para testar a hipótese de que o estresse oxidativo, relacionado ao dano no DNA, pode constituir importante fator na patogênese do diabetes. Estudos preliminares em nosso laboratório indicam que os pacientes com DM-2, apresentando níveis glicêmicos elevados, mostram freqüências aumentadas de 8-oxo-G, comparativamente aos diabéticos DM2 compensados (dados não publicados). Entretanto, ainda não foram realizados estudos de expressão gênica, o que está sendo proposto no presente projeto.

1.3. Ação das ROS sobre o material genético e mecanismos de reparo do DNA

O dano oxidativo no DNA é reconhecido como a maior causa de morte celular e mutações em todos os organismos aeróbicos, sendo que as ROS representam a classe mais importante de radicais, os quais são gerados nos seres vivos. Devido a

isso, o dano oxidativo no DNA é associado ao desenvolvimento de várias doenças, como o câncer, doenças degenerativas e o próprio envelhecimento (Bjelland e Seeberg, 2003; Valko et al., 2004). Sugere-se que no caso do diabetes, o dano oxidativo ocorra como consequência da doença, mas adicionalmente, existe a hipótese de que o estresse oxidativo, relacionado ao dano no DNA, possa também constituir importante fator na patogênese do diabetes, visto que a geração de ROS pode comprometer as funções das células β -pancreáticas (Tyrberg et al., 2002). Assim, as ROS podem participar na etiopatogenia do diabetes, tanto na indução como nas complicações da doença.

O ânion superóxido ($\cdot 2O_2^-$), produzido pela adição de elétrons ao oxigênio durante a respiração ou por outros processos, é considerado como ROS primário, podendo posteriormente reagir com outras moléculas, formando ROS secundários. Apesar de apresentar um elétron não pareado, o ânion superóxido não é capaz de reagir diretamente com proteínas, lipídeos ou mesmo com o DNA, sendo que a sua ação ocorre de forma indireta (Desideri e Falconi, 2003; Valko et al., 2006). Algumas enzimas atuam para eliminar este radical e seus subprodutos da célula. A superóxido desmutase (SOD) catalisa a reação em que o superóxido sofre adição de elétrons, formando peróxido de hidrogênio ($\cdot 2O_2^- + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$). Além da SOD, existem outras enzimas que atuam sobre o peróxido de hidrogênio, como a catalase e a glutathione redutase (Michiels et al., 1994).

A geração de outros radicais está intimamente ligada à presença de algum metal livre no interior da célula. Normalmente, há um controle sobre a quantidade de metais no meio celular, garantindo que a maioria desses esteja ligada em alguma molécula, muitas vezes essencial para a ação das mesmas. No entanto, em situações de estresse, uma grande quantidade de ânion superóxido é produzida, atuando na redução e liberação dos metais de suas respectivas moléculas, como o ferro, por exemplo (Leonard et al., 2004).

Esses metais livres podem participar da reação de Fenton, atuando como catalisadores na quebra do peróxido de hidrogênio, levando à formação do radical hidroxil ($Fe(II) + H_2O_2 \rightarrow Fe(III) + \cdot OH + OH^-$) (Leonard et al., 2004). Esse radical é altamente reativo, tendo meia-vida extremamente curta (menos de 1 nanosegundo), com atuação em regiões próximas daquelas onde foi formado (Valko et al., 2006). A formação do radical hidroxila, assim como de outros tipos de ROS, próximos ao DNA, pode levar a uma série de danos que incluem mudanças de bases, quebras

simples e duplas, assim como *crosslinks*, o que caracteriza as ROS como potentes agentes genotóxicos (Dizdaroglu et al., 2002).

Durante muito tempo, grande parte dos estudos sobre danos e estresse oxidativo no DNA se basearam na formação e processamento das quebras de cadeia. Com o desenvolvimento de novos métodos de pesquisa, tornou-se possível também o estudo dos efeitos das ROS sobre as bases do DNA; esses danos são tão prejudiciais para a sobrevivência da célula quanto as quebras no DNA (Bjelland e Seeberg, 2003).

As quatro bases podem ser suscetíveis à oxidação, com várias modificações já documentadas (Bjelland e Seeberg, 2003). No entanto, as mais importantes são a 8-oxo-guanina (8-oxoG) e a timina glicol (TG), por serem encontradas de forma abundante em resposta ao estresse oxidativo e também por sua estabilidade. As formas oxidadas da timina foram as primeiras a serem identificadas no DNA. Entre elas, a TG pode trazer várias conseqüências para a estabilidade da célula se não for corretamente retirada do DNA, pois essa base modificada pode causar bloqueio na duplicação e transcrição do DNA (Hatahet et al., 1994). Apesar de a guanina ser a base com menor potencial de oxidação, é a mais facilmente oxidada (8-oxoG) e, por isso, a base oxidada mais estudada. Como a 8-oxoG não parece provocar significativo bloqueio na polimerização, a principal conseqüência da formação de 8-oxoG reside nas mutações que podem provocar por meio de transversões. Assim, a presença de 8-oxoG pode causar erros no pareamento de bases, durante a duplicação do DNA. Ao invés da adição de uma citosina, podem ser adicionadas adeninas ou timinas, que se pareiam com a 8-oxoG, causando mutações, gerando assim, aumento de instabilidade genômica (Shibutani et al., 1991; Bjelland e Seeberg, 2003). Em conseqüência, diversas alterações gênicas, ainda não estudadas, podem ser detectadas.

A enzima OGG1 (*8-oxoguanine DNA glycosylase*) é a principal implicada no processo de reparo dos aductos 8-oxo-G, havendo evidências de super-expressão do gene *OGG1* em células pancreáticas de pacientes com DM-2 (Tyrberg et al., 2002). Segundo esses autores, o aumento de expressão de *OGG1* na mitocôndria é compatível com o modelo no qual a hiperglicemia e conseqüente metabolismo aumentado do dano oxidativo levaria ao dano no DNA e indução da expressão de *OGG1*. Esses achados reforçam a hipótese de que o estresse oxidativo relacionado ao dano no DNA pode constituir importante fator na patogênese do DM-2.

Os mecanismos de reparo do DNA e os *checkpoints* atuam conjuntamente na manutenção da integridade genômica das células danificadas e, conforme já mencionado, os radicais livres formados nas células podem ativar vários processos de reparo, visto que produzem amplo espectro de lesões no DNA, como danos nas bases e quebras no DNA – *single strand breaks* (SSBs) e *double strand breaks* (DSBs). As DSBs são consideradas o tipo de lesão de maior efeito biológico relativo à formação de aberrações cromossômicas, morte celular e transformação. São conhecidos vários sistemas de reparo do DNA, sendo que dois mecanismos principais atuam sobre as DSBs em mamíferos: a) A recombinação homóloga (*homologous recombinational repair* - HRR) e b) Junção de extremidades não-homólogas (*non-homologous end joining* - NHEJ) (Valerie e Povirk, 2003). O HRR ocorre em células meióticas e em células mitóticas, sendo que nessas, está associado ao processo de duplicação do DNA. NHEJ liga diretamente as duas extremidades lesadas. HRR pode ser considerado como um reparo livre de erros, uma vez que utiliza uma fita de DNA homóloga como molde, enquanto NHEJ, geralmente, leva à perda da integridade genética. De acordo com Karran (2000), defeitos em componentes da maquinaria de reparo das DSBs estão associados à predisposição ao câncer. NHEJ é importante em todas as fases do ciclo celular, enquanto HRR é particularmente importante em S e transição S/G2.

No que se refere a alterações de bases, outros mecanismos de reparo, tais como *nucleotide excision repair* (NER) e *mismatch repair* (MMR) estão envolvidos no processamento dos danos como alquilações (metilações e cloroetilações), sítios abásicos, quebras e *crosslinks* entre as fitas do DNA. O reparo do tipo NER apresenta os seguintes passos: (1) reconhecimento da lesão no DNA; (2) recrutamento do complexo de reparo; (3) preparação do DNA para o reparo pela ação de helicases; (4) incisão na fita danificada, de cada lado da lesão, com a liberação do fragmento danificado com cerca de 24-32 nucleotídeos; (5) preenchimento do *gap*; e (6) ligação do novo fragmento sintetizado (ligação fosfodiéster). O NER apresenta duas vias que são: *global genomic repair* (GGR) e *transcription coupled repair* (TCR). GGR atua em danos de regiões não transcritas do DNA e o TCR, em regiões transcricionalmente ativas (Balajee e Bohr, 2000).

As mutações ocorridas nas bases do DNA são também reparadas pelo mecanismo de BER (*base nucleotide excision*) que inclui: (a) excisão da base danificada por uma DNA glicosilase; (b) incisão no esqueleto do DNA no sítio

apurínico (AP); (c) remoção da extremidade AP; (d) preenchimento do *gap* formado; e (e) ligação da nova fita sintetizada. BER é a principal via de reparo em células de mamíferos, atuando contra danos de fita simples causados por agentes metilantes, oxidantes e outros agentes genotóxicos, além de grande número (cerca de 10 000 por células por dia) de despurinações espontâneas (Ataian e Krebs, 2006). A ativação da via de reparo BER ocorre pela perda não enzimática de bases ou pelas DNA glicosilases, que são as responsáveis pela retirada da base danificada e pela criação dos sítios abásicos do tipo AP.

Resumidamente, as DSBs podem ser reparadas por HR ou NHEJ e a maioria das alterações nas bases do DNA é, por outro lado, removida pelo mecanismo BER e NER, sendo que a via NER remove principalmente aductos que distorcem a conformação do DNA. Entretanto, podem ocorrer algumas sobreposições nos substratos das proteínas e essas podem, eventualmente, atuar em mais de uma via de reparo. Tais vias e genes participantes das mesmas podem ser identificados por estudos de expressão gênica em escala genômica.

Há evidência de que a diminuição da eficiência de reparo do DNA também está associada ao DM-2 (Collins et al., 1998; Blasiak et al., 2004), mas ainda não existem estudos na literatura que realmente comprovem tal associação, principalmente em termos de genes diferencialmente expressos.

Sem dúvida, uma abordagem de estudo que envolva *screening* inicial de genes diferencialmente expressos, analisados pelo método de micro-arranjos, poderá apontar genes ou classes de genes com papel relacionado ao estresse oxidativo e ao reparo de DNA no DM2. Com essa estratégia, poder-se-á obter informações relevantes para esclarecer o papel do dano oxidativo na patogênese do diabetes.

1.4. MicroRNA e Diabetes Mellitus

Durante os últimos anos, um grande esforço tem sido direcionado ao estudo da expressão gênica transcricional em escala genômica, sendo que várias vias de sinalização já foram descritas para vários processos celulares, assim como as proteínas participantes. No entanto, estudos envolvendo pequenos RNAs, os quais

participam do controle da expressão gênica, demonstrou que a regulação transcricional não se limita apenas a fatores protéicos (Baroukh et al., 2007).

MicroRNAs são pequenos RNAs não-codificantes formados por ~18 a 22 nucleotídeos, envolvidos principalmente no silenciamento gênico (Lagos-Quintana et al., 2001). Os primeiros microRNAs descobertos foram o *lin-4* e o *let-7*, os quais são cruciais para a regulação temporal do desenvolvimento do nemátodo *Caenorhabditis elegans* (Lee e Bernstein, 1993). Desde então, centenas de microRNAs foram identificados em plantas e animais, sendo que mais de 2042 foram descritos apenas em seres humanos. Estes microRNAs são importantes reguladores gênicos que participam de diferentes processos que incluem diferenciação, proliferação, apoptose, secreção de insulina, assim como no desenvolvimento de uma série de órgãos, como coração, cérebro e músculos (Bartel, 2004; Harfe, 2005; Krutzfeldt e Stoffel, 2006).

A via de formação do microRNA envolve uma série de processos até a formação do microRNA maduro, o qual é responsável pelo silenciamento gênico. Longos transcritos de RNA (pri-microRNAs) são transcritos pela polimerase II e III e posteriormente clivados por um complexo formado pela enzima Drosha e por sua parceira DGAR8, formando o pre-microRNA (Lee et al., 2003; Marquez e McCaffrey, 2007). Posteriormente, o pre-microRNA é transportado para o citoplasma pela Exportina 5, onde irá sofrer uma segunda clivagem pelo complexo Dicer/TRBP, formando um duplex de RNA de aproximadamente 20 nucleotídeos ((Hutvagner et al., 2001; Marquez e McCaffrey, 2007).

Usualmente, apenas uma cadeia do duplex do microRNA é incorporado no complexo de silenciamento formado no RNA mensageiro (mRNA) alvo, apesar de não ser uma regra. Este complexo é formado pelo microRNA, uma proteína da família *Argonaute*, além da enzima Dicer e TRBP. Uma vez que o microRNA se liga nesta região de silenciamento, este irá se parear com a região não traduzida (UTR) de seu mRNA alvo, induzindo o seu silenciamento (Marquez e McCaffrey, 2007; Peters e Meister, 2007).

Mirtrons, uma subclasse especial de microRNAs, não precisam ser clivados para formarem um microRNA maduro. Um mirtron é processado em um pré-microRNA pelo próprio mecanismo de *splicing*. Um certo número de mirtrons já foram identificados *in silico* nos mamíferos, sendo que esta classe de microRNA

parece ter evoluído de maneira independente dos encontrados em insetos e nemátodos (Berezikov et al., 2007; Ku e McManus, 2008).

Os microRNA podem reprimir seus mRNAs alvo por uma variedade de mecanismos. Isto dependerá principalmente do grau de complementaridade do microRNA com a sequência alvo. Se há uma complementaridade perfeita, o microRNA irá causar a clivagem do mRNA, apesar deste mecanismo provavelmente ser raro em mamíferos. Entretanto, não havendo um pareamento perfeito, como ocorre na maioria dos microRNAs descritos até o presente, pode ocorrer uma inibição traducional, assim como uma desestabilização do microRNA pela remoção do *cap* e da cauda poli-adenina (Bagga et al., 2005; Berezikov et al., 2007; Ku e McManus, 2008).

Há evidência de que a especificidade do microRNA está ligada principalmente a uma pequena sequência de nucleotídeos, de aproximadamente 8 pares de base, chamada de *seed sequence*. Como esta região apresenta um pequeno número de pares de base, um microRNA poderia se ligar em um grande número de mRNAs, regulando a expressão de um grande número de genes (Lim et al., 2005; Stark et al., 2005).

Estudos de clonagem das células pancreáticas β de ratos da linhagem MIN6 revelaram 67 sequências distintas de microRNA. Entre elas, a sequência miR-375 foi identificada como a mais abundante (Poy et al., 2007). Investigações sobre o potencial papel de miR-375 mostraram que este pode participar na regulação da liberação de insulina estimulada por glicose (Poy et al., 2007). Embora o exato mecanismo de atuação desse microRNA seja desconhecido, a super-expressão de miR-375 foi associado à repressão do gene *myotrophin* (*MTPN*), um conhecido regulador da liberação de catecolamina (Yamakuni et al., 2002). Além disso, o silenciamento de *MTPN* por RNA de interferência inibiu a liberação de insulina induzida por glicose, sugerindo que a regulação da secreção da insulina por miR-375 é mediada, pelo menos em parte, pelo seu efeito sobre *MTPN*. Em outro trabalho, a super-expressão de miR-375 bloqueou a secreção de insulina induzida por glicose, ao passo que a repressão de miR-375 promoveu o aumento da secreção de insulina (Poy et al., 2007). Os mesmos autores mostraram que o mecanismo pelo qual a secreção é modificada por miR-375 é independente de mudanças no metabolismo da glicose ou da sinalização intracelular de cálcio, mas está correlacionado com a exocitose da insulina.

As evidências de que os microRNAs podem ser reguladores da secreção de insulina sugerem que estes são capazes de influenciar os níveis de glicose e talvez exerçam um papel na patogênese de doenças metabólicas como a Diabetes Mellitus.

O microRNA-124a também é encontrado de forma abundante nas ilhotas do pâncreas, estando implicado tanto no desenvolvimento quanto na função das células beta pancreáticas, sugerindo um papel importante na diferenciação dessas células (Baroukh et al., 2007). Foi demonstrado que o microRNA-124a regula a expressão do fator de transcrição Foxa2 através da interação direta com o UTR deste gene, onde o microRNA regula negativamente a expressão do fator de transcrição. Além disso, foi relatado que uma maior expressão do microRNA-124a também afeta a expressão de três dos alvos do fator de transcrição Foxa2: *Pdx-1*, *Kir6.2* e *Sur-1*, sendo que um destes, o *Pdx-1*, também tem sua expressão regulada pelo microRNA-375, o que indica que microRNA-124a e microRNA-375 podem atuar de maneira sinérgica na regulação da secreção da insulina (Baroukh et al., 2007; Poy et al., 2007).

Ainda, o fator de transcrição Foxa2, além de seu papel no mecanismo de secreção da insulina, também pode atuar como um regulador transcricional que leva à sensibilidade à insulina, um dos fatores mais importantes ligados à patogênese do DM2 (Puigserver e Rodgers, 2006).

A resistência à insulina pode ser monitorada através de uma menor fosforilação dos dois principais substratos do receptor de insulina: IRS1 e IRS2. Ambas as proteínas sinalizam as proteínas PI3K e Akt, as quais irão continuar a cascata de sinalização. Os fatores de transcrição Foxo1 e Foxo2 são alvos diretos da proteína Akt, sendo que o estímulo provocado pela insulina em seu receptor inibe a ação de Foxa2, enquanto que em menores concentrações plasmáticas de insulina, a Foxa2 se transloca para o núcleo e ativa genes envolvidos na oxidação de ácidos graxos e na glicólise (Wolfrum et al., 2004; Puigserver e Rodgers, 2006).

Assim, as atividades de microRNA-124a e de microRNA-375 estão relacionadas tanto com a secreção de insulina, quanto com a sensibilidade ao hormônio, devido à influência destes microRNAs na atividade do fator de transcrição Foxa2. Tais informações estimulam a realização de estudos sobre os perfis de expressão de microRNAs, buscando verificar a influência destes sobre seus alvos em linfócitos de pacientes com diabetes.

Entretanto, a hiperglicemia e a hiperlipidimia não são os únicos responsáveis pela grande produção de radicais livres em pacientes com Diabetes. Há evidência de que outros fatores podem estar envolvidos, tanto aqueles peculiares à doença quanto os que são relacionados às consequências da própria hiperglicemia (Inagi, 2011). Ainda necessita ser esclarecido se realmente existe uma diminuição da defesa anti-oxidante e um reparo menos eficiente em linfócitos de pacientes com DM2. Dessa forma, tecnologias desenvolvidas em escala genômica, como o método de *DNA microarrays*, constituem importantes ferramentas, visto que possibilitam estudar os perfis transcricionais da totalidade de genes do genoma, comparando amostras de pacientes em situação de hiperglicemia com aquelas de indivíduos normais.

1.5. Hipótese

Pacientes DM2 descompensados, por estarem expostos a maiores níveis de glicemia em comparação a pacientes DM2 compensados, apresentam genes, microRNAs ou processos funcionais diferencialmente expressos quando comparados, ajudando a elucidar o papel e as consequências da hiperglicemia e do mau controle da doença em pacientes com DM2

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

O presente trabalho teve como objetivo geral avaliar os perfis de expressão transcricional de RNAm e de microRNAs das células mononucleares do sangue periférico (PBMCs, do inglês *Peripheral Blood Mononuclear Cells*,) de pacientes DM2 compensados e descompensados (quanto aos níveis glicêmicos) comparados entre si e com indivíduos saudáveis não-diabéticos, dando enfoque a genes e/ou conjunto de genes associados a resposta ao estresse oxidativo e reparo do DNA e a microRNAs que possivelmente regulam essas classes de genes.

2.2. Objetivos Específicos

- 1) Avaliar os perfis de expressão transcricional de RNAm em PBMCs de pacientes DM2 compensados e descompensados, comparados entre si e com o grupo controle, por meio do método de microarranjos para a detecção de genes com expressão significativamente alterada;
- 2) Identificar termos biológicos enriquecidos com genes diferencialmente expressos por meio da anotação funcional dos mesmos, principalmente termos relacionados ao reparo do DNA e resposta ao estresse oxidativo;
- 3) Buscar grupos gênicos com expressão significativa e/ou significativamente enriquecidos em pacientes DM2 compensados e descompensados, comparados entre si e relativamente ao grupo controle, principalmente grupos gênicos envolvidos em reparo do DNA e resposta ao estresse oxidativo;
- 4) Identificar associações (tanto previamente não descritas quanto as já descritas) entre um grupo de genes de interesse (diferencialmente expressos) e os processos

biológicos “reparo do DNA” e “resposta ao estresse oxidativo” por meio da priorização gênica;

5) Avaliar os perfis de expressão transcricional de microRNAs em PBMCs de pacientes DM2 compensados e descompensados, comparados entre si e com o grupo controle, por meio do método de microarranjos para a detecção de microRNAs com expressão significativamente alterada;

6) Identificar possíveis interações entre genes e microRNAs diferencialmente expressos, dando enfoque a genes associados ao reparo do DNA e resposta ao estresse oxidativo por meio de ferramentas de predição de interações.

MATERIAIS E MÉTODOS

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Casuística

O presente trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (HC-FMRP/USP) (processos nº 7066/2006 e 9154/2008 - Anexo A). Além disso, todos os indivíduos (pacientes DM2 e indivíduos sadios não-diabéticos) estudados no presente trabalho concordaram em participar da pesquisa e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo B). Uma vez coletadas e processadas, as amostras foram compartilhadas com outros participantes do Projeto Temático “Controle do Transcriptoma do Diabetes Mellitus” (Processo FAPESP no. 2008/56594-8).

Para o presente estudo foram utilizadas amostras de sangue periférico de 27 pacientes (11 do sexo masculino e 16 do sexo feminino) com Diabetes Mellitus Tipo 2, diagnosticados de acordo com os critérios da Associação Americana de Diabetes (Bloomgarden, 1997), atendidos na enfermaria do setor de Endocrinologia ou no ambulatório de Diabetes do HC-FMRP/USP. As amostras de sangue foram coletadas com a colaboração do Prof. Dr. Milton César Foss do Departamento de Clínica Médica (Endocrinologia e Metabologia) e da Prof^a Dr^a Maria Cristina Foss Freitas do Departamento de Clínica Médica (Endocrinologia e Metabologia e Nutrição). Os pacientes DM2 coletados foram divididos em dois grupos: aqueles que apresentaram níveis glicêmicos plasmáticos acima de 140 mg/mL e hemoglobina glicada (HbA1c) acima de 7% foram considerados descompensados (DM2-D), enquanto que os pacientes que apresentaram níveis glicêmicos e HbA1c abaixo dos valores citados foram considerados como compensados (DM2-C).

Em relação ao grupo controle, foram coletadas amostras de sangue periférico de 10 voluntários sadios não-diabéticos (05 do sexo masculino e 05 do sexo feminino). Estes indivíduos não apresentaram histórico de exposição às radiações, infecções ou medicamentos, bem como histórico de diabetes na família. Além disso, foram realizados testes de níveis glicêmicos e de hemoglobina glicada em todas as

amostras de sangue dos indivíduos controles, visando assegurar que nenhum deles apresentasse níveis maiores que os normais.

3.1.1. Pacientes com Diabetes Mellitus Tipo 2 e Indivíduos Sadios Não-Diabéticos

A idade dos pacientes DM2 variou de 38 a 72 anos ($\bar{x} = 52,8 \pm 9,1$) e as principais características clínicas dos mesmos estão apresentadas na **Tabela 1**. De modo geral, estes pacientes apresentaram hipertensão arterial sistêmica (HAS) e dislipidemia (DLP), além de que a maioria apresentou sobrepeso ou obesidade leve (IMC médio = $29,7 \text{ kg/m}^2$). Todos esses pacientes estavam em tratamento prévio, principalmente com os medicamentos Captopril (Capoten, Bristol–M–Squibb) e Metformina (Glucoformin, Glifage®), além de insulina humana (Biohulin®, bioBrás e Humulin R®, Lilly). Foram excluídos os pacientes que apresentaram complicações tardias, como retinopatia proliferativa, nefropatia consolidada, insuficiência renal, neuropatia autonômica e doenças cardíacas, as quais poderiam causar maior estresse oxidativo ao indivíduo, independentemente do diabetes.

Os indivíduos portadores de DM2 apresentaram valores de glicemia variáveis, de 53 a 319 mg/dL ($\bar{x} = 159,5 \pm 84,0$). A porcentagem de HbA1c observada nestes pacientes variou de 5,1 a 12 % ($\bar{x} = 8,4 \pm 2,1$). O grupo de pacientes DM2-C apresentou idade entre 42 a 72 anos ($\bar{x} = 55 \pm 9,4$), valores de glicemia e de hemoglobina glicada variando de 53 a 146 mg/dL ($\bar{x} = 102,7 \pm 26,6$) e de 5,1 a 8,2 % ($\bar{x} = 6,7 \pm 0,9$), respectivamente e, ainda, o tempo de duração da doença variou de 5 a 20 anos ($\bar{x} = 10,1 \pm 4,0$). Com relação ao grupo de pacientes DM2-D, a idade dos indivíduos variou de 38 a 66 anos ($\bar{x} = 51,2 \pm 8,9$), a glicemia de 92 a 319 mg/dL ($\bar{x} = 221,5 \pm 76,7$), a hemoglobina glicada de 7,8 a 12 % ($\bar{x} = 10,1 \pm 1,3$) e, por fim, o tempo de duração da doença de 1 a 20 anos ($\bar{x} = 8,9 \pm 7,1$).

O grupo controle apresentou idade entre 44 a 58 anos ($\bar{x} = 52,2 \pm 5,3$). Com relação aos valores glicêmicos, estes variaram de 77 a 100 mg/dL ($\bar{x} = 91,6 \pm 7,8$) e as porcentagens de hemoglobina glicada permaneceram entre 5,2 a 5,6 % ($\bar{x} = 5,4 \pm 0,1$) (**Tabela 2**).

Tabela 1: Principais características clínicas dos pacientes DM2 (DM2-C: pacientes DM2 compensados; DM2-D: pacientes DM2 descompensados; UI: unidades; NPH: Protamina Neutra de Hagedorn).

Paciente	Idade (anos)	Sexo	Insulina	Metformina (850 mg)	Duração da doença (anos)	Glicemia (mg/dL)	HbA1c (%)	Diabetes compensado
DM2-C1	44	M	Não utiliza	2x/dia	5	146	5,3	Sim
DM2-C2	72	F	Não utiliza	2x/dia	9	65	6,7	Sim
DM2-C3	62	M	NPH 30 + 30 + 30UI	3x/dia	15	109	7	Sim
DM2-C4	49	F	NPH 30 + 10UI	1x/dia	11	117	7,1	Sim
DM2-C5	58	M	NPH14 + 8UI	3x/dia	14	122	7,1	Sim
DM2-C6	59	M	NPH14 + 8UI	Não utiliza	8	130	6,9	Sim
DM2-C7	47	F	Não utiliza	2x/dia	10	92	5,8	Sim
DM2-C8	49	M	Não utiliza	3x/dia	8	130	7,5	Sim
DM2-C9	42	M	NPH 24 + 8UI	2x/dia	11	53	5,1	Sim
DM2-C10	45	F	NPH 14 + 8UI	2x/dia	9	81	8,2	Sim
DM2-C11	64	M	NPH 32 + 8UI	3x/dia	5	118	7	Sim
DM2-C12	66	F	NPH 14 + 8UI	3x/dia	20	91	6	Sim
DM2-C13	52	M	Não utiliza	2x/dia	10	100	6,6	Sim
DM2-C14	61	F	NPH 24 + 8UI	3x/dia	7	84	7,8	Sim
DM2-D1	38	M	Não utiliza	2x/dia	3	145	8	Não
DM2-D2	53	F	NPH 42 + 26UI; Regular 8 + 6UI	2x/dia	13	279	11,2	Não
DM2-D3	41	F	NPH 26 + 20UI; Regular 10 + 6UI	3x/dia	3	92	10,2	Não
DM2-D4	43	F	Não utiliza	3x/dia	4	173	10,7	Não
DM2-D5	60	F	NPH 30 + 20UI; Regular 10 + 8UI	Não utiliza	20	306	10,9	Não
DM2-D6	66	M	Não utiliza	2x/dia	5	183	9,4	Não
DM2-D7	51	F	NPH 24 + 14UI; Regular 8 + 6UI	Não utiliza	10	219	10,2	Não
DM2-D8	56	F	NPH 40 + 38UI	3x/dia	20	295	12	Não
DM2-D9	61	F	NPH 12UI	3x/dia	20	101	7,8	Não
DM2-D10	44	M	Não utiliza	3x/dia	5	276	10,5	Não
DM2-D11	60	F	NPH 60 + 35UI	3x/dia	9	319	11,4	Não
DM2-D12	45	F	NPH 40 + 10UI	3x/dia	1	254,1	9,6	Não
DM2-D13	47	F	NPH 14 + 8UI	3x/dia	3	237	9,4	Não

Tabela 2: Caracterização geral do grupo controle quanto à idade, sexo, níveis glicêmicos e % de hemoglobina glicada.

Indivíduo	Idade (anos)	Sexo	Glicemia (mg/dL)	HbA1c (%)
Controle-1	52	F	100	5,4
Controle-2	58	M	98	5,5
Controle-3	47	F	89	5,6
Controle-4	55	M	95	5,3
Controle-5	48	F	84	5,4
Controle-6	57	F	84	5,2
Controle-7	56	F	92	5,5
Controle-8	58	M	98	5,3
Controle-9	44	M	77	5,3
Controle-10	47	M	99	5,2

3.2. Coleta de Sangue e Separação de Células Mononucleares do Sangue Periférico (PBMCs)

As amostras de sangue periférico (20 mL) de cada indivíduo foram coletadas em tubos vacutainer (Beckton & Dickinson, EUA) contendo EDTA (0,054 mL/tubo). Após a coleta, cada amostra foi mantida sob refrigeração até a etapa de separação das PBMCs, realizada no mesmo dia da coleta, por meio de gradiente de densidade. Para tal, cada amostra foi diluída com solução salina 0,9% (1:1) e o sangue diluído foi então delicadamente adicionado a tubos contendo Histopaque 1077 (Sigma Chemical Co, EUA) (2:1) com posterior centrifugação a 2000 rpm por 15 minutos. Após o anel de PBMCs formado na interface plasma/Histopaque ter sido retirado com o uso de pipeta, solução salina 0,9% foi adicionada para lavagem das PBMCs seguido de centrifugação a 1000 rpm por 7 minutos. O sobrenadante foi então descartado e o precipitado de PBMCs foi ressuspendido em 200 µL de solução salina DEPC. Por fim, 3 mL de Trizol (Invitrogen) foram adicionados para a extração do RNA total.

3.3. Extração de RNA, Quantificação e Avaliação de sua Qualidade

Após a separação das PBMCs, procedeu-se a extração de RNA total. As células foram lisadas com o reagente Trizol (Invitrogen), com posterior adição de 200 µL de salina DEPC e 200 µL de clorofórmio para cada 1 mL de Trizol às amostras, que foram divulsionadas vigorosamente por 15 segundos e incubadas por 5 minutos a 15-30°C. Para a separação da solução em fases aquosa e orgânica, os tubos foram centrifugados a 12000 g por 15 minutos a 4°C, sendo que o RNA encontra-se exclusivamente na fase aquosa, a qual foi transferida para outro tubo. A precipitação do RNA procedeu-se com a adição de 800 µL de isopropanol para cada 1 mL de Trizol a -20°C *overnight*. Após este período, as amostras foram centrifugadas a 12000 g por 10 minutos a 4°C e o sobrenadante descartado. Posteriormente, foram realizadas três lavagens com 1 mL de etanol 75% DEPC gelado para cada 1 mL de Trizol. Durante cada uma das lavagens, as amostras foram vortexiadas por 1 minuto seguido de centrifugação a 7500 g por 5 minutos a 4°C. Após a etapa das lavagens e evaporação de todo o etanol, o RNA foi eluído em 15 µL de água livre de nuclease.

Todas as amostras de RNA foram quantificadas e avaliadas quanto a sua pureza utilizando *NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer* (Uniscience) e duas razões foram determinadas: 260/230 e 260/280, sendo que os valores ideais para cada razão, variam de 1,8 a 2,2 e de 1,8 a 2,0, respectivamente. Visando evitar a utilização de um RNA contaminado por proteínas, DNA, ou outras moléculas, somente as amostras que apresentaram razões dentro das faixas aceitáveis foram utilizadas.

A verificação da integridade do RNA foi realizada por meio de dois tipos de eletroforese: em gel de agarose com formaldeído e utilizando-se o *kit* RNA 6000 Nano (Agilent) e o bioanalisador 2100 (Agilent), seguindo as instruções do fabricante. No último, o gel para separação das amostras de RNA e as próprias amostras (100 ng de RNA) foram aplicadas em nano chips contendo microcanais interconectados, os quais foram usados para a separação dos fragmentos por eletroforese. A integridade das amostras de RNA foi medida pelo número de integridade do RNA (RIN, do inglês *RNA Integrity Number*), sendo que somente amostras que apresentaram valores de RIN acima de 7,0 (em uma escala até 10) foram utilizadas, pois segundo recomendado pela Agilent, amostras que apresentem valores de RIN < 7,0 não devem ser usadas para experimentos posteriores.

3.4. Microarranjos para Detecção da Expressão de RNAm (Transcriptoma)

A avaliação da expressão de RNAm dos indivíduos estudados foi realizada utilizando-se o *kit QuickAmp Labeling* (sistema monocolor – Cy3) e as lâminas *Human Genome 4x44 Oligo Microarrays* (cada uma contendo 4 x 44.000 oligos-alvo para análise de expressão de RNAm, perfazendo todo o genoma funcional e incluindo diversas isoformas) (Agilent Technologies, Santa Clara, CA). As sequências específicas de oligonucleotídeos são sintetizadas *in situ* (de arquivos de sequências digitais) em lâminas de vidro especialmente preparadas, base por base de forma uniforme, com o comprimento final de cada oligonucleotídeo sendo 60 bases. Além disso, o sistema de inspeção do controle de qualidade é feito em tempo real e, assim, confere a deposição das substâncias químicas a cada etapa do processo. Desse modo, o sistema de microarranjos da Agilent proporciona alta sensibilidade e especificidade.

3.4.1. Amplificação e Marcação do RNA

O *Spike-mix* (controle positivo da reação) foi diluído três vezes (1:20, 1:25, 1:10) em tampão de diluição e 2 µL da terceira diluição juntamente com 1,8 µL de *T7 Promoter Primer Mix* foram adicionados a 200 ng de RNA total. O *primer* e as amostras foram desnaturados por 10 minutos a 65°C e imediatamente incubados em gelo por 5 minutos. Posteriormente, 4,7 µL de *cDNA Master Mix* (2 µL de 5X tampão da primeira fita, 1 µL de 0,1 M DTT, 0,5 µL de 10 mM dNTP mix, 1,2 µL de *AffinityScript RNase Block Mix*) foram adicionados a cada amostra, seguido de incubação por 2 horas a 40°C para a síntese de cDNA. Em seguida, as amostras foram incubadas por 15 minutos em banho a 70°C para inativação das enzimas e imediatamente incubadas em gelo por 5 minutos. Finalmente, 6 µL de *Transcription Master Mix* (0,75 µL de água livre de nuclease, 3,2 µL de 5X tampão de transcrição, 0,6 µL de 0,1 M DTT, 1 µL de NTP mix, 0,21 µL de *T7 RNA Polymerase Blend*, 0,24

μL de cianina 3-CTP) foram adicionados às amostras, que foram então incubadas por 2 horas a 40°C para a síntese de cRNA marcado com cianina 3-CTP.

3.4.2. Purificação e Quantificação do RNA Amplificado e Marcado

O kit *Clean-up* (Illustra, GE Healthcare) foi usado para a purificação do RNA amplificado e marcado, de acordo com protocolo do fabricante, o qual consiste em ciclos de lavagens e centrifugações com os tampões RA1 e RA3 e etanol absoluto, com o cRNA sendo eluído em 40 μL de água livre de nuclease. Em seguida, o cRNA foi quantificado utilizando-se o *NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer* (Uniscience), sendo que somente amostras com concentração total de cRNA > 1,65 μg e atividade específica > 9,0 foram utilizadas para as etapas posteriores.

3.4.3. Hibridação das Amostras com as Lâminas de Microarranjos

Para o processo de hibridação das amostras, procedeu-se primeiramente a fragmentação do cRNA: 1,65 μg de cRNA marcado com cianina 3-CTP, 11 μL de 10X agente bloqueador, volume suficiente para 52,8 μL de água livre de nuclease e 2,2 μL de 25X tampão de fragmentação foram misturados e incubados por exatamente 30 minutos a 60°C, seguido de uma incubação imediata em gelo. Para bloquear a reação de fragmentação, 55 μL de 2X tampão de hibridação GEx foram adicionados. Posteriormente, 100 μL da solução resultante foram hibridados às lâminas através de incubação em um forno rotativo a 10 rpm por 17 horas a 65°C. O aparato de hibridação é separado por sistema de vedação, permitindo que em cada lâmina sejam feitas análises de quatro amostras simultaneamente.

3.4.4. Lavagem das Lâminas de Microarranjos e Aquisição de Imagens

Após a etapa de hibridação, as lâminas foram submetidas a lavagens com tampão 1 por 1 minuto à temperatura ambiente, seguida por lavagem com tampão 2 por 1 minuto a 37°C. Posteriormente, as lâminas foram incubadas em acetonitrila por 10 segundos e por fim em solução de secagem e estabilização por 30 segundos.

Finalmente, as imagens de hibridação foram obtidas em leitura de espectro verde (550 nm) em um *scanner* de microarranjo de DNA com tecnologia de alta resolução *Surescan* (Agilent Technologies).

O esquema da amplificação e marcação de RNA encontra-se ilustrado na **Figura 1**.

3.5. Microarranjos para Detecção da Expressão de microRNA (miRnoma)

A avaliação da expressão de microRNAs dos indivíduos estudados foi realizada utilizando-se o *kit Agilent microRNA Complete Labeling and Hyb* (sistema monocolor – Cy3) e as lâminas *Agilent Human miRNA Microarray 8X15K* (cada uma contendo 8 x 15.000 oligos-alvo para análise de expressão de microRNAs, perfazendo todo o conjunto de microRNAs humanos descritos) (Agilent Technologies, Santa Clara, CA). As sequências específicas de oligonucleotídeos são sintetizadas por meio da mesma tecnologia descrita para RNAm, ou seja, essas sequências são sintetizadas *in situ* (de arquivos de sequências digitais) em lâminas de vidro especialmente preparadas, base por base de forma uniforme.

3.5.1. Amplificação e Marcação de microRNAs

Para a desfosforilação do RNA, foram adicionados a 100 ng de RNA total, 2 µL de *Calf Intestinal Alkaline Phosphatase (CIP) Master Mix* (0,4 µL de 10X Tampão *Calf Intestinal Phosphatase*, 1,1 µL de água livre de nuclease, 0,5 µL de *Calf*

Intestinal Phosphatase), seguido de incubação por 30 minutos a 37°C. Após adição de 2,8 µL de DMSO 100%, as amostras foram incubadas por 5-10 minutos em banho a 100°C e imediatamente colocadas em água com gelo para desnaturação do RNA. Em seguida, procedeu-se a reação de ligação RNA-cianina3-pCp: 4,5 µL de *Ligation Master Mix* (1,0 µL de 10X Tampão T4 RNA Ligase, 3,0 µL de cianina3-pCp, 0,5 µL de T4 RNA Ligase) foram adicionados às amostras, seguido de incubação por 2 horas a 16°C. Esta marcação inclui os microRNAs presentes nas amostras. As preparações foram então submetidas ao *speed* vácuo a 45-55°C para completa secagem, visando a remoção de resíduos de DMSO, os quais afetam a etapa de hibridação.

Figura 1: Esquema de amplificação e marcação das amostras de RNA de acordo com as instruções do fabricante (Agilent Technologies). Adaptado de G4140-90040_Gene Expression_One-color_v6.5.

3.5.2. Hibridação das Amostras com as Lâminas de Microarranjos

As amostras foram ressuspensas em 18 µL de água livre de nuclease e, em seguida, 4,5 µL de 10X agente bloqueador e 22,5 µL de 2X Tampão de Hibridação Hi-RPM foram adicionados em cada amostra, procedendo-se incubação por 5 minutos a 100°C e imediatamente por 5 minutos em gelo. Finalmente, as amostras foram hibridadas a lâminas de microarranjo de microRNA por meio de incubação em um forno rotativo a 20 rpm por 20 horas a 55°C. O aparato de hibridação é separado por sistema de vedação, permitindo que em cada lâmina sejam feitas análises de oito amostras simultaneamente.

3.5.3. Lavagem das Lâminas de Microarranjos e Aquisição de Imagens

As etapas de lavagem das lâminas foram as mesmas descritas anteriormente para as lâminas de RNAm, com a diferença de que as lavagens com os tampões 1 e 2 foram realizadas por 5 minutos. As imagens de hibridação foram obtidas como descritas anteriormente para as lâminas de RNAm.

O esquema da hibridação da sonda com o microRNA alvo encontra-se ilustrado na **Figura 2**. Resumidamente, o RNA total foi submetido a uma etapa de desfosforilação, seguida da marcação do RNA desfosforilado com cianina3-pCp (adição do resíduo C à extremidade 3' do microRNA). As sondas ancoradas às lâminas contêm um resíduo G na extremidade 5', aumentando a estabilidade da ligação das sondas com os microRNAs-alvos marcados. Além disso, as sondas contêm uma estrutura tronco-alça também na extremidade 5', aumentando a especificidade pelo comprimento do microRNA-alvo, visto que esta estrutura desestabiliza a hibridação das sondas com RNAs longos (**A**). Ainda, com a finalidade de desestabilizar um pareamento de bases sonda-alvo muito estável, a hibridação é otimizada por meio da redução sequencial de bases pareadas na extremidade 5' do microRNA-alvo (**B**).

Figura 2: Esquema da hibridação da sonda com o microRNA-alvo.

4. FORMA DE ANÁLISE DOS RESULTADOS

A análise dos dados, quantificação, normalização, ajuste, bem como a análise estatística *rank products* foram realizadas para os dados de RNAm e de microRNA, conforme descritas a seguir.

4.1. Análise dos dados

A análise dos dados de expressão gênica foi realizada por meio de duas linguagens de programação: R e PERL. O R é uma linguagem e ambiente estatístico que pode ser ampliado por meio de vários pacotes com inúmeras funções (*R Development Core Team* – <http://www.r-project.org>), sendo que as análises nesse ambiente foram executadas no sistema operacional *Microsoft Windows*. A linguagem de alta capacidade Perl (*The Perl Programming Language* – www.perl.org), por sua vez, foi utilizada para o processamento dos dados a serem exportados para o

ambiente R, sendo que as análises em Perl foram executadas no sistema operacional UNIX.

4.2. Quantificação, Normalização e Ajuste dos Dados

O *software Feature Extraction*, versão 10.7 (Agilent Technologies), foi utilizado para a quantificação das imagens das lâminas de microarranjos, ou seja, extração dos valores numéricos a partir das imagens de hibridação, bem como para o controle de qualidade das hibridações. Os dados de RNAm e de microRNA foram extraídos usando os protocolos GE1_107_Sep09 e miRNA_107_Sep09, respectivamente. Subsequentemente, as medianas de ambos os dados brutos (*gMedianSignal*) e do *background* (*gBGMedianSignal*) foram selecionados da tabela de dados quantificados no sistema operacional UNIX e exportados para o ambiente R (versão 2.15.1). No último, foram realizadas a correção do *background* ($gMedianSignal - gBGMedianSignal$) e também a transformação dos dados em escala logarítmica ($\log_2$).

Posteriormente, ainda no ambiente R, os dados brutos foram normalizados pelo método quantile (normalização inter-lâminas, para tornar as amostras comparáveis entre si) através do pacote *aroma-light* (<http://www.bioconductor.org/packages/release/bioc/html/aroma.light.html>) (Bengtsson, Preprint 2004:18), sendo que a visualização dos dados normalizados foi feita por meio de gráficos em formato *boxplot*. O método quantile foi comparado a outros métodos de normalização e mostrou-se mais vantajoso no que diz respeito à redução da variação entre os microarranjos, sendo assim considerado o mais robusto e recomendado (Bolstad et al., 2003).

Em geral, não é possível realizar a amplificação e hibridação de todas as amostras de um estudo em um único experimento, sendo que isso também ocorreu no presente trabalho; assim, o intervalo entre experimentos pode variar de dias até meses, gerando diferenças não-biológicas que tornam amostras amplificadas e hibridadas em experimentos diferentes não diretamente comparáveis (Johnson et al., 2007). Portanto, os dados normalizados foram submetidos ao método Bayes empírico através da ferramenta ComBat em ambiente R (<http://www.bu.edu/jlab/wp->

assets/ComBat/Abstract.html – Johnson et al., 2007) para filtrar as variações não-biológicas, ou seja, os artefatos experimentais. Este método desenvolvido por Johnson et al. (2007) é robusto para ajustar as diferenças não-biológicas quando o número de amostras por grupo estudado é pequeno (menor que 25), o que é o caso do presente estudo.

Posteriormente, a análise do componente principal (PCA) foi realizada para visualizar a eliminação de artefatos experimentais através do pacote Ade4 em R (Chessel et al., 2004). O PCA combina várias dimensões em um espaço dimensional menor por meio de combinações lineares (eixos principais) de dimensões, facilitando a visualização dos dados.

4.3. Análise Estatística Rank Products

Para obter listas contendo os genes diferencialmente expressos (com significância estatística), bem como os microRNAs diferencialmente expressos, a análise *rank products* foi efetuada, utilizando o pacote RankProd (Hong et al., 2006) no ambiente R de forma pareada (pacientes DM2 compensados *versus* controles, pacientes DM2 descompensados *versus* controles e pacientes DM2 descompensados *versus* compensados). O *rank products* é um teste estatístico não-paramétrico que se mostrou mais confiável e consistente quando comparado a outros métodos (teste T e análise de significância de microarranjos (SAM, do inglês *Significance Analysis of Microarrays*) (Breitling et al., 2004). Ainda, o *rank products* identifica alterações na expressão gênica biologicamente relevantes (Breitling et al., 2004). Assim sendo, o *rank products* é considerado um dos testes estatísticos mais robustos para a análise de microarranjos. No presente estudo, os genes e os microRNAs que apresentaram valores de $p \leq 0,05$, juntamente com a predição de dados falso-positivos (PFP, do inglês *false positive predictions*) $\leq 0,05$, foram considerados significativos.

4.4. Análise de Enriquecimento Funcional (RNAm)

Após a análise estatística, a ferramenta de anotação funcional DAVID (*Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery* – <http://david.abcc.ncifcrf.gov/>) (Huang da et al., 2009b; Huang da et al., 2009a) foi utilizada para associar a lista de genes diferencialmente expressos em cada uma das três comparações (pacientes DM2 compensados *versus* controles, pacientes DM2 descompensados *versus* controles e pacientes DM2 descompensados *versus* compensados) a termos biológicos, incluindo doenças (OMIM_DISEASE), categorias funcionais (COG_ONTOLOGY, SP_PIR_KEYWORDS, UP_SEQ_FEATURE), termos de *Gene Ontology* (GOTERM_BP_FAT, GOTERM_CC_FAT, GOTERM_MF_FAT) vias (BBID, BIOCARTA, KEGG_PATHWAY) e domínios proteicos (INTERPRO, PIR_SUPERFAMILY, SMART). Um valor de p é gerado para cada termo associado à lista inicial (genes diferencialmente expressos), sendo que os processos biológicos selecionados apresentaram p -corrigido (Benjamini-Hochberg) $< 0,05$.

4.5. Priorização gênica (RNAm)

A ferramenta Endeavour foi desenvolvida com o intuito de realizar a comparação e integração de todas as informações sobre genes disponíveis em inúmeros bancos de dados para ranquear uma lista de genes de interesse (genes testes) de acordo com a sua similaridade com genes conhecidos (genes de treinamento) (Tranchevent et al., 2008). Deste modo, é possível que associações previamente ainda não descritas entre um grupo de genes de interesse e certos processos biológicos (bem como as associações já descritas) sejam identificadas por meio, por exemplo, de interações entre as proteínas codificadas pelos genes de interesse com proteínas envolvidas no processo biológico em questão, ou mesmo pela co-regulação dos genes que codificam tais proteínas.

O conceito da priorização gênica pela ferramenta Endeavour encontra-se ilustrado na **Figura 3**. No passo 1, informações sobre uma doença ou via são obtidas através de uma busca em vários bancos de dados heterogêneos utilizando um grupo de genes conhecidos (treinamento) relacionados à doença ou via em questão. Os bancos de dados utilizados para a busca de informações sobre o grupo

de genes de treinamento incluem: A, literatura (resumos em *EntrezGene*); B, anotação funcional (*Gene Ontology*); C, expressão de microarranjos (*Atlas gene expression*); D, EST (dados sobre EST de Ensembl); E, domínios proteicos (InterPro); F, interações proteína-proteína (*Biomolecular Interaction Network Database*, BIND); G, membros de vias (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*, KEGG); H, módulos cis-regulatórios (TOUCAN); I, motivos transcricionais (TRANSFAC); J, similaridade de sequência (BLAST); K, bancos de dados adicionais, que podem ser adicionados (por exemplo, probabilidades de doenças). No passo 2, um grupo de genes de interesse (teste) é importado à ferramenta e esse grupo é então ranqueado de acordo com a sua similaridade com as informações obtidas para os genes de treinamento (passo 1), dando origem a um ranqueamento para cada um dos bancos de dados utilizados. Dados baseados em vetores são pontuados pela correlação de Pearson entre o perfil do grupo teste e a média do grupo de treinamento, já os dados baseados nas características são pontuados pela análise omnibus Fisher aplicada em características super-representadas do grupo de treinamento. No passo 3, Endeavour faz a fusão de cada um desses ranqueamentos obtidos para cada banco de dados em um único ranqueamento, deste modo, uma priorização total para cada gene teste é realizada. A idéia do algoritmo de fusão de dados é usar vários bancos de dados distintos e combiná-los de modo que essa combinação seja mais robusta do que qualquer um dos bancos de dados individuais.

No presente estudo, os genes de treinamento foram importados para a ferramenta automaticamente baseando-se nos termos de *Gene Ontology* “reparo do DNA” (GO:0006281) e “resposta ao estresse oxidativo” (GO:0006979). Já os genes de interesse foram compostos pelos genes diferencialmente expressos obtidos para cada uma das três comparações (pacientes DM2 compensados *versus* controles, pacientes DM2 descompensados *versus* controles, pacientes DM2 descompensados *versus* compensados).

Figura 3: Conceito da priorização gênica pela ferramenta Endeavour (Tranchevent et al., 2008).

4.6. Análise de Grupos Gênicos (GSA, do inglês Gene Set Analysis) e Análise de Enriquecimento de Grupos Gênicos (GSEA, do inglês Gene Set Enrichment Analysis) (RNAm)

A ferramenta de comparação de grupos gênicos analisa grupos pré-definidos na procura de uma expressão diferencial entre classes pré-definidas. Muitas vezes

um determinado gene pode não apresentar uma expressão diferencial entre dois grupos. No entanto, a análise de um grupo de genes de uma mesma classe (como por exemplo, "reparo de DNA") pode significar que a mesma está diferencialmente expressa, mesmo que os genes individualmente não sejam indicados como diferencialmente expressos (**Figura 4**).

Figura 4: Esquema comparando o método tradicional de análise de genes diferencialmente expressos (**A**) e o método de análise de grupos gênicos (**B**). Enquanto que no primeiro caso alguns genes podem individualmente apresentar uma expressão diferencial, no segundo caso, a análise por classes pré-definidas pode detectar funções diferencialmente expressas e/ou diferencialmente enriquecidas, sendo que nem todos os genes pertencentes a essas funções necessariamente se mostrem diferencialmente expressos, informação que seria perdida no primeiro caso.

A análise de grupos gênicos foi realizada de forma pareada (pacientes DM2 compensados *versus* controles, pacientes DM2 descompensados *versus* controles e pacientes DM2 descompensados *versus* compensados) utilizando o *BRB-ArrayTools* (desenvolvido por: Richard Simon e *BRB-ArrayTools Development Team*) para identificar tanto grupos gênicos com expressão significativa (GSA) quanto grupos gênicos significativamente enriquecidos (GSEA), os quais foram selecionados a partir de termos de *Gene Ontology*. As listas de genes normalizadas

pelo método quantile e ajustadas pelo método de Bayes empírico foram utilizadas nesta análise. Os testes de permutação LS/KS e *Efron–Tibshirani's GSA maxmean* foram realizados, sendo considerado o *threshold* de 0,005 para filtrar os grupos gênicos significativamente enriquecidos e estatisticamente significativos, respectivamente. Para o teste *Efron–Tibshirani's GSA maxmean* foram utilizadas 1000 permutações.

4.7. Predição de Interações microRNA-RNA_m

Para verificar interações entre microRNAs diferencialmente expressos e RNA_m diferencialmente expressos considerados de interesse (de acordo com a combinação dos resultados apontados pela análise estatística e pela ferramenta Endeavour), os últimos foram submetidos à ferramenta miRWalk (Dweep et al., 2011), a qual possibilita fazer a intersecção dos resultados obtidos por outros oito programas de predição de interações microRNA-RNA_m (além do próprio miRWalk): Diana-microT (versão 3.0), miRanda (Agosto 2010 release), miRDP (Abril 2009 release), PICTAR (Março 2007 release), PITA (Agosto 2008 release), RNA22 (Maio 2008 release), RNAhybrid (versão 2.1), Targetscan (versão 5.1). Foram consideradas as interações preditas (sítios de ligação de microRNAs nas regiões 3'UTR dos RNA_m) por no mínimo cinco programas. Em seguida, os microRNAs obtidos pela ferramenta miRWalk foram comparados aos microRNAs diferencialmente expressos obtidos em cada uma das três comparações (pacientes DM2 compensados *versus* controles, pacientes DM2 descompensados *versus* controles, pacientes DM2 descompensados *versus* compensados), através da ferramenta VENNY (Oliveros, 2007).

Além disso, também fazendo uso da ferramenta VENNY (Oliveros, 2007), os microRNAs diferencialmente expressos em cada uma das três comparações realizadas foram contrastados a microRNAs previamente associados ao DM2, visando identificar no presente estudo novos microRNAs relacionados à doença. Finalmente, a mesma ferramenta também foi utilizada para contrastar a lista de microRNAs diferencialmente expressos em pacientes DM2 descompensados *versus* compensados com microRNAs previamente associados a níveis elevados de

glicose, com o intuito de identificar novos microRNAs relacionados à condição hiperglicêmica.

RESULTADOS

5. RESULTADOS

5.1. Caracterização das Amostras de Pacientes DM2 e Controles Estudados

Foram realizadas comparações entre todos os grupos de pacientes (DM2-C e DM2-D) e controles, com relação à idade, níveis glicêmicos e porcentagem de hemoglobina glicada.

Entre todos os grupos estudados, não houve diferenças significativas ($p > 0,05$) com relação à idade. No que diz respeito aos parâmetros restantes, o grupo de pacientes DM2-D apresentou níveis de glicose (média de 221,5 mg/dL) e de hemoglobina glicada (média de 10,1%) estatisticamente maiores ($p < 0,05$) do que os grupos de pacientes DM2-C e controle (glicemia – média de 102,7 mg/dL e 91,6 mg/dL, respectivamente e hemoglobina glicada – média de 6,7% e 5,4%, respectivamente), o que caracteriza um quadro hiperglicêmico e de controle inadequado da doença no grupo DM2-D.

5.2. Avaliação da Qualidade e Integridade das Amostras de RNA

Após a extração de RNA das PBMCs, as amostras foram avaliadas quanto à contaminação por proteína (razão 260/280) e fenol (razão 260/230), com todas as amostras apresentando razões entre 1,8 e 2,0, indicando desta forma, ausência de contaminação. Posteriormente, as amostras de RNA foram submetidas à análise de integridade por meio de gel de agarose com formaldeído, bem como por meio de eletroforese microcapilar, e todas mostraram-se íntegras. De acordo com os resultados da eletroforese microcapilar (**Figura 5 e Tabela 3**), os valores do número de integridade do RNA foram superiores a 8,0, sendo que o valor mínimo deve ser 7,0, segundo recomendações da Agilent.

Tabela 3: Integridade das amostras de RNA de todos os indivíduos estudados indicada pelos valores do número de integridade do RNA (RIN). Valores aceitáveis variam entre 7,0 e 10. Controle: indivíduos sadios não-diabéticos; DM2-C: pacientes DM2 compensados; DM2-D: pacientes DM2 descompensados.

Indivíduos	Valor de RIN	Indivíduos	Valor de RIN
Controle-1	9,5	DM2-C10	9,4
Controle-2	9,5	DM2-C11	9,2
Controle-3	9,1	DM2-C12	9,5
Controle-4	9,5	DM2-C13	9,4
Controle-5	8,9	DM2-C14	9,8
Controle-6	8,2	DM2-D1	9,2
Controle-7	8,5	DM2-D2	9,1
Controle-8	8,2	DM2-D3	9,3
Controle-9	8,1	DM2-D4	9,3
Controle-10	8,4	DM2-D5	9,4
DM2-C1	8,5	DM2-D6	9,3
DM2-C2	9,4	DM2-D7	9,5
DM2-C3	9,3	DM2-D8	8,6
DM2-C4	9,4	DM2-D9	9,2
DM2-C5	9,0	DM2-D10	8,4
DM2-C6	9,1	DM2-D11	9,0
DM2-C7	9,5	DM2-D12	9,3
DM2-C8	9,2	DM2-D13	9,3
DM2-C9	9,3

Figura 5: Eletroferogramas mostrando a integridade de algumas das amostras de RNA total extraídas de pacientes DM2. Os retângulos em vermelho destacam os valores de RIN.

5.2. Normalização e Ajuste dos Dados de Expressão (RNAm e microRNA)

As amostras de RNA íntegras foram submetidas ao método de microarranjos de RNAm e microRNA e subsequentemente os dados de expressão gênica obtidos para as lâminas hibridadas foram quantificados pelo *software Feature Extraction*. Em seguida, o *background* foi subtraído e o método quantile foi utilizado para a normalização entre todos os indivíduos estudados (10 controles, 14 pacientes DM2-C e 13 pacientes DM2-D para os dados de RNAm e nove indivíduos para cada um dos três grupos para os dados de microRNA). O método quantile tem como finalidade tornar a distribuição das intensidades de sinal das sondas comparáveis entre um grupo de microarranjos (Bolstad, 2003); deste modo, os gráficos em formato *boxplot* dos dados pré- (**Figura 6A**, RNAm; **Figura 6C**, microRNA) e pós-normalização (**Figura 6B**, RNAm; **Figura 6D**, microRNA) demonstram a aplicação

correta do método, pois as posições e comprimentos de todos os microarranjos tornaram-se semelhantes.

Após a normalização dos dados, os artefatos experimentais foram removidos pelo método Bayes empírico. Os gráficos obtidos na análise do componente principal apresentam os dados normalizados pré- (**Figura 7A**, RNAm; **Figura 8A**, microRNA) e pós- (**Figura 7B**, RNAm; **Figura 8B**, microRNA) a remoção dos artefatos experimentais. Para os dados de RNAm, antes do ajuste dos dados, foi possível observar no gráfico da análise do componente principal, a separação dos dados em grupos distintos, no entanto, após a remoção de artefatos, é possível observar uma melhor distribuição espacial dos indivíduos (**Figura 7**).

Para os dados de microRNAs, antes de aplicar o método Bayes empírico, as amostras de RNA se agruparam exatamente de acordo com a data de marcação/hibridação no gráfico da análise do componente principal. Por outro lado, após o ajuste dos dados, foi possível notar uma melhor distribuição espacial dos indivíduos. É importante notar a proximidade dos indivíduos Co2 e Co2_REF, correspondentes à mesma amostra de RNA, porém marcada e hibridada em experimentos distintos, bem como a proximidade dos indivíduos DM2_D5 e DM2_D5_REF, também correspondentes à mesma amostra de RNA marcada e hibridada em experimentos distintos (**Figura 8**).

Figura 6: *Boxplots* dos resultados obtidos nos experimentos de microarranjos de RNAm e microRNA de todos os indivíduos estudados (pacientes e controles) antes (**A** e **C**, respectivamente) e após a normalização pelo método quantile (**B** e **D**, respectivamente). A parte superior de cada retângulo vermelho representa o percentile 75, a parte inferior o percentile 25 e a linha no meio representa o percentile 50 (mediana); as extremidades das barras representam o mínimo e o máximo de todos os dados de expressão; os círculos pretos representam os valores de intensidade de sinal de sondas acima do percentile 75 ou abaixo do percentile 25; a escala corresponde aos valores de intensidade dos dados de expressão.

Figura 7: Representação gráfica dos resultados da análise do componente principal (PCA) exibindo a distribuição espacial dos indivíduos controles (alaranjado), pacientes DM2 compensados (vermelho) e pacientes DM2 descompensados (verde) referente aos dados de expressão de RNAm. Nesta análise foram considerados os dados normalizados (A) e os dados normalizados e ajustados para a remoção de artefatos experimentais (B).

Figura 8: Representação gráfica dos resultados da análise do componente principal (PCA) exibindo a distribuição espacial dos indivíduos controles (alaranjado), pacientes DM2 compensados (vermelho) e pacientes DM2 descompensados (verde) referente aos dados de expressão de microRNAs. Nesta análise foram considerados os dados normalizados (A) e os dados normalizados e ajustados para a remoção de artefatos experimentais (B).

5.3. Análise Estatística Rank Products, Priorização Gênica e Análise de Enriquecimento Funcional

Os dados normalizados e ajustados foram submetidos à análise estatística *rank products* de forma pareada, sendo identificados um total de 415 genes diferencialmente expressos (167 reprimidos e 248 induzidos) no grupo DM2-C relativamente aos controlos, 285 no grupo DM2-D em comparação aos controlos (65 reprimidos e 220 induzidos) e, finalmente, 478 em pacientes DM2-D comparados aos DM2-C (261 reprimidos e 217 induzidos). As tabelas contendo os genes com expressão estatisticamente significativa, bem como os valores de *fold change*, valores de p e predição de dados falso-positivos, encontram-se em anexo (**Anexo C**, **Anexo D** e **Anexo E**, respectivamente).

Visto que além de associações já descritas por outros autores, existe também a possibilidade de que associações previamente não descritas entre uma lista de genes de interesse e certos processos biológicos sejam identificadas, por exemplo, por meio de interações entre as proteínas codificadas pelos genes de interesse e proteínas envolvidas no processo biológico em questão, ou mesmo pela co-regulação dos genes que codificam tais proteínas, as três listas de genes diferencialmente expressos foram submetidas à ferramenta Endeavour. Com a utilização da última foi possível realizar a integração de todas as informações disponíveis em vários bancos de dados sobre os genes pertencentes aos termos de *Gene Ontology* “reparo do DNA” (GO:0006281) e “resposta ao estresse oxidativo” (GO:0006979), seguido do ranqueamento dos genes diferencialmente expressos baseado em sua similaridade com os genes das duas GOs de interesse. A **Tabela 4** exhibe os 16 genes melhor ranqueados em cada uma das comparações realizadas.

Subsequentemente, os resultados provenientes da análise estatística e aqueles obtidos por meio da ferramenta Endeavour foram combinados com o objetivo de selecionar os genes mais interessantes a serem discutidos, sendo que os mesmos encontram-se na **Tabela 5**.

Tabela 4: Listas de genes diferencialmente expressos melhor ranqueados pela ferramenta Endeavour, com relação aos processos biológicos “reparo do DNA” e “resposta ao estresse oxidativo”.

Ranqueamento	Reparo do DNA			Resposta ao Estresse Oxidativo		
	DM2-C versus Controle	DM2-D versus Controle	DM2-D versus DM2-C	DM2-C versus Controle	DM2-D versus Controle	DM2-D versus DM2-C
1	<i>FANCC</i>	<i>FANCC</i>	<i>TP53</i>	<i>KRT1</i>	<i>KRT1</i>	<i>KRT1</i>
2	<i>DDX17</i>	<i>PARP4</i>	<i>NHEJ1 SLC23A3</i>	<i>UCP3</i>	<i>UCP3</i>	<i>DUSP1</i>
3	<i>PARP4</i>	<i>SF3A1</i>	<i>TEP1</i>	<i>PTGS2</i>	<i>GFAP</i>	<i>TP53</i>
4	<i>SF3A1</i>	<i>KLF6</i>	<i>ATF3</i>	<i>GFAP</i>	<i>LTF</i>	<i>PTGS2</i>
5	<i>KLF6</i>	<i>NHEJ1 SLC23A3</i>	<i>PLK4</i>	<i>CCL2</i>	<i>SCRT2 SRXN1</i>	<i>FN1</i>
6	<i>NHEJ1 SLC23A3</i>	<i>SET</i>	<i>HIP1</i>	<i>SCRT2 SRXN1</i>	<i>FGFR1</i>	<i>GFAP</i>
7	<i>CDC14A</i>	<i>HNRPA1</i>	<i>PAX3</i>	<i>CCL3</i>	<i>HP</i>	<i>CCL2</i>
8	<i>SET</i>	<i>DUT</i>	<i>FN1</i>	<i>CDC14A</i>	<i>MYOM2</i>	<i>ANK1</i>
9	<i>DUT</i>	<i>NFE2L1</i>	<i>DUSP1</i>	<i>KRAS</i>	<i>KLF6</i>	<i>KRAS</i>
10	<i>NFE2L1</i>	<i>RPN1</i>	<i>DDX3Y</i>	<i>MYOM2</i>	<i>DUT</i>	<i>LTF</i>
11	<i>RPN1</i>	<i>FGFR1</i>	<i>EGR2</i>	<i>LTF</i>	<i>MARS</i>	<i>CCL3</i>
12	<i>RPL24</i>	<i>RPL24</i>	<i>FOXC1</i>	<i>ANK1</i>	<i>FANCC</i>	<i>MYOM2</i>
13	<i>FGFR1</i>	<i>MARS</i>	<i>KRAS</i>	<i>FGFR1</i>	<i>DHFR</i>	<i>PCK1</i>
14	<i>EGR2</i>	<i>SEC31A</i>	<i>NOL4</i>	<i>KLF6</i>	<i>CCL3L3</i>	<i>HP</i>
15	<i>ERG</i>	<i>FOXC1</i>	<i>GHR</i>	<i>FANCC</i>	<i>NFE2L1</i>	<i>DSP</i>
16	<i>SEC31A</i>	<i>MSX1</i>	<i>REST</i>	<i>IGFBP5</i>	<i>ALAS2</i>	<i>TSHR</i>

Tabela 5: Genes de interesse selecionados por meio dos resultados da análise estatística *rank products* e da ferramenta Endeavour.

Símbolo do	Nome do Gene	Compensado versus Controle	Descompensado versus Controle	Descompensado versus Compensado
		<i>Fold Change</i>	<i>Fold Change</i>	<i>Fold Change</i>
<i>UCP3</i>	<i>uncoupling protein 3 (mitochondrial,</i>	-1,53	-1,54	-
<i>KLF6</i>	<i>Kruppel-like factor 6</i>	1,83	1,60	-
<i>G0S2</i>	<i>G0/G1switch 2</i>	1,85	-	-1,73

Além disso, todos os genes com expressão diferenciada em cada uma das três comparações foram submetidos à ferramenta de anotação DAVID com o intuito de obter termos biológicos (incluindo doenças, categorias funcionais, termos de *Gene Ontology*, vias e domínios proteicos) enriquecidos com genes diferencialmente expressos. Foram encontrados 22 e 56 termos biológicos enriquecidos (p-corrigido Benjamini-Hochberg < 0,05) para as comparações DM2-C *versus* indivíduos saudáveis e pacientes DM2-D *versus* DM2-C, respectivamente. Em ambas as comparações, um processo biológico foi considerado de interesse para o presente trabalho: resposta inflamatória (GO:0006954; p = 5,0 E-02 e p = 4,1 E-03, respectivamente). Os genes pertencentes ao processo biológico selecionado, bem como os valores de *fold change*, valores de p e predição de dados falso-positivos (PFP) para ambas as comparações encontram-se descritos na **Tabela 6**. Foram apontados cinco termos biológicos enriquecidos (p-corrigido Benjamini-Hochberg < 0,05) em pacientes DM2-D *versus* indivíduos saudáveis, porém, nenhum deles se mostrou interessante para o presente estudo. As listas de todos os termos biológicos enriquecidos apontados para cada uma das três comparações realizadas encontram-se em Anexo (**Anexo F**, **Anexo G** e **Anexo H**, respectivamente).

Tabela 6: Genes diferencialmente expressos enriquecidos no processo biológico “resposta inflamatória”.

Símbolo	Nome do gene	Compensado versus Controle	Descompensado versus Compensado
		<i>Fold Change</i>	<i>Fold Change</i>
C1QB	complement component 1, q subcomponent, B chain	-	-1,30
CCL2	chemokine (C-C motif) ligand 2	1,29	-1,12
CCL3	chemokine (C-C motif) ligand 3	1,34	-1,21
CCL3L3	chemokine (C-C motif) ligand 3-like 3; chemokine (C-C motif)	1,38	-1,13
CXCL1	chemokine (C-X-C motif) ligand 1 (melanoma growth stimulating	1,55	-1,35
CXCL2	chemokine (C-X-C motif) ligand 2	1,69	-1,51
CXCL3	chemokine (C-X-C motif) ligand 3	1,38	-1,52
FN1	fibronectin 1	-	-1,34
ICEBER	caspase recruitment domain family, member 18	-	-1,34
IL1A	interleukin 1, alpha	-	-1,38
IL1B	interleukin 1, beta	-	-1,25
IL27	interleukin 27	1,45	1,21
IL8	interleukin 8	1,73	-1,47
KRT1	keratin 1	-1,15	1,29
MASP1	mannan-binding lectin serine peptidase 1 (C4/C2 activating	1,19	-1,29
PDPN	podoplanin	-	-1,35
PLA2G4	phospholipase A2, group IVC (cytosolic, calcium-independent)	-	1,15
SELE	selectin E	-1,41	1,37
SPP1	secreted phosphoprotein 1	1,42	-1,54
CD46	CD46 molecule, complement regulatory protein	1,51	-
NFE2L1	nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 1	2,20	-
PARP4	poly (ADP-ribose) polymerase family, member 4	1,49	-
PTX3	pentraxin-related gene, rapidly induced by IL-1 beta	1,33	-

5.4. GSA e GSEA

Alguns genes podem apresentar expressão não significativa entre os grupos comparados, mas em conjunto, podem contribuir para que uma determinada via seja diferencialmente expressa, bem como enriquecida. Portanto, duas análises foram realizadas: análise de grupos gênicos (GSA) e análise de enriquecimento de grupos gênicos (GSEA) por meio do *BRB-ArrayTools*.

Para todas as comparações foram investigados um total de 5.131 grupos gênicos (termos de *Gene Ontology*). Em relação aos pacientes DM2-C *versus* controles foram identificados 81 grupos gênicos significativamente enriquecidos pelos testes permutativos LS/KS ($p < 0,005$) e 29 grupos significativos pelo teste GSA Efron-Tibshirani ($p < 0,005$), porém, não foi selecionado nenhum processo para discussão.

Para a comparação de pacientes DM2-D *versus* controles foram encontrados 181 grupos gênicos estatisticamente enriquecidos por meio dos testes permutativos LS/KS ($p < 0,005$) e 116 grupos significativos através do teste GSA Efron-Tibshirani ($p < 0,005$), sendo selecionados os seguintes processos biológicos para discussão: “resposta ao estresse do retículo endoplasmático” (GO:0034976), encontrado significativamente enriquecido (p de LS = 0,00003, p de KS = 0,00146) e estatisticamente reprimido ($p = 0,001$) em DM2-D e “resposta ao superóxido” (GO:0000303), encontrado significativamente reprimido ($p = 0,004$) nos pacientes DM2-D (**Figura 9A e B**, respectivamente).

No que diz respeito aos pacientes DM2-D *versus* DM2-C, 105 grupos de genes foram apontados como significativamente enriquecidos pelos testes permutativos LS/KS ($p < 0,005$) e 56 grupos foram encontrados significativos ($p < 0,005$) em DM2-D pelo teste GSA Efron-Tibshirani. Dentre esses grupos gênicos, um foi selecionado para discussão: “regulação do reparo do DNA” (GO:0006282), encontrado significativamente induzido nos pacientes DM2-D (**Figura 9C**).

Todos os grupos gênicos significativos apontados em cada uma das três comparações encontram-se em anexo (ANEXO I, ANEXO J e ANEXO L, respectivamente).

Figura 9: Agrupamento hierárquico dos três grupos gênicos de interesse estatisticamente significativos obtidos pela ferramenta *BRB-ArrayTools*: resposta ao estresse do retículo endoplasmático (A), resposta ao superóxido (B) e regulação do reparo do DNA (C).

5.5. Análise Estatística Rank Products e Predição de Interações RNAm-microRNA

Os dados normalizados e ajustados foram submetidos à análise estatística *rank products* de forma pareada. Foram apontados um total de 97 microRNAs diferencialmente expressos (39 reprimidos e 58 induzidos) em pacientes DM2-C relativamente aos controles, 54 em pacientes DM2-D comparados aos controles (28 reprimidos e 26 induzidos) e finalmente, 101 em pacientes DM2-D em relação aos DM2-C (59 reprimidos e 42 induzidos). As tabelas contendo os genes com expressão estatisticamente significativa, bem como os valores de *fold change*, valores de p e predição de dados falso-positivos, encontram-se em anexo (**Anexo I**, **Anexo J** e **Anexo L**, respectivamente).

Ainda, com o objetivo de identificar interações entre microRNAs diferencialmente expressos e genes diferencialmente expressos considerados de interesse (de acordo com a combinação dos resultados apontados pela análise estatística e pela ferramenta Endeavour, **Tabela 5**), após obter a lista dos microRNAs cujos possíveis alvos são esses genes selecionados (ferramenta miRWalk), esses microRNAs foram comparados às listas correspondentes (três comparações realizadas) de microRNAs com expressão significativa. Em relação à comparação pacientes DM2-C *versus* controles, foram observadas interações entre microRNAs e os três genes de interesse (*G0S2*, *KLF6* e *UCP3*), todos diferencialmente expressos, havendo regulação inversa entre microRNAs e os dois últimos gene-alvo (**Tabela 7**). Para a comparação pacientes DM2-D *versus* controles, os resultados apontaram interações entre microRNAs e os dois genes de interesse (*KLF6* e *UCP3*), todos diferencialmente expressos, sendo observada regulação inversa entre microRNAs e todos os genes-alvos (**Tabela 8**). No que diz respeito à comparação entre os dois grupos de pacientes, foi possível notar interações entre o gene de interesse (*G0S2*) e microRNAs, todos com expressão significativa, porém, não foi apontado nenhum microRNA com regulação inversa à apresentada pelo gene em questão (**Tabela 9**).

Tabela 7: Interações entre microRNAs e genes diferencialmente expressos em pacientes DM2 compensados relativamente aos indivíduos saudáveis não-diabéticos (microRNAs em negrito apresentam regulação inversa à apresentada pelos genes-alvos correspondentes).

Compensado versus Controle			
Gene	Fold Change	microRNA	Fold Change
G0S2	1,85	hsa-miR-15a	1,31
		hsa-miR-424	1,49
KLF6	1,83	hsa-miR-18a	-1,34
		hsa-let-7a	-1,28
		hsa-let-7f	-1,34
		hsa-miR-130a	-1,47
		hsa-miR-133b	-1,36
		hsa-miR-136	1,23
		hsa-miR-142-5p	1,34
		hsa-miR-148b	-1,36
		hsa-miR-150	1,29
		hsa-miR-17	-1,34
UCP3	-1,53	hsa-miR-18a	-1,34
		hsa-miR-223	-1,29
		hsa-miR-29a	1,31
		hsa-miR-29b	1,59
		hsa-miR-29c	1,31
		hsa-miR-30b	1,32
		hsa-miR-30e	1,34
		hsa-miR-548c-3p	1,72

Tabela 8: Interações entre microRNAs e genes diferencialmente expressos em pacientes com DM2 descompensados relativamente aos indivíduos sadios não-diabéticos (microRNAs em negrito apresentam regulação inversa à apresentada pelos genes-alvos correspondentes).

Descompensado versus Controle			
Gene	Fold Change	microRNA	Fold Change
KLF6	1,60	hsa-miR-181a	1,31
		hsa-miR-18a	-1,36
UCP3	-1,54	hsa-let-7e	-1,32
		hsa-miR-130a	-1,50
		hsa-miR-142-5p	1,40
		hsa-miR-150	1,37
		hsa-miR-17	-1,34
		hsa-miR-18a	-1,36
		hsa-miR-223	-1,42
		hsa-miR-29a	1,40
		hsa-miR-29b	1,40
		hsa-miR-29c	1,43
		hsa-miR-30e	1,42
		hsa-miR-361-3p	1,39
		hsa-miR-548c-3p	1,25

Tabela 9: Interações entre microRNAs e genes diferencialmente expressos em pacientes com DM2 descompensados relativamente aos compensados (microRNAs em negrito apresentam regulação inversa à apresentada pelos genes-alvos correspondentes).

Descompensado versus Compensado			
Gene	<i>Fold Change</i>	microRNA	<i>Fold Change</i>
G0S2	-1,73	hsa-miR-377	-1,38
		hsa-miR-424	-1,41

Adicionalmente, foi realizada uma comparação, por meio da ferramenta VENNY, entre a lista dos 101 microRNAs diferencialmente expressos em pacientes DM2-D *versus* DM2-C e a lista de 24 microRNAs relacionados à níveis elevados de glicose previamente descritos por outros autores (Li et al., 2009; Du et al., 2010; Fred et al., 2010; Dey et al., 2011; Togliatto et al., 2011; Kim et al., 2012; Li et al., 2012; Mocharla et al., 2013; Spinetti et al., 2013) e os resultados apontaram sete microRNAs (**Tabela 10**) compartilhados entre as duas listas. Portanto, dentre os 101 microRNAs diferencialmente expressos em pacientes hiperglicêmicos, a associação com a hiperglicemia foi anteriormente relatada para sete desses microRNAs.

Tabela 10: microRNAs diferencialmente expressos associados à hiperglicemia.

Descompensado versus Compensado	
microRNAs	<i>Fold Change</i>
hsa-miR-1	-1,28
hsa-miR-21	-1,39
hsa-miR-221	-1,38
hsa-miR-296-5p	1,38
hsa-miR-29b	-1,39
hsa-miR-362-3p	-1,38
hsa-miR-923	1,04

Além disso, as listas dos microRNAs diferencialmente expressos nas três comparações realizadas foram contrastadas à lista de 100 microRNAs relacionados ao DM2 previamente descritos por outros autores. Resultados demonstraram 25 microRNAs já relatados na literatura e com expressão significativa em pacientes DM2-C *versus* controles, 21 em DM2-D *versus* controles e 16 em DM2-D *versus* DM2-C. Interessantemente, dentre esses microRNAs, foi possível observar 19 compartilhados entre as comparações dos dois grupos de pacientes (DM2-C e DM2-D) relativamente aos controles (**Tabela 11**).

Tabela 11: microRNAs diferencialmente expressos associados ao DM2.

	Compensado <i>versus</i> Controle	Descompensado <i>versus</i> Controle	Descompensado <i>versus</i> Compensado
microRNAs	<i>Fold Change</i>	<i>Fold Change</i>	<i>Fold Change</i>
hsa-miR-126	-1,46	-1,58	-
hsa-miR-126*	-1,24	-1,43	-1,42
hsa-miR-142-3p	1,56	1,36	-1,39
hsa-miR-142-5p	1,34	1,40	-
hsa-miR-144	-1,17	1,16	1,24
hsa-miR-146a	1,29	1,29	-
hsa-miR-146b-5p	1,30	-	-1,34
hsa-miR-150	1,29	1,37	1,43
hsa-miR-155	1,34	1,33	-
hsa-miR-15a	1,31	-	-
hsa-miR-185	-1,33	-1,38	-
hsa-miR-199a-3p	-1,42	-1,74	-1,31
hsa-miR-199b-5p	1,32	-	-
hsa-miR-21	1,27	-	-1,39
hsa-miR-223	-1,28	-1,42	-1,34
hsa-miR-25	1,20	-	-
hsa-miR-27b	-1,39	-1,39	-
hsa-miR-29a	1,31	1,39	-
hsa-miR-29b	1,59	1,40	-1,39
hsa-miR-30e	1,34	1,41	-

hsa-miR-342-3p	1,29	1,39	-
hsa-miR-424	1,48	1,41	-1,40
hsa-miR-451	-1,95	-1,37	1,39
hsa-miR-486-5p	-1,43	-	-
hsa-miR-923	1,47	1,56	1,04
hsa-let-7e	-	-1,32	-
hsa-miR-374b	-	-1,52	-
hsa-miR-20b	-	-	-1,40
hsa-miR-362-3p	-	-	-1,38
hsa-miR-519d	-	-	1,37
hsa-miR-98	-	-	-1,35

DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

O Diabetes Mellitus é uma doença caracterizada principalmente pela incapacidade de controle dos níveis de glicose no sangue e também pela maior produção de radicais livres (Lodovici et al., 2009). No DM2, um dos principais responsáveis pelos altos níveis glicêmicos é a resistência insulínica, causada principalmente por fatores ligados a obesidade, como maior concentração de ácidos graxos e as respostas inflamatórias desencadeadas pelo tecido adiposo (Nielsen et al., 2012; Crunkhorn, 2013).

A hiperglicemia desencadeia um aumento na produção de agentes oxidantes, além de prejudicar a defesa antioxidante, podendo levar a um quadro de estresse oxidativo. Esse efeito ocorre através de múltiplas vias, como a glicação de proteínas e também a auto-oxidação da glicose (West, 2000; Lodovici et al., 2009). O estresse oxidativo pode ser umas das principais causas de complicações que ocorrem de maneira crônica em pacientes com Diabetes, como a nefropatia, a retinopatia e a neuropatia (Rolo e Palmeira, 2006). Por isso, um bom controle glicêmico em pacientes com DM é de grande importância para melhores perspectivas a longo prazo, principalmente com relação a complicações da doença (Choi et al., 2005; Lodovici et al., 2009). Apesar de o controle glicêmico ser importante, pacientes com DM podem desenvolver múltiplas complicações que podem surgir e progredir de maneira diferente, mesmo que consigam manter os níveis de glicemia próximos ao nível normal (Choi et al., 2005).

No presente trabalho, foi proposta uma comparação entre pacientes DM2 compensados com pacientes DM2 descompensados, buscando identificar genes, processos biológicos e também microRNAs que possam estar diferencialmente expressos entre os dois grupos, na expectativa de detectar genes ou processos relacionados ao controle da doença e ao elevado nível glicêmico. Da mesma forma, a comparação dos dois grupos acima citados com um grupo de indivíduos saudáveis, poderá apontar, por sua vez, genes, processos biológicos e também microRNAs que sejam relacionados com o DM2 e não necessariamente com o estado de hiperglicemia dos pacientes.

Os dados normalizados e ajustados foram submetidos à análise estatística *rank products* de forma pareada, sendo identificados 415 genes diferencialmente expressos (167 reprimidos e 248 induzidos) no grupo DM2-C relativamente aos controles, 285 no grupo DM2-D em comparação aos controles (65 reprimidos e 220 induzidos) e 478 em pacientes DM2-D comparados aos DM2-C (261 reprimidos e 217 induzidos). Entre os genes diferencialmente expressos foram selecionados alguns de interesse, levando em conta não só a sua modulação, mas também aqueles cuja função esteja relacionada com processos de reparo do DNA e resposta ao estresse oxidativo.

Um desses genes é o *UCP3*, que apresentou um *fold change* de -1,54 e -1,53 nas comparações DM2-C vs Controle e DM2-D vs Controle, respectivamente. O gene *UCP3* codifica uma proteína da família das UCPs que se localiza na membrana interna da mitocôndria e participam indiretamente da cadeia de transporte de elétrons (Fisler e Warden, 2006). Essa proteína é capaz de reduzir a eficiência metabólica da mitocôndria promovendo a translocação de prótons do espaço intermembranas até a matrix mitocondrial, dissipando parte da energia potencial utilizada para a produção de ATP (Azzu e Brand, 2010). Diminuindo a eficiência metabólica, a *UCP3* também leva à redução da produção de ROS na mitocôndria. Esse gene tem sido relacionado com obesidade e também com DM2, já que uma mutação reduzindo sua atividade ou expressão da proteína pode teoricamente reduzir o gasto de energia por parte da mitocôndria, contribuindo para o desenvolvimento da obesidade e consequentemente, da DM2 (Fisler e Warden, 2006).

A repressão do gene *UCP3* tanto no grupo DM2-C quanto DM2-D comparados ao grupo Controle indica que a proteína codificada pelo mesmo não é produzida em níveis normais, contribuindo com o aumento do estresse oxidativo. No entanto, essa expressão parece não depender dos níveis glicêmicos, já que o grupo DM2-D e DM2-C apresentaram uma modulação semelhante.

Na predição pelo programa MIRwalk, o gene *UCP3* parece ser alvo de uma série de microRNAs. Apesar de estudos demonstrarem que em animais a interação de microRNAs com mRNAs na maioria das vezes impede a tradução do transcrito em proteína, tendo dessa forma, pouca ou nenhuma influência nos níveis de mRNA (Li et al., 2009), outros estudos demonstraram que menores níveis de mRNA representam grande parte da diminuição da produção proteica (alcançando até 84%

dessa diminuição) (Hendrickson et al., 2009; Guo et al., 2010). Dessa forma, esses estudos demonstram que mudanças nos níveis de mRNA refletem o impacto dos microRNAs na expressão gênica, sugerindo que a desestabilização de mRNAs alvo é a razão predominante para uma menor tradução proteica (Hendrickson et al., 2009; Guo et al., 2010). Assim, no presente trabalho, buscamos uma correlação inversa entre a modulação da expressão de mRNA e a de microRNA.

Baseando-se no exposto acima, é possível buscar dentre os microRNAs preditos como reguladores da expressão de *UCP3*, aqueles que apresentaram regulação inversa e que poderiam estar influenciando nos níveis do transcrito. Na comparação DM2-C vs Controle, os seguintes microRNAs apresentaram regulação inversa: hsa-miR-136, hsa-miR-142-5p, hsa-miR-30b, hsa-miR-30e, hsa-miR-150, hsa-miR-548c-3p, hsa-miR-29a, hsa-miR-29c, hsa-miR-29b; enquanto que na comparação DM2-D vs Controle: hsa-miR-142-5p, hsa-miR-30e, hsa-miR-361-3p, hsa-miR-150, hsa-miR-548c-3p, hsa-miR-29a, hsa-miR-29c, hsa-miR-29b. Entre estes, os microRNAs hsa-miR-29a/b/c podem ser destacados. Segundo He et al (2007), em experimentos realizados com camundongos, esses microRNAs participam da via de sinalização de insulina, aumentando a resistência insulínica através do silenciamento dos componentes da via de sinalização de insulina. Apesar dos autores relacionarem a indução da expressão de miR-29 com a hiperglicemia, este microRNA foi induzido em ambos os grupos, DM2-C e DM2-D. ou seja, em humanos, o miR-29 pode ser regulado por outros fatores. Além disso, ao regular a expressão do gene *UCP3*, o miR-29 pode também induzir um aumento na produção de ROS.

O gene *KLF6*, diferentemente de *UCP3*, apresentou-se induzido tanto no grupo DM2-C (*fold change* de 1,83) quanto DM2-D (*fold change* 1,6) quando comparados ao grupo controle. Esse gene codifica uma proteína DNA-ligante que tem papel fundamental na regulação da proliferação celular, diferenciação e desenvolvimento (Narla et al., 2005; Yea et al., 2008). No entanto, esse gene também está relacionado à resposta inflamatória, principalmente aquela desencadeada nos rins, promovendo o desenvolvimento da nefropatia diabética (Narla et al., 2005). A indução de Inflamação tem sido apontada como um fator importante no desenvolvimento e progressão da nefropatia (Tuttle, 2005). Altos níveis de glicose induzem a superexpressão de *KLF6* que por sua vez também aumenta os níveis de MIP-3 α (*Macrophage inflammatory protein-3 alpha*),

desencadeando o processo inflamatório que levará ao desenvolvimento da nefropatia (Tesch, 2008).

A análise de predição revelou que o microRNA hsa-miR-18a pode regular o gene *KLF6*. A indução desse microRNA tem sido relacionado a diversos tipos de câncer, como o pancreático e também o câncer de bexiga (Morimura et al., 2011; Tao et al., 2012). Além disso, segundo Wu et al (2013), esse microRNA é capaz de reprimir a expressão do gene *ATM*, cuja ativação representa um importante evento no reparo de DNA e resposta a quebras duplas no DNA.

O gene *G0S2* apresentou uma indução no grupo DM2-C, independentemente se comparado com o grupo controle (*fold change* 1,85) ou o grupo DM2-D (*fold change* -1,73). A proteína codificada por esse gene controla a lipólise e a liberação de ácidos graxos no sangue, já que maiores níveis de expressão de *G0S2* inibem a ação da ATGL (*Adipode Triglyceride lipase*), a qual é responsável por hidrolisar triglicérides em ácidos graxos e glicerol (Yang et al., 2010; Nielsen et al., 2012). Em pacientes DM2, menores níveis dessa proteína desencadeariam maiores níveis de ácidos graxos no sangue, um dos principais fatores responsáveis por aumentar a resistência insulínica (Boden, 2011).

O *G0S2* foi um dos genes que se mostrou diferencialmente expresso entre os dois grupos de pacientes DM2. Enquanto os pacientes DM2 descompensados e o grupo controle apresentaram níveis semelhantes de expressão desse gene, o grupo de pacientes DM2 compensados apresentou uma indução quando comparado aos outros dois grupos. Níveis maiores de expressão desse transcrito podem provavelmente diminuir os níveis de ácidos graxos nesses pacientes. Essa indução pode ter sido resultado do tratamento recebido pelos indivíduos DM2 visando diminuir os níveis de ácidos graxos no sangue. Assim, deve ser também considerada a influência do tratamento no sentido de alterar a expressão gênica relativamente aos indivíduos normais.

Nesse caso, a ferramenta de predição de alvos de microRNAs apontou o microRNA hsa-miR-377 como potencial regulador da expressão do gene *G0S2*. Wang et al (Wang et al., 2008) sugeriu que a superexpressão desse microRNA se relaciona ao desenvolvimento de nefropatia, já que aumenta a sensibilidade celular ao estresse oxidativo. Em uma provável interação com o gene *G0S2*, o hsa-miR-377 poderia estimular uma maior liberação de ácidos graxos, também contribuindo com o aumento da resistência insulínica.

Após a análise estatística comparando os grupos Controle, DM2-C e DM-D, as listas de genes diferencialmente expressos obtidas foram submetidas à análise de enriquecimento funcional utilizando a ferramenta David, que revelou uma série de processos enriquecidos. Dentre eles, o processo de resposta inflamatória (GO:0006954) mostrou-se interessante para a discussão. Esse processo foi significativamente enriquecido nas comparações DM2-C vs. Controle e DM2-D vs. DM2-C.

Nos últimos anos, o desenvolvimento da resistência insulínica, fator característico do DM2, tem sido relacionado a processos inflamatórios, razão pela qual o DM2 seja tratado como uma doença inflamatória (Donath e Shoelson, 2011). Embora muitos outros fatores certamente contribuam para o desenvolvimento dessa doença, existem evidências de que a inflamação seja responsável não só pela patogênese do DM2, mas também pela sua progressão (Hotamisligil e Erbay, 2008; Donath e Shoelson, 2011).

No DM2, o processo inflamatório pode ocorrer por meio de diferentes mecanismos, a maioria destes relacionados com a obesidade. Foi proposto que a hipóxia é um desses mecanismos, já que a expansão do tecido adiposo pode induzir uma resposta inflamatória. Na área de oncologia, é bem estabelecido que tecidos de rápido crescimento podem se expandir de maneira mais rápida do que a vascularização, responsável pelo fornecimento de oxigênio e nutrientes para os tecidos (Donath e Shoelson, 2011). Nesse contexto, a hipóxia pode ocorrer, o que foi comprovado em roedores com propensão à obesidade, pela análise do tecido adiposo em rápida expansão (Hosogai et al., 2007). Verificou-se que os macrófagos frequentemente se acumulam em regiões de hipóxia e, nessa condição, são induzidos a expressar uma série de fatores pró-inflamatórios, corroborando a hipótese da resistência insulínica e também reforçando a correlação entre a indução de inflamação e o crescimento do tecido adiposo, as quais são características da obesidade (Burke et al., 2003; Donath e Shoelson, 2011).

Com o tecido adiposo em rápida expansão, a morte celular também pode ocorrer devido à falta de nutrientes, também desencadeando o acúmulo de macrófagos (Cinti et al., 2005). Ainda, uma série de quimiocinas e adipocinas são liberadas pelo tecido adiposo em expansão aumentando ainda mais o processo inflamatório e estimulando o acúmulo de células do sistema imune no tecido adiposo (Sartipy e Loskutoff, 2003; Kamei et al., 2006). Alguns genes codificadores

quimiocinas e adipocinas, como *CCL2*, *CCL3* e *CXCL1*, foram diferencialmente expressos no presente trabalho.

A regulação da via NF- κ B também pode estar envolvida na indução de inflamação. Grande parte do estresse metabólico envolvido na promoção da resistência insulínica também ativa a via de resposta à inflamação e estresse NF- κ B (Shoelson, 2006). Foi sugerido que a obesidade se associa à ativação de NF- κ B, que por sua vez, induz a produção de uma série de citocinas pró-inflamatórias, como TNF, IL-6 e IL-1 β , intensificando a resposta inflamatória (Shoelson, 2006; Donath e Shoelson, 2011).

Conforme exposto, tais mecanismos envolvendo resposta inflamatória também podem se associar ao aumento do estresse oxidativo em pacientes DM2. O excesso de tecido adiposo e a liberação de citocinas pró-inflamatórias estimulam fortemente a produção de radicais livres por parte de macrófagos e monócitos (Fernandez-Sanchez et al., 2011). Os níveis de estresse oxidativo são correlacionados com níveis de dano no DNA, sendo que este último se relaciona a processos inflamatórios em DM2. De fato, Blasiak (2004) verificou que pacientes DM2 apresentaram níveis basais de danos no DNA maiores do que indivíduos saudáveis.

No presente trabalho, o grupo de pacientes compensados (DM2-C) apresentou níveis de expressão maiores do que os outros dois grupos (Controle e DM2-D) com relação aos genes que compõem o agrupamento enriquecido de resposta inflamatória, o que pode indicar que esses pacientes do grupo DM2-C apresentam uma indução com relação a fatores inflamatórios, mesmo levando em conta que os mesmos apresentam níveis glicêmicos e controle da doença melhores que o grupo DM2-D.

Assim, apesar da importância do controle glicêmico pelos pacientes, este pode não ser o único fator capaz de diminuir os níveis de componentes inflamatórios em pacientes DM2, sendo que muito provavelmente há necessidade de um controle mais rígido da obesidade e redução do tecido adiposo. Vale ressaltar que a maioria dos pacientes deste estudo apresentou sobrepeso ou obesidade leve no momento da coleta de sangue, incluindo os pacientes do grupo DM2-C. Além disso, o grau de inflamação pode variar entre indivíduos e entre tecidos, sendo que desta forma, os níveis de fatores inflamatórios circulantes podem não refletir a severidade da inflamação em um determinado tecido (Donath e Shoelson, 2011).

Desde o trabalho inicial de Schena et al. (1995), a técnica de microarranjos se tornou uma ferramenta comum na pesquisa médica e biológica, devido à sua capacidade de traçar o perfil de expressão transcricional de milhares de genes simultaneamente. No entanto, sabe-se que a maioria dos fenômenos biológicos ocorre através da expressão combinada de múltiplos genes (Wu e Lin, 2009). Dessa forma, é possível utilizar o conhecimento existente sobre quais genes estariam relacionados a determinadas vias de sinalização ou grupos funcionais, focalizando a análise em grupos de genes relacionados, ou grupos gênicos. Assim, apenas a análise de genes individuais pode não detectar a modulação de vias importantes, já que pequenas diferenças de expressão em um grupo de genes podem ser significativas entre diferentes condições (Wu e Lin, 2009).

Nesse contexto, a análise de enriquecimento de grupos funcionais - GSEA (Mootha et al, 2003) e também a análise de grupos funcionais - GSA foram desenvolvidas no presente trabalho. Para tanto, o banco de dados *Gene Ontology* foi utilizado com base para a caracterização dos grupos gênicos.

Após a análise citada, foram identificados 81 grupos gênicos significativamente enriquecidos pelos teste GSEA ($p < 0,005$) e 29 grupos significativos pelo teste GSA ($p < 0,005$) na comparação entre os grupos controle e DM2-C. Já na comparação entre os grupos DM2-D e controle, foram encontrados 181 grupos gênicos estatisticamente enriquecidos por meio dos testes GSEA ($p < 0,005$) e 116 grupos significativos através do teste GSA ($p < 0,005$). Finalmente, na comparação entre os grupos DM2-D e DM2-C, 105 grupos de genes foram apontados como significativamente enriquecidos pelos testes GSEA ($p < 0,005$) e 56 grupos foram encontrados significativos pelo teste GSA ($p < 0,005$).

Entre os grupos gênicos identificados nas comparações DM2-C vs. controle e DM2-C vs. DM2-D, uma série deles estão relacionados à indução ou controle de resposta inflamatória, produção de citocinas, quimiocinas e adipocinas. Novamente, por essa análise, o grupo de pacientes DM2 compensados apresentou uma indução de resposta inflamatória, fator importante, conforme mencionado anteriormente, no desenvolvimento da resistência insulínica e também e na produção de estresse oxidativo.

Quando comparados ao grupo controle, tanto o grupo DM2-C quanto DM2-D, muitos dos grupos gênicos selecionados pela análise foram relacionados com a respiração celular e a cadeia de transporte de elétrons. A obesidade causa uma

sobrecarga mecânica ao organismo, além de um maior metabolismo do miocárdio, assim, aumentando o consumo de oxigênio (Fernandez-Sanchez et al., 2011). Além disso, níveis maiores de glicose sobrecarregam a respiração celular, sendo que o aumento desta em adição à perda de elétrons durante a cadeia de transporte destes, leva ao aumento da produção de ROS (superóxido, radical hidroxil e peróxido de hidrogênio) (Khan et al., 2006; Fernandez-Sanchez et al., 2011). Provavelmente, o controle glicêmico apresentado pelos pacientes do grupo DM2-C parece não ter sido suficiente para evitar a sobrecarga da respiração celular. Por outro lado, esses pacientes também podem estar expostos a períodos de hiperglicemia.

Dentre os grupos gênicos selecionados pela análise, alguns merecem maior destaque. Um deles é a regulação do reparo do DNA (GO: 0006282), cujo conjunto de genes se apresentou significativamente induzido no grupo DM2-D quando comparados ao grupo DM2-C ($p < 0,005$ +).

Existem evidências de que indivíduos com DM2 apresentam um sistema de reparo do DNA menos eficiente (Sliwiska et al., 2008). Blasiak et al. (2004) realizaram um estudo no qual comparam a eficiência de reparo, mensurada pela análise dos danos no DNA pelo ensaio do Cometa em um grupo de pacientes DM2 com a doença descontrolada em relação a um grupo de indivíduos saudáveis, em resposta ao dano causado pelo peróxido de hidrogênio e pela doxorubicina. Além de apresentarem um nível de dano basal maior do que indivíduos normais, quando expostos aos agentes mutagênicos, os pacientes DM2 apresentaram também uma eficiência de reparo menor, apesar de ambos os grupos terem sido capazes de reparar o dano.

Apesar de parecerem processos diferenciados e que ocorrem por motivos distintos, o reparo de DNA e a via de resposta à insulina (a qual está alterada em pacientes DM2, devido à resistência insulínica) apresenta um gene em comum, o gene *ATM*, o qual estabelece uma ligação entre esses dois processos. Esse gene codifica uma proteína quinase, a qual atua como sensora de danos induzidos na molécula de DNA, sendo uma das primeiras a ser ativada em resposta a danos causados pelas radiações ionizantes e outros agentes que induzam quebras no DNA, transativando uma série de outras proteínas envolvidas no bloqueio do ciclo celular, apoptose, reparo do DNA e duplicação do centrômero (Shiloh, 2003).

A síndrome Ataxia telangiectasia (AT) é uma doença autossômica recessiva causada pela falta ou inativação da proteína ATM. A doença foi primeiramente descrita em crianças e é caracterizada pela degeneração cerebelar, predisposição ao câncer, envelhecimento prematuro, retardo no crescimento, imunodeficiência, além de uma elevada sensibilidade aos efeitos das radiações ionizantes (Shiloh e Kastan, 2001). No entanto, um dado interessante é que pacientes AT apresentam uma incidência aumentada de DM2, exibindo tanto resistência à insulina quanto intolerância à glicose, duas características marcantes da doença (Robinson e Kessler, 1992; Blevins e Gebhart, 1996).

Devido à relação entre AT e DM2, a função da proteína ATM fora do núcleo, mas no citoplasma, passou a ser melhor investigada quanto ao papel da proteína ATM na sinalização da insulina e na resistência insulínica (Miles et al., 2007; Halaby et al., 2008).

A ATM media a completa ativação do complexo AKT/PKB, onde AKT é um dos principais componentes da via de transdução de sinal PI3-(Vinięra et al., 2005). Em resposta à insulina, além de controlar a tradução de uma série de outros fatores, a AKT também controla a captação da glicose pela célula, pela regulação da GLUT4, molécula que media o transporte da glicose para o interior da célula (Bryant et al., 2002). Assim, a ATM parece desempenhar um papel importante, atuando indiretamente na interiorização da glicose pela célula. Assim, em pacientes AT, há relatos de que a falta da proteína ATM parece contribuir para o desenvolvimento de resistência insulínica, por não ativar as moléculas responsáveis pela interiorização da glicose (Miles et al., 2007; Halaby et al., 2008). O desenvolvimento da resistência insulínica também pode influenciar negativamente a expressão da proteína ATM. Halaby et al. (2008), ao estudarem camundongos induzidos a desenvolverem resistência insulínica, também detectaram uma menor expressão proteica de ATM, provavelmente pela repressão da transcrição desse gene. No entanto, os mecanismos envolvidos ainda são desconhecidos.

Com base nas informações mencionadas, é possível que a resistência insulínica característica dos pacientes DM2 possa desencadear uma menor atividade quinase da proteína ATM. Assim, em resposta a danos no DNA, a transmissão de sinais ao sistema de reparo pode ocorrer de forma pouco eficiente. Matsuoka et al. (Matsuoka et al., 2000) realizaram um estudo ao nível proteômico em larga escala visando identificar proteínas relacionadas com a resposta ao dano

no DNA e que reconhecessem sítios semelhantes aos das proteínas ATM e ATR. Mais de 700 proteínas foram encontradas, o que demonstra que os mesmos processos podem ser ativados por diferentes vias, muitas delas ainda a serem documentadas.

Realmente, a modulação dos genes de reparo só ocorreu na comparação entre os grupos DM2-C e DM2-D, estando induzida no grupo DM2-D. Como esse grupo apresentou maiores níveis glicêmicos e menor controle da doença, a indução do processo de reparo pode ter ocorrido em resposta aos maiores níveis de estresse oxidativo decorrente da hiperglicemia.

Outro grupo gênico que se mostrou diferencialmente expresso e merece destaque se relaciona à resposta ao superóxido (GO: 0000303). Os genes desse grupo gênico se apresentaram significativamente reprimidos no grupo DM2-D, quando comparados ao grupo controle ($p < 0,005$). A respiração celular na mitocôndria torna essa organela o sítio de maior produção de radicais livres em uma célula (Fernandez-Sanchez et al., 2011). Mesmo sendo um processo eficiente, uma pequena porcentagem de elétrons pode escapar do complexo e reduzir o oxigênio, formando o superóxido, uma das mais importantes ROS e uma das moléculas primárias na indução de estresse oxidativo (Fernandez-Sanchez et al., 2011).

Em DM-2, a obesidade e os maiores níveis de glicose sobrecarregam a respiração celular, contribuindo para o aumento do estresse oxidativo (Khan et al., 2006). Em vista disso, a defesa antioxidante se torna necessária contra o estresse oxidativo. No entanto, alguns estudos demonstraram que pacientes com DM2 podem apresentar uma defesa anti-oxidante deficiente em relação a indivíduos normais, o que acarreta um aumento, não só na geração de ROS, como também na quantidade de danos causados pelos mesmos (Nishikawa et al., 2000). A hiperglicemia pode também levar à glicação de enzimas antioxidantes, o que causa a inativação destas, diminuindo desta forma a defesa anti-oxidante (Wiernsperger, 2003). No presente estudo, os maiores níveis glicêmicos apresentados pelo grupo DM2-D podem de alguma forma dificultar a resposta a agentes oxidantes em nível transcricional. No caso dos indivíduos DM2-C, o controle glicêmico parece ser suficiente para evitar que isso aconteça. Ainda, a indução transcricional de genes ligados à regulação do reparo de DNA pode constituir uma resposta ao estresse oxidativo decorrente de uma resposta antioxidante menos eficiente no grupo DM2-D. Assim, um maior nível glicêmico pode ser responsável pela inibição da defesa

antioxidante, mas mesmo nessas condições, o sistema de reparo parece ser capaz de responder a esse estímulo, pelo menos ao nível de transcrição.

O grupo gênico relacionado a respostas ao estresse do retículo endoplasmático (GO: 0034976) também foi selecionado para a discussão devido à importância que tem recebido nos últimos anos, quanto ao seu papel em muitas doenças, inclusive o diabetes. Interessantemente, o grupo DM2-D apresentou uma repressão ($p < 0,005$) dos genes ligados a esse grupo gênico em comparação ao grupo controle.

O retículo endoplasmático (RE) é a principal organela responsável por regular não só a síntese de proteínas, mas também o seu dobramento, sua maturação e transporte, representando o mais importante sensor de nutrientes no interior da célula e um importante coordenador de respostas metabólicas. Condições que prejudicam a função do RE, como um aumento na síntese de proteínas mal-dobradas, ativam uma elaborada resposta adaptativa, a resposta a proteínas mal-dobradas (UPR) (Ron e Walter, 2007; Piperi et al., 2012). O RE está envolvido em uma complexa rede de sinalização que envia e recebe informação de praticamente qualquer compartimento celular. Chaperonas especializadas e enzimas relacionadas ao dobramento proteico garantem a homeostase do RE, mantendo um controlado balanço entre a síntese e o correto dobramento de proteínas (Piperi et al., 2012). No entanto, várias condições podem quebrar esse equilíbrio homeostático, tais como o excesso de nutrientes, resistência insulínica, aumento nos níveis de ROS e inflamação relacionada à obesidade (Scheuner et al., 2005).

Há evidência de que a hiperglicemia também está associada ao estresse no RE. O excesso de glicose, ao reagir com outras moléculas, como lipídeos e proteínas, leva à formação dos AGEs, uma reação irreversível capaz de gerar grande quantidade de ROS, consequentemente levando a alterações na homeostase do RE (Inagi, 2011; Piperi et al., 2012).

Com o RE sob estresse, a UPR (*unfolded protein response*) é ativada. Primeiramente, ocorre a ativação de chaperonas e proteínas de dobramento com o objetivo de aprimorar a eficiência do dobramento proteico (Inagi, 2011; Piperi et al., 2012). No caso de uma hiperativação da resposta UPR, uma cascata de sinalização é ativada, com o objetivo de eliminar os efeitos decorrentes do estresse, o que muitas vezes pode levar à promoção da morte celular (Piperi et al., 2012). De fato, em situações onde o RE sofre um prolongado período de estresse, como no caso de

uma exposição crônica à hiperglicemia, a resposta UPR participa da ativação de receptores de morte, desencadeando o processo de apoptose. Os efeitos do estresse contínuo ao RE têm sido associados ao desenvolvimento de inflamação e também várias complicações da doença (Hayashi et al., 2005; Piperi et al., 2012).

No presente trabalho, apenas o grupo de pacientes descompensados (DM2-D) apresentou modulação no grupo gênico relacionado à resposta ao estresse do RE, isto é, o grupo gênico se apresentou reprimido no grupo DM2-D em relação ao grupo controle. Nesse caso, se esses pacientes estão expostos a níveis glicêmicos maiores e teoricamente submetidos a níveis aumentados de estresse oxidativo, seria esperada uma indução da resposta ao estresse do RE. No entanto, a repressão observada pode significar uma menor capacidade em responder ao estresse do RE, resultante de algum processo ligado à hiperglicemia, mas ainda não conhecido.

Os microRNAs estão envolvidos na regulação de inúmeros processos biológicos, como diferenciação, proliferação, apoptose, secreção de insulina, assim como no desenvolvimento de uma série de órgãos, incluindo coração, cérebro e músculos (Bartel, 2004; Harfe, 2005; Krutzfeldt e Stoffel, 2006). Portanto, é esperado que a desregulação da expressão transcricional dessas moléculas de RNA pequenas esteja envolvida em várias condições patológicas, visto que microRNAs com expressão significativa já foram associados a tumores, doenças cardiovasculares, neurológicas, virais e metabólicas (Nair et al., 2012; Zen e Zhang, 2012), incluindo DM2 e condições de exposição a altos níveis de glicose autores (Li et al., 2009; Du et al., 2010; Fred et al., 2010; Dey et al., 2011; Togliatto et al., 2011; Kim et al., 2012; Li et al., 2012; Mocharla et al., 2013; Spinetti et al., 2013). Deste modo, os perfis transcricionais dos microRNAs podem fornecer informações úteis para a compreensão do desenvolvimento e progressão do DM2.

No presente trabalho, os perfis de expressão de microRNAs foram investigados por meio do método de microarranjos de forma pareada: DM2-C *versus* controles, DM2-D *versus* controles, bem como DM2-D *versus* DM2-C. Os resultados demonstraram perfis de expressão distintos para cada uma das comparações, em concordância com os trabalhos da literatura mencionados anteriormente, já que não somente o DM2, mas também a condição hiperglicêmica podem ser caracterizados pelos perfis transcricionais de microRNAs. Por esse motivo, foi possível distinguir pacientes afetados pela mesma doença, porém apresentando características

específicas (pacientes descompensados versus compensados) através da assinatura de microRNAs

Além disso, o presente estudo confirmou a expressão desregulada de 25 microRNAs (DM2-C *versus* controle), 21 (DM2-D *versus* controle) e 16 (DM2-D *versus* DM2-C) dos 101 já descritos em DM2 e, ainda, de sete (DM2-D *versus* DM2-C) dos 24 microRNAs já associados com a hiperglicemia). Assim, isto demonstra que os 72, 33, 85 e 94 microRNAs restantes, respectivamente, foram pela primeira vez implicados no DM2 e na condição hiperglicêmica. É importante destacar que os 16 microRNAs compartilhados entre a lista dos diferencialmente expressos na comparação entre os dois grupos de pacientes e a lista dos microRNAs envolvidos no diabetes, estão implicados tanto na hiperglicemia quanto na doença em si.

Ainda, 24 microRNAs (hcmv-miR-US25-2-5p, hsa-miR-1, hsa-miR-107, hsa-miR-1260, hsa-miR-1305, hsa-miR-130a, hsa-miR-140-3p, hsa-miR-151-3p, hsa-miR-151-5p, hsa-miR-17, hsa-miR-186, hsa-miR-18a, hsa-miR-199a-5p, hsa-miR-222, hsa-miR-26a, hsa-miR-29c, hsa-miR-342-5p, hsa-miR-376^a, hsa-miR-376c, hsa-miR-410, hsa-miR-494, hsa-miR-548c-3p, hsa-miR-548f, hsa-miR-551b) foram compartilhados entre as comparações entre os dois grupos de pacientes em relação aos controles, indicando que esses microRNAs estão envolvidos no desenvolvimento e/ou progressão do DM2, independentemente dos níveis glicêmicos dos pacientes, sendo que até então, não havia relatos sobre a associação desses microRNAs com o DM2.

Uma aplicação clínica promissora no que diz respeito aos microRNAs é a utilização destes como potenciais biomarcadores para diagnóstico, subtipagem e estimativa da progressão de doenças (Nair et al., 2012; Zen e Zhang, 2012). Desta forma, o presente trabalho apresentou microRNAs diferencialmente expressos, os quais poderão ser investigados com maior profundidade, visando a compreensão do mecanismo de regulação gênica em linfócitos de pacientes com DM2.

CONCLUSÕES

7. Conclusões

- A análise de perfis transcricionais levou à identificação de mRNAs e microRNAs diferencialmente expressos na comparação entre pacientes DM2 descompensados (DM2-D) e pacientes DM2 compensados (DM2-C), indicando que os mesmos podem ter sido modulados pela hiperglicemia;
- Foram identificados mRNAs e microRNAs diferencialmente expressos na comparação entre pacientes DM2 compensados (DM2-C) e controle e também entre pacientes DM2 descompensados (DM2-D) e controle, os quais podem estar envolvidos na patogênese do DM2, mas não propriamente com a condição de hiperglicemia;
- A análise de enriquecimento funcional (*DAVID*) revelou uma série de processos enriquecidos na comparação entre os três grupos estudados (DM2-D, DM2-C e controle). Dentre os processos, o de resposta inflamatória mostrou-se mais induzido no grupo DM2-C. Assim, dada a relação entre resposta inflamatória e obesidade, o controle desta pode ser tão importante quanto o controle glicêmico na indução de processo inflamatório;
- A análise de grupos gênicos (GSA e GSEA) revelou uma série de processos diferencialmente expressos na comparação entre os três grupos estudados (DM2-D, DM2-C e controle);
- Observou-se que a hiperglicemia foi relacionada à indução da expressão transcricional de genes de regulação do reparo do DNA (GO: 0006282) e também pela repressão de genes de resposta ao superóxido (GO: 0000303) no grupo de pacientes DM2-D, fato que não ocorreu no grupo de pacientes DM2-C, que apresentou um melhor controle glicêmico;
- Os genes envolvidos na resposta ao estresse do retículo endoplasmático (GO: 0034976) sofreram uma repressão no grupo de pacientes DM2-D quando comparados ao grupo controle, ao contrário da literatura, que aponta a

hiperglicemia como fator de indução da resposta ao estresse do retículo endoplasmático;

- O presente trabalho gerou informações sobre a identificação de uma série de microRNAs diferencialmente expressos relacionados tanto à condição de hiperglicemia quanto à própria doença (DM2).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

8. Referências bibliográficas

- Azzu, V. e Brand, M.D., 2010. The on-off switches of the mitochondrial uncoupling proteins. *Trends Biochem Sci* 35, 298-307.
- Bagga, S., Bracht, J., Hunter, S., Massirer, K., Holtz, J., Eachus, R. e Pasquinelli, A.E., 2005. Regulation by let-7 and lin-4 miRNAs results in target mRNA degradation. *Cell* 122, 553-63.
- Balajee, A.S. e Bohr, V.A., 2000. Genomic heterogeneity of nucleotide excision repair. *Gene* 250, 15-30.
- Baroukh, N., Ravier, M.A., Loder, M.K., Hill, E.V., Bounacer, A., Scharfmann, R., Rutter, G.A. e Van Obberghen, E., 2007. MicroRNA-124a regulates Foxa2 expression and intracellular signaling in pancreatic beta-cell lines. *J Biol Chem* 282, 19575-88.
- Barroso, I., Luan, J., Sandhu, M.S., Franks, P.W., Crowley, V., Schafer, A.J., O'Rahilly, S. e Wareham, N.J., 2006. Meta-analysis of the Gly482Ser variant in PPARGC1A in type 2 diabetes and related phenotypes. *Diabetologia* 49, 501-5.
- Bartel, D.P., 2004. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 116, 281-97.
- Berezikov, E., Chung, W.J., Willis, J., Cuppen, E. e Lai, E.C., 2007. Mammalian mirtron genes. *Mol Cell* 28, 328-36.
- Bjelland, S. e Seeberg, E., 2003. Mutagenicity, toxicity and repair of DNA base damage induced by oxidation. *Mutat Res* 531, 37-80.
- Blasiak, J., Arabski, M., Krupa, R., Wozniak, K., Zadrozny, M., Kasznicki, J., Zurawska, M. e Drzewoski, J., 2004. DNA damage and repair in type 2 diabetes mellitus. *Mutat Res* 554, 297-304.
- Blevins, L.S., Jr. e Gebhart, S.S., 1996. Insulin-resistant diabetes mellitus in a black woman with ataxia-telangiectasia. *South Med J* 89, 619-21.
- Boden, G., 2011. Obesity, insulin resistance and free fatty acids. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 18, 139-43.
- Bolstad, B.M., Irizarry, R.A., Astrand, M. e Speed, T.P., 2003. A comparison of normalization methods for high density oligonucleotide array data based on variance and bias. *Bioinformatics* 19, 185-93.
- Breitling, R., Armengaud, P., Amtmann, A. e Herzyk, P., 2004. Rank products: a simple, yet powerful, new method to detect differentially regulated genes in replicated microarray experiments. *FEBS Lett* 573, 83-92.
- Brownlee, M., 2001. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature* 414, 813-20.
- Bryant, N.J., Govers, R. e James, D.E., 2002. Regulated transport of the glucose transporter GLUT4. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3, 267-77.
- Burke, B., Giannoudis, A., Corke, K.P., Gill, D., Wells, M., Ziegler-Heitbrock, L. e Lewis, C.E., 2003. Hypoxia-induced gene expression in human macrophages: implications for ischemic tissues and hypoxia-regulated gene therapy. *Am J Pathol* 163, 1233-43.
- Chessel, D., Dufour, A.B. e Thioulouse, J., 2004. The ade4 package - I: One-table methods.
- Choi, S.W., Benzie, I.F., Lam, C.S., Chat, S.W., Lam, J., Yiu, C.H., Kwan, J.J., Tang, Y.H., Yeung, G.S., Yeung, V.T., Woo, G.C., Hannigan, B.M. e Strain, J.J., 2005. Inter-

- relationships between DNA damage, ascorbic acid and glycaemic control in Type 2 diabetes mellitus. *Diabet Med* 22, 1347-53.
- Cinti, S., Mitchell, G., Barbatelli, G., Murano, I., Ceresi, E., Faloia, E., Wang, S., Fortier, M., Greenberg, A.S. e Obin, M.S., 2005. Adipocyte death defines macrophage localization and function in adipose tissue of obese mice and humans. *J Lipid Res* 46, 2347-55.
- Collins, A.R., Raslova, K., Somorovska, M., Petrovska, H., Ondrusova, A., Vohnout, B., Fabry, R. e Dusinska, M., 1998. DNA damage in diabetes: correlation with a clinical marker. *Free Radic Biol Med* 25, 373-7.
- Cox, N.J., Hayes, M.G., Roe, C.A., Tsuchiya, T. e Bell, G.I., 2004. Linkage of calpain 10 to type 2 diabetes: the biological rationale. *Diabetes* 53 Suppl 1, S19-25.
- Crunkhorn, S., 2013. Metabolic disorders: Breaking the links between inflammation and diabetes. *Nat Rev Drug Discov* 12, 261.
- Damcott, C.M., Hoppman, N., Ott, S.H., Reinhart, L.J., Wang, J., Pollin, T.I., O'Connell, J.R., Mitchell, B.D. e Shuldiner, A.R., 2004. Polymorphisms in both promoters of hepatocyte nuclear factor 4-alpha are associated with type 2 diabetes in the Amish. *Diabetes* 53, 3337-41.
- Desideri, A. e Falconi, M., 2003. Prokaryotic Cu,Zn superoxide dismutases. *Biochem Soc Trans* 31, 1322-5.
- Dey, N., Das, F., Mariappan, M.M., Mandal, C.C., Ghosh-Choudhury, N., Kasinath, B.S. e Choudhury, G.G., 2011. MicroRNA-21 orchestrates high glucose-induced signals to TOR complex 1, resulting in renal cell pathology in diabetes. *J Biol Chem* 286, 25586-603.
- Dizdaroglu, M., Jaruga, P., Birincioglu, M. e Rodriguez, H., 2002. Free radical-induced damage to DNA: mechanisms and measurement. *Free Radic Biol Med* 32, 1102-15.
- Donath, M.Y. e Shoelson, S.E., 2011. Type 2 diabetes as an inflammatory disease. *Nat Rev Immunol* 11, 98-107.
- Du, B., Ma, L.M., Huang, M.B., Zhou, H., Huang, H.L., Shao, P., Chen, Y.Q. e Qu, L.H., 2010. High glucose down-regulates miR-29a to increase collagen IV production in HK-2 cells. *FEBS Lett* 584, 811-6.
- Evans, J.L., Goldfine, I.D., Maddux, B.A. e Grodsky, G.M., 2003. Are oxidative stress-activated signaling pathways mediators of insulin resistance and beta-cell dysfunction? *Diabetes* 52, 1-8.
- Fernandez-Sanchez, A., Madrigal-Santillan, E., Bautista, M., Esquivel-Soto, J., Morales-Gonzalez, A., Esquivel-Chirino, C., Durante-Montiel, I., Sanchez-Rivera, G., Valadez-Vega, C. e Morales-Gonzalez, J.A., 2011. Inflammation, oxidative stress, and obesity. *Int J Mol Sci* 12, 3117-32.
- Fisler, J.S. e Warden, C.H., 2006. Uncoupling proteins, dietary fat and the metabolic syndrome. *Nutr Metab (Lond)* 3, 38.
- Florez, J.C., Hirschhorn, J. e Altshuler, D., 2003. The inherited basis of diabetes mellitus: implications for the genetic analysis of complex traits. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 4, 257-91.
- Fred, R.G., Bang-Berthelsen, C.H., Mandrup-Poulsen, T., Grunnet, L.G. e Welsh, N., 2010. High glucose suppresses human islet insulin biosynthesis by inducing miR-133a leading to decreased polypyrimidine tract binding protein-expression. *PLoS One* 5, e10843.

- Freeman, H. e Cox, R.D., 2006. Type-2 diabetes: a cocktail of genetic discovery. *Hum Mol Genet* 15 Spec No 2, R202-9.
- Gerich, J.E., 1999. Is insulin resistance the principal cause of type 2 diabetes? *Diabetes Obes Metab* 1, 257-63.
- Golay, A. e Ybarra, J., 2005. Link between obesity and type 2 diabetes. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 19, 649-63.
- Guo, H., Ingolia, N.T., Weissman, J.S. e Bartel, D.P., 2010. Mammalian microRNAs predominantly act to decrease target mRNA levels. *Nature* 466, 835-40.
- Halaby, M.J., Hibma, J.C., He, J. e Yang, D.Q., 2008. ATM protein kinase mediates full activation of Akt and regulates glucose transporter 4 translocation by insulin in muscle cells. *Cell Signal* 20, 1555-63.
- Hara, K., Horikoshi, M., Kitazato, H., Ito, C., Noda, M., Ohashi, J., Froguel, P., Tokunaga, K., Tobe, K., Nagai, R. e Kadowaki, T., 2006. Hepatocyte nuclear factor-4alpha P2 promoter haplotypes are associated with type 2 diabetes in the Japanese population. *Diabetes* 55, 1260-4.
- Harfe, B.D., 2005. MicroRNAs in vertebrate development. *Curr Opin Genet Dev* 15, 410-5.
- Hatahet, Z., Purmal, A.A. e Wallace, S.S., 1994. Oxidative DNA lesions as blocks to in vitro transcription by phage T7 RNA polymerase. *Ann N Y Acad Sci* 726, 346-8.
- Hayashi, T., Saito, A., Okuno, S., Ferrand-Drake, M., Dodd, R.L. e Chan, P.H., 2005. Damage to the endoplasmic reticulum and activation of apoptotic machinery by oxidative stress in ischemic neurons. *J Cereb Blood Flow Metab* 25, 41-53.
- He, A., Zhu, L., Gupta, N., Chang, Y. e Fang, F., 2007. Overexpression of micro ribonucleic acid 29, highly up-regulated in diabetic rats, leads to insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes. *Mol Endocrinol* 21, 2785-94.
- Hendrickson, D.G., Hogan, D.J., McCullough, H.L., Myers, J.W., Herschlag, D., Ferrell, J.E. e Brown, P.O., 2009. Concordant regulation of translation and mRNA abundance for hundreds of targets of a human microRNA. *PLoS Biol* 7, e1000238.
- Hong, F., Breitling, R., McEntee, C.W., Wittner, B.S., Nemhauser, J.L. e Chory, J., 2006. RankProd: a bioconductor package for detecting differentially expressed genes in meta-analysis. *Bioinformatics* 22, 2825-7.
- Hosogai, N., Fukuhara, A., Oshima, K., Miyata, Y., Tanaka, S., Segawa, K., Furukawa, S., Tochino, Y., Komuro, R., Matsuda, M. e Shimomura, I., 2007. Adipose tissue hypoxia in obesity and its impact on adipocytokine dysregulation. *Diabetes* 56, 901-11.
- Hotamisligil, G.S. e Erbay, E., 2008. Nutrient sensing and inflammation in metabolic diseases. *Nat Rev Immunol* 8, 923-34.
- Houtgraaf, J.H., Versmissen, J. e van der Giessen, W.J., 2006. A concise review of DNA damage checkpoints and repair in mammalian cells. *Cardiovasc Revasc Med* 7, 165-72.
- <http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html>.
- Huang da, W., Sherman, B.T. e Lempicki, R.A., 2009a. Bioinformatics enrichment tools: paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists. *Nucleic Acids Res* 37, 1-13.
- Huang da, W., Sherman, B.T. e Lempicki, R.A., 2009b. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat Protoc* 4, 44-57.

- Hutvagner, G., McLachlan, J., Pasquinelli, A.E., Balint, E., Tuschl, T. e Zamore, P.D., 2001. A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the let-7 small temporal RNA. *Science* 293, 834-8.
- Inagi, R., 2011. Inhibitors of advanced glycation and endoplasmic reticulum stress. *Methods Enzymol* 491, 361-80.
- Inagi, R., 2011. Inhibitors of advanced glycation and endoplasmic reticulum stress. *Methods Enzymol* 491, 361-80.
- Johnson, W.E., Li, C. e Rabinovic, A., 2007. Adjusting batch effects in microarray expression data using empirical Bayes methods. *Biostatistics* 8, 118-27.
- Kamei, N., Tobe, K., Suzuki, R., Ohsugi, M., Watanabe, T., Kubota, N., Ohtsuka-Kowatari, N., Kumagai, K., Sakamoto, K., Kobayashi, M., Yamauchi, T., Ueki, K., Oishi, Y., Nishimura, S., Manabe, I., Hashimoto, H., Ohnishi, Y., Ogata, H., Tokuyama, K., Tsunoda, M., Ide, T., Murakami, K., Nagai, R. e Kadowaki, T., 2006. Overexpression of monocyte chemoattractant protein-1 in adipose tissues causes macrophage recruitment and insulin resistance. *J Biol Chem* 281, 26602-14.
- Karran, P., 2000. DNA double strand break repair in mammalian cells. *Curr Opin Genet Dev* 10, 144-50.
- Khan, N.I., Naz, L. e Yasmeen, G., 2006. Obesity: an independent risk factor for systemic oxidative stress. *Pak J Pharm Sci* 19, 62-5.
- Kim, Y.J., Hwang, S.H., Lee, S.Y., Shin, K.K., Cho, H.H., Bae, Y.C. e Jung, J.S., 2012. miR-486-5p induces replicative senescence of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells and its expression is controlled by high glucose. *Stem Cells Dev* 21, 1749-60.
- Kohn, L.D., Wallace, B., Schwartz, F. e McCall, K., 2005. Is type 2 diabetes an autoimmune-inflammatory disorder of the innate immune system? *Endocrinology* 146, 4189-91.
- Kruger, D.F., Martin, C.L. e Sadler, C.E., 2006. New insights into glucose regulation. *Diabetes Educ* 32, 221-8.
- Krutzfeldt, J. e Stoffel, M., 2006. MicroRNAs: a new class of regulatory genes affecting metabolism. *Cell Metab* 4, 9-12.
- Ku, G. e McManus, M.T., 2008. Behind the Scenes of a Small RNA Gene-Silencing Pathway. *Hum Gene Ther*.
- Lagos-Quintana, M., Rauhut, R., Lendeckel, W. e Tuschl, T., 2001. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science* 294, 853-8.
- Lam, T.K., Carpentier, A., Lewis, G.F., van de Werve, G., Fantus, I.G. e Giacca, A., 2003. Mechanisms of the free fatty acid-induced increase in hepatic glucose production. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 284, E863-73.
- Lee, J. e Bernstein, A., 1993. p53 Mutations Increase Resistance to Ionizing Radiation. *PNAS* 90, 5742-5746.
- Lee, Y., Ahn, C., Han, J., Choi, H., Kim, J., Yim, J., Lee, J., Provost, P., Radmark, O., Kim, S. e Kim, V.N., 2003. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature* 425, 415-9.
- Leonard, S.S., Harris, G.K. e Shi, X., 2004. Metal-induced oxidative stress and signal transduction. *Free Radic Biol Med* 37, 1921-42.
- Li, M., Marin-Muller, C., Bharadwaj, U., Chow, K.H., Yao, Q. e Chen, C., 2009. MicroRNAs: control and loss of control in human physiology and disease. *World J Surg* 33, 667-84.

- Li, Y., Song, Y.H., Li, F., Yang, T., Lu, Y.W. e Geng, Y.J., 2009. MicroRNA-221 regulates high glucose-induced endothelial dysfunction. *Biochem Biophys Res Commun* 381, 81-3.
- Li, Y., Yang, C.M., Xi, Y., Wu, G., Shelat, H., Gao, S., Cheng, J. e Geng, Y.J., 2012. MicroRNA-1/133 targeted dysfunction of potassium channels KCNE1 and KCNQ1 in human cardiac progenitor cells with simulated hyperglycemia. *Int J Cardiol*.
- Lim, L.P., Lau, N.C., Garrett-Engele, P., Grimson, A., Schelter, J.M., Castle, J., Bartel, D.P., Linsley, P.S. e Johnson, J.M., 2005. Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs. *Nature* 433, 769-73.
- Lodovici, M., Bigagli, E., Bardini, G. e Rotella, C.M., 2009. Lipoperoxidation and antioxidant capacity in patients with poorly controlled type 2 diabetes. *Toxicol Ind Health* 25, 337-41.
- Lyons, T.J. e Jenkins, A.J., 1997. Lipoprotein glycation and its metabolic consequences. *Curr Opin Lipidol* 8, 174-80.
- Marquez, R.T. e McCaffrey, A.P., 2007. Advances in MicroRNAs: Implications for Gene Therapists. *Hum Gene Ther*.
- Matsuoka, S., Rotman, G., Ogawa, A., Shiloh, Y., Tamai, K. e Elledge, S.J., 2000. Ataxia telangiectasia-mutated phosphorylates Chk2 in vivo and in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 10389-94.
- Meyre, D., Bouatia-Naji, N., Tounian, A., Samson, C., Lecoœur, C., Vatin, V., Ghoussaini, M., Wachter, C., Hercberg, S., Charpentier, G., Patsch, W., Pattou, F., Charles, M.A., Tounian, P., Clement, K., Jouret, B., Weill, J., Maddux, B.A., Goldfine, I.D., Walley, A., Boutin, P., Dina, C. e Froguel, P., 2005. Variants of ENPP1 are associated with childhood and adult obesity and increase the risk of glucose intolerance and type 2 diabetes. *Nat Genet* 37, 863-7.
- Michiels, C., Raes, M., Toussaint, O. e Remacle, J., 1994. Importance of Se-glutathione peroxidase, catalase, and Cu/Zn-SOD for cell survival against oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 17, 235-48.
- Miles, P.D., Treuner, K., Latronica, M., Olefsky, J.M. e Barlow, C., 2007. Impaired insulin secretion in a mouse model of ataxia telangiectasia. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 293, E70-4.
- Mocharla, P., Briand, S., Giannotti, G., Dorries, C., Jakob, P., Paneni, F., Luscher, T. e Landmesser, U., 2013. AngiomiR-126 expression and secretion from circulating CD34(+) and CD14(+) PBMCs: role for proangiogenic effects and alterations in type 2 diabetics. *Blood* 121, 226-36.
- Moller, D.E., 2001. New drug targets for type 2 diabetes and the metabolic syndrome. *Nature* 414, 821-7.
- Morimura, R., Komatsu, S., Ichikawa, D., Takeshita, H., Tsujiura, M., Nagata, H., Konishi, H., Shiozaki, A., Ikoma, H., Okamoto, K., Ochiai, T., Taniguchi, H. e Otsuji, E., 2011. Novel diagnostic value of circulating miR-18a in plasma of patients with pancreatic cancer. *Br J Cancer* 105, 1733-40.
- Moynihan, K.A., Grimm, A.A., Plueger, M.M., Bernal-Mizrachi, E., Ford, E., Cras-Meneur, C., Permutt, M.A. e Imai, S., 2005. Increased dosage of mammalian Sir2 in pancreatic beta cells enhances glucose-stimulated insulin secretion in mice. *Cell Metab* 2, 105-17.
- Nair, V.S., Maeda, L.S. e Ioannidis, J.P., 2012. Clinical outcome prediction by microRNAs in human cancer: a systematic review. *J Natl Cancer Inst* 104, 528-40.

- Narla, G., DiFeo, A., Yao, S., Banno, A., Hod, E., Reeves, H.L., Qiao, R.F., Camacho-Vanegas, O., Levine, A., Kirschenbaum, A., Chan, A.M., Friedman, S.L. e Martignetti, J.A., 2005. Targeted inhibition of the KLF6 splice variant, KLF6 SV1, suppresses prostate cancer cell growth and spread. *Cancer Res* 65, 5761-8.
- Niedowicz, D.M. e Daleke, D.L., 2005. The role of oxidative stress in diabetic complications. *Cell Biochem Biophys* 43, 289-330.
- Nielsen, T.S., Kampmann, U., Nielsen, R.R., Jessen, N., Orskov, L., Pedersen, S.B., Jorgensen, J.O., Lund, S. e Moller, N., 2012. Reduced mRNA and protein expression of perilipin A and G0/G1 switch gene 2 (G0S2) in human adipose tissue in poorly controlled type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 97, E1348-52.
- Nishikawa, T., Edelstein, D., Du, X.L., Yamagishi, S., Matsumura, T., Kaneda, Y., Yorek, M.A., Beebe, D., Oates, P.J., Hammes, H.P., Giardino, I. e Brownlee, M., 2000. Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. *Nature* 404, 787-90.
- Nishikawa, T., Edelstein, D., Du, X.L., Yamagishi, S., Matsumura, T., Kaneda, Y., Yorek, M.A., Beebe, D., Oates, P.J., Hammes, H.P., Giardino, I. e Brownlee, M., 2000. Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. *Nature* 404, 787-90.
- Nuttall, S.L., Dunne, F., Kendall, M.J. e Martin, U., 1999. Age-independent oxidative stress in elderly patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Qjm* 92, 33-8.
- Oliveros, J.C., 2007. VENNY. An interactive tool for comparing lists with Venn Diagrams.
- Peters, L. e Meister, G., 2007. Argonaute proteins: mediators of RNA silencing. *Mol Cell* 26, 611-23.
- Piperi, C., Adamopoulos, C., Dalagiorgou, G., Diamanti-Kandarakis, E. e Papavassiliou, A.G., 2012. Crosstalk between advanced glycation and endoplasmic reticulum stress: emerging therapeutic targeting for metabolic diseases. *J Clin Endocrinol Metab* 97, 2231-42.
- Piperi, C., Adamopoulos, C., Dalagiorgou, G., Diamanti-Kandarakis, E. e Papavassiliou, A.G., 2012. Crosstalk between advanced glycation and endoplasmic reticulum stress: emerging therapeutic targeting for metabolic diseases. *J Clin Endocrinol Metab* 97, 2231-42.
- Poli, G., Leonarduzzi, G., Biasi, F. e Chiarotto, E., 2004. Oxidative stress and cell signalling. *Curr Med Chem* 11, 1163-82.
- Poy, M.N., Spranger, M. e Stoffel, M., 2007. microRNAs and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Diabetes Obes Metab* 9 Suppl 2, 67-73.
- Puigserver, P. e Rodgers, J.T., 2006. Foxa2, a novel transcriptional regulator of insulin sensitivity. *Nat Med* 12, 38-9.
- Remacle, J., Lambert, D., Raes, M., Pigeolet, E., Michiels, C. e Toussaint, O., 1992. Importance of various antioxidant enzymes for cell stability. Confrontation between theoretical and experimental data. *Biochem J* 286 (Pt 1), 41-6.
- Robinson, S. e Kessler, A., 1992. Diabetes secondary to genetic disorders. *Baillieres Clin Endocrinol Metab* 6, 867-98.
- Rolo, A.P. e Palmeira, C.M., 2006. Diabetes and mitochondrial function: role of hyperglycemia and oxidative stress. *Toxicol Appl Pharmacol* 212, 167-78.
- Ron, D. e Walter, P., 2007. Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 519-29.

- Saha, A., Adak, S., Chowdhury, S. e Bhattacharyya, M., 2005. Enhanced oxygen releasing capacity and oxidative stress in diabetes mellitus and diabetes mellitus-associated cardiovascular disease: a comparative study. *Clin Chim Acta* 361, 141-9.
- Sartipy, P. e Loskutoff, D.J., 2003. Monocyte chemoattractant protein 1 in obesity and insulin resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 7265-70.
- Schena, M., Shalon, D., Davis, R.W. e Brown, P.O., 1995. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science* 270, 467-70.
- Scheuner, D., Vander Mierde, D., Song, B., Flamez, D., Creemers, J.W., Tsukamoto, K., Ribick, M., Schuit, F.C. e Kaufman, R.J., 2005. Control of mRNA translation preserves endoplasmic reticulum function in beta cells and maintains glucose homeostasis. *Nat Med* 11, 757-64.
- Schwanstecher, C. e Schwanstecher, M., 2002. Nucleotide sensitivity of pancreatic ATP-sensitive potassium channels and type 2 diabetes. *Diabetes* 51 Suppl 3, S358-62.
- Seghrouchni, I., Draï, J., Bannier, E., Riviere, J., Calmard, P., Garcia, I., Orgiazzi, J. e Revol, A., 2002. Oxidative stress parameters in type I, type II and insulin-treated type 2 diabetes mellitus; insulin treatment efficiency. *Clin Chim Acta* 321, 89-96.
- Sethi, J.K. e Hotamisligil, G.S., 1999. The role of TNF alpha in adipocyte metabolism. *Semin Cell Dev Biol* 10, 19-29.
- Shibutani, S., Takeshita, M. e Grollman, A.P., 1991. Insertion of specific bases during DNA synthesis past the oxidation-damaged base 8-oxodG. *Nature* 349, 431-4.
- Shiloh, Y. e Kastan, M.B., 2001. ATM: genome stability, neuronal development, and cancer cross paths. *Adv Cancer Res* 83, 209-54.
- Shiloh, Y., 2003. ATM and related protein kinases: safeguarding genome integrity. *Nat Rev Cancer* 3, 155-68.
- Shoelson, S.E., 2006. Banking on ATM as a new target in metabolic syndrome. *Cell Metab* 4, 337-8.
- Sliwinska, A., Blasiak, J., Kasznicki, J. e Drzewoski, J., 2008. In vitro effect of gliclazide on DNA damage and repair in patients with type 2 diabetes mellitus (T2DM). *Chem Biol Interact* 173, 159-65.
- Spinetti, G., Cordella, D., Fortunato, O., Sangalli, E., Losa, S., Gotti, A., Carnelli, F., Rosa, F., Riboldi, S., Sessa, F., Avolio, E., Beltrami, A.P., Emanueli, C. e Madeddu, P., 2013. Global remodeling of the vascular stem cell niche in bone marrow of diabetic patients: implication of the microRNA-155/FOXO3a signaling pathway. *Circ Res* 112, 510-22.
- Stark, A., Brennecke, J., Bushati, N., Russell, R.B. e Cohen, S.M., 2005. Animal MicroRNAs confer robustness to gene expression and have a significant impact on 3'UTR evolution. *Cell* 123, 1133-46.
- Stumvoll, M., Goldstein, B.J. e van Haeften, T.W., 2005. Type 2 diabetes: principles of pathogenesis and therapy. *Lancet* 365, 1333-46.
- Tao, J., Wu, D., Li, P., Xu, B., Lu, Q. e Zhang, W., 2012. microRNA-18a, a member of the oncogenic miR-17-92 cluster, targets Dicer and suppresses cell proliferation in bladder cancer T24 cells. *Mol Med Rep* 5, 167-72.
- Taylor, S.I., 1999. Deconstructing type 2 diabetes. *Cell* 97, 9-12.
- Tesch, G.H., 2008. MCP-1/CCL2: a new diagnostic marker and therapeutic target for progressive renal injury in diabetic nephropathy. *Am J Physiol Renal Physiol* 294, F697-701.

- Togliatto, G., Trombetta, A., Dentelli, P., Rosso, A. e Brizzi, M.F., 2011. MIR221/MIR222-driven post-transcriptional regulation of P27KIP1 and P57KIP2 is crucial for high-glucose- and AGE-mediated vascular cell damage. *Diabetologia* 54, 1930-40.
- Tranchevent, L.C., Barriot, R., Yu, S., Van Vooren, S., Van Loo, P., Coessens, B., De Moor, B., Aerts, S. e Moreau, Y., 2008. ENDEAVOUR update: a web resource for gene prioritization in multiple species. *Nucleic Acids Res* 36, W377-84.
- Tuttle, K.R., 2005. Linking metabolism and immunology: diabetic nephropathy is an inflammatory disease. *J Am Soc Nephrol* 16, 1537-8.
- Tyrberg, B., Anachkov, K.A., Dib, S.A., Wang-Rodriguez, J., Yoon, K.H. e Levine, F., 2002. Islet expression of the DNA repair enzyme 8-oxoguanosine DNA glycosylase (Ogg1) in human type 2 diabetes. *BMC Endocr Disord* 2, 2.
- Valerie, K. e Povirk, L.F., 2003. Regulation and mechanisms of mammalian double-strand break repair. *Oncogene* 22, 5792-812.
- Valko, M., Izakovic, M., Mazur, M., Rhodes, C.J. e Telser, J., 2004. Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Mol Cell Biochem* 266, 37-56.
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M.T., Mazur, M. e Telser, J., 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 39, 44-84.
- Valko, M., Rhodes, C.J., Moncol, J., Izakovic, M. e Mazur, M., 2006. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact* 160, 1-40.
- Viniegra, J.G., Martinez, N., Modirassari, P., Losa, J.H., Parada Cobo, C., Lobo, V.J., Luquero, C.I., Alvarez-Vallina, L., Ramon y Cajal, S., Rojas, J.M. e Sanchez-Prieto, R., 2005. Full activation of PKB/Akt in response to insulin or ionizing radiation is mediated through ATM. *J Biol Chem* 280, 4029-36.
- Wang, Q., Wang, Y., Minto, A.W., Wang, J., Shi, Q., Li, X. e Quigg, R.J., 2008. MicroRNA-377 is up-regulated and can lead to increased fibronectin production in diabetic nephropathy. *Faseb J* 22, 4126-35.
- West, I.C., 2000. Radicals and oxidative stress in diabetes. *Diabet Med* 17, 171-80.
- White, M.F., 1997. The insulin signalling system and the IRS proteins. *Diabetologia* 40 Suppl 2, S2-17.
- Wiernsperger, N.F., 2003. Oxidative stress as a therapeutic target in diabetes: revisiting the controversy. *Diabetes Metab* 29, 579-85.
- Wolfrum, C., Asilmaz, E., Luca, E., Friedman, J.M. e Stoffel, M., 2004. Foxa2 regulates lipid metabolism and ketogenesis in the liver during fasting and in diabetes. *Nature* 432, 1027-32.
- Wu, C.W., Dong, Y.J., Liang, Q.Y., He, X.Q., Ng, S.S., Chan, F.K., Sung, J.J. e Yu, J., 2013. MicroRNA-18a attenuates DNA damage repair through suppressing the expression of ataxia telangiectasia mutated in colorectal cancer. *PLoS One* 8, e57036.
- Wu, M.C. e Lin, X., 2009. Prior biological knowledge-based approaches for the analysis of genome-wide expression profiles using gene sets and pathways. *Stat Methods Med Res* 18, 577-93.
- Yamakuni, T., Yamamoto, T., Ishida, Y., Yamamoto, H., Song, S.Y., Adachi, E., Hiwatashi, Y. e Ohizumi, Y., 2002. V-1, a catecholamine biosynthesis regulatory protein, positively controls catecholamine secretion in PC12D cells. *FEBS Lett* 530, 94-8.
- Yang, J., Robert, C.E., Burkhardt, B.R., Young, R.A., Wu, J., Gao, Z. e Wolf, B.A., 2005. Mechanisms of glucose-induced secretion of pancreatic-derived factor (PANDER or FAM3B) in pancreatic beta-cells. *Diabetes* 54, 3217-28.

- Yang, X., Lu, X., Lombes, M., Rha, G.B., Chi, Y.I., Guerin, T.M., Smart, E.J. e Liu, J., 2010. The G(0)/G(1) switch gene 2 regulates adipose lipolysis through association with adipose triglyceride lipase. *Cell Metab* 11, 194-205.
- Yea, S., Narla, G., Zhao, X., Garg, R., Tal-Kremer, S., Hod, E., Villanueva, A., Loke, J., Tarocchi, M., Akita, K., Shirasawa, S., Sasazuki, T., Martignetti, J.A., Llovet, J.M. e Friedman, S.L., 2008. Ras promotes growth by alternative splicing-mediated inactivation of the KLF6 tumor suppressor in hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 134, 1521-31.
- Zen, K. e Zhang, C.Y., 2012. Circulating microRNAs: a novel class of biomarkers to diagnose and monitor human cancers. *Med Res Rev* 32, 326-48.
- Zhou, B.B. e Bartek, J., 2004. Targeting the checkpoint kinases: chemosensitization versus chemoprotection. *Nat Rev Cancer* 4, 216-25.

ANEXO A

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA
DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

www.hcrp.fmrp.usp.br

Ribeirão Preto, 20 de julho de 2006

Ofício nº 2004/2006
CEP/SPC

Prezado Senhor:

O trabalho intitulado **“INFLUÊNCIA DA HIPERGLICEMIA SOBRE OS PADRÕES DE EXPRESSÃO GÊNICA EM LINFÓCITOS DE PACIENTES COM DIABETES MELLITUS TIPO 2, ANTES E APÓS O TRATAMENTO”**, foi analisado pelo Comitê de Ética em Pesquisa, em sua 229ª Reunião Ordinária realizada em 17/07/2006, e enquadrado na categoria: **APROVADO, bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**, de acordo com o Processo HCRP nº 7066/2006.

Aproveito a oportunidade para apresentar a Vossa Senhoria protestos de estima e consideração.

PROF.DR. SÉRGIO PEREIRA DA CUNHA
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa
do HCRP e da FMRP-USP

Ilustríssimo Senhor
DANILO JORDÃO XAVIER
PROFª DRª ELZA TIEMI SAKAMOTO HOJO (Orientadora)
Depto. de Genética – FMRP-USP
Em mãos

HC - Campus Universitário
Monte Alegre 14048-900 Ribeirão Preto SP

Comitê de Ética em Pesquisa do HCFMRP-USP
(016)3602-2228
cep@hcrp.fmrp.usp.br

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA
DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

www.hcrp.fmrp.usp.br

Ribeirão Preto, 27 de maio de 2009

Ofício nº 1631/2009
CEP/MGV

Prezadas Senhoras,

O trabalho intitulado **"PERFIS DE EXPRESSÃO GÊNICA ASSOCIADOS AO PROCESSAMENTO DE DANO OXIDATIVO DO DNA EM PACIENTES COM DIABETES MELLITUS"** foi analisado pelo Comitê de Ética em Pesquisa, em sua 287ª Reunião Ordinária realizada em 25/05/2009 e enquadrado na categoria: **APROVADO**, bem como o **Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**, de acordo com o Processo HCRP nº 9154/2008.

Este Comitê segue integralmente a Conferência Internacional de Harmonização de Boas Práticas Clínicas (ICH-GCP), bem como a Resolução nº 196/96 CNS/MS.

Lembramos que devem ser apresentados a este CEP, o Relatório Parcial e o Relatório Final da pesquisa.

Atenciosamente,

DRª MARCIA GUIMARÃES VILLANOVA
Vice-Coordenadora do Comitê de Ética em
Pesquisa do HCRP e da FMRP-USP

Ilustríssimas Senhoras

PROFª DRª ELZA TIEMI SAKAMOTO HOJO
DRª DIANE MEYRE RASSI (Pesquisadora Colaboradora)
Depto. de Genética – FMRP-USP

Comitê de Ética em Pesquisa HCRP e FMRP-USP - Campus Universitário
PWA - 0000 2733; IIRB - 0000 2186 e Registro SISNEPICONEP nº 4
Fone (16) 3662-2228 - E-mail: cep@hcrp.fmrp.usp.br
Monte Alegre 14048-900 Ribeirão Preto - SP

ANEXO B

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Campus Universitário Monte Alegre - Fone: 633-1000 - Fax: 633-1144

CEP 14048-900 RIBEIRÃO PRETO - SÃO PAULO

CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – PACIENTES

NOME DA PESQUISA: INFLUÊNCIA DA HIPERGLICEMIA SOBRE OS PADRÕES DE EXPRESSÃO GÊNICA EM LINFÓCITOS DE PACIENTES COM DIABETES MELLITUS TIPO 2, ANTES E APÓS O TRATAMENTO.

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Danilo Jordão Xavier

ENDEREÇO PARA CONTATO : Av. Bandeirantes, 3900; CEP: 14049-900

Laboratório de Citogenética e Mutagênese, Bloco G

Departamento de Genética - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP/USP).

Telefone : (16) 3602-3082

Prezado (a) doador (a),

A Diabetes Mellitus é uma doença que afeta um grande número de pessoas, tanto no Brasil quanto no restante do mundo, sendo que uma das principais características da doença é a hiperglicemia, ou seja, uma quantidade aumentada de açúcar (glicose) no sangue, acima dos níveis normais. Neste trabalho, queremos investigar quais são os genes que possam ser responsáveis pelo desenvolvimento da diabetes ou das complicações e problemas que resultam das taxas elevadas de açúcar no sangue. Com essa finalidade, necessitamos coletar uma amostra de 20 mL de sangue antes do tratamento (quando o exame apresentar um alto nível de açúcar no sangue) e depois do tratamento em regime de internação (quando a taxa de glicose ficar normal).

Este tipo de estudo nos ajudará a compreender melhor esta doença (Diabetes) tão complicada e, no futuro, junto com informações de outras pesquisas, poderá contribuir para melhorar o tratamento, ou mesmo para prevenir a doença.

Caso concorde em participar da pesquisa, serão coletados 20ml do seu sangue. Portanto, você sofrerá o incômodo de uma picada de agulha, mas não haverá risco à sua saúde. A coleta será feita por um profissional capacitado, no dia em que você vier ao ambulatório para fazer a consulta. Você não terá que realizar nenhum gasto para fazer a coleta de sangue e também não será remunerado (a) pela sua contribuição.

Se aceitar participar da pesquisa, você poderá pedir esclarecimentos sobre como o material está sendo utilizado sempre que achar necessário. Nós asseguramos que a sua identificação será considerada confidencial, ou seja, você não será identificado (a) em nenhum trabalho científico. Você não é, de modo algum, obrigado a colaborar com esta pesquisa e, mesmo que concordar agora, poderá retirar o seu consentimento a qualquer momento que desejar. Colaborando ou não com a pesquisa, você continuará recebendo a mesma atenção e tratamento; este não será prejudicado sob hipótese alguma, mesmo que por algum motivo você deixe de participar da pesquisa. Gostaríamos ainda de esclarecer que, caso seja de nosso interesse realizar outro tipo de estudo com o seu sangue, você será informado (a) sobre esse novo trabalho e seu material só será utilizado com o seu consentimento.

PESQUISADOR RESPONSÁVEL

Eu, _____, RG
nº _____, abaixo assinado, tendo recebido as informações acima e ciente dos meus direitos, abaixo relacionados, concordo em participar da pesquisa.

Serão preservados os direitos do doador, conforme seguem:

- 1) A garantia de receber a resposta a qualquer pergunta ou esclarecimento a qualquer dúvida acerca dos procedimentos, riscos e benefícios e outros relacionados com a pesquisa e com o tratamento no hospital;
- 2) A liberdade de retirar o consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo sem que isso traga prejuízo em relação ao tratamento;
- 3) A segurança de não ser identificado e que a participação terá o caráter confidencial;
- 4) Receber informação atualizada durante o estudo, ainda que esta possa afetar a vontade de continuar participando;
- 5) Não serão substituídas ou modificadas quaisquer medicações por conta deste estudo, não havendo prejuízos quanto ao tratamento clínico instituído neste ambulatório;
- 6) Pelo fato desta pesquisa não impor risco à saúde dos pacientes, não haverá a necessidade de conceder remuneração ou ressarcimento aos participantes, mas em casos excepcionais, caso o paciente se sinta lesado com o procedimento da coleta de sangue, este poderá requerer os seus direitos de acordo com as leis vigentes no país.
- 7) Caso haja algum gasto adicional, este ocorrerá por conta do pesquisador.

Tendo ciência do exposto acima, assino abaixo.

Ribeirão Preto, ____ de _____ de _____.

Assinatura do doador

**HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO DA
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**

Campus Universitário Monte Alegre - Fone: 633-1000 - Fax: 633-1144

CEP 14048-900 RIBEIRÃO PRETO - SÃO PAULO

CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – CONTROLES

NOME DA PESQUISA: INFLUÊNCIA DA HIPERGLICEMIA SOBRE OS PADRÕES DE EXPRESSÃO GÊNICA EM LINFÓCITOS DE PACIENTES COM DIABETES MELLITUS TIPO 2, ANTES E APÓS O TRATAMENTO.

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Danilo Jordão Xavier

ENDEREÇO PARA CONTATO : Av. Bandeirantes, 3900; CEP: 14049-900

Laboratório de Citogenética e Mutagênese, Bloco G

Departamento de Genética - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP/USP).

Telefone : (16) 3602-3082

Prezado (a) doador (a),

A Diabetes Mellitus é uma doença que afeta um grande número de pessoas, tanto no Brasil quanto no restante do mundo, sendo que uma das principais características da doença é a hiperglicemia, ou seja, uma quantidade aumentada de açúcar (glicose) no sangue, acima dos níveis

normais. Neste trabalho, queremos investigar quais são os genes que possam ser responsáveis pela Diabetes ou pelas complicações e problemas que resultam das taxas elevadas de açúcar no sangue. Para isso, é preciso avaliar pacientes diabéticos antes do tratamento (com altos níveis de açúcar no sangue) e depois do tratamento (com níveis de açúcar normais).

Este tipo de estudo nos ajuda a compreender melhor esta doença tão complicada e, no futuro, junto com informações de outras pesquisas, poderá contribuir para melhora do tratamento e/ou da prevenção da doença. Para a realização desta pesquisa, é necessária a participação de pessoas que não apresentem a doença, além dos pacientes diabéticos, para podermos comparar os resultados entre diabéticos e não diabéticos.

Caso concorde em participar da pesquisa, cerca de 20 mL de seu sangue será retirado do volume de sangue doado ao hemocentro, ou seja, você não precisará doar uma quantidade maior de sangue, não havendo risco ou outra “picada” de agulha. Você não terá que realizar nenhum gasto para fazer a doação e também não será remunerado (a) pela sua contribuição. A coleta será feita pelo enfermeiro responsável pelo procedimento de coleta no Hemocentro, de modo que você receberá assistência adequada durante a coleta.

Você poderá pedir esclarecimentos sobre como o material está sendo utilizado sempre que achar necessário. Você não será identificado (a) em nenhum trabalho científico ou nas apresentações deste, sendo mesmo tendo concordado a participar, tem o direito a retirar o seu consentimento a qualquer momento. Colaborando ou não com a pesquisa, você continuará recebendo a mesma atenção, não sendo prejudicado sob hipótese alguma por causa da sua participação ou não neste trabalho. Gostaríamos ainda de esclarecer que, caso seja de nosso interesse realizar outro tipo de estudo com o material doado, você será informado (a) sobre esse novo trabalho e seu material só será utilizado com o seu consentimento.

PESQUISADOR RESPONSÁVEL

Eu, _____, RG
nº _____, abaixo assinado, tendo recebido as informações acima e ciente dos meus direitos, abaixo relacionados, concordo em participar da pesquisa.

Serão preservados os direitos do doador, conforme seguem:

- 1) A garantia de receber a resposta a qualquer pergunta ou esclarecimento a qualquer dúvida acerca dos procedimentos, riscos e benefícios e outros relacionados com a pesquisa;
- 2) A liberdade de retirar o consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo sem que isso traga algum prejuízo ou constrangimento;
- 3) A segurança de não ser identificado e que a participação terá o caráter confidencial;
- 4) Receber informação atualizada durante o estudo, ainda que esta possa afetar a vontade de continuar participando;
- 5) Não haverá a necessidade de conceder remuneração ou ressarcimento aos participantes, mas em casos excepcionais, caso o paciente se sinta lesado com o procedimento da coleta de sangue, este poderá requerer os seus direitos de acordo com as leis vigentes no país.
- 6) Caso haja algum gasto adicional, este ocorrerá por conta do pesquisador.

Tendo ciência do exposto acima, assino abaixo.

Ribeirão Preto, ____ de _____ de _____.

Assinatura do doador

ANEXO C: Genes diferencialmente expressos em pacientes DM2 compensados comparados aos controles. PFP: predição de dados falso-positivos.

Compensado versus Controle			
Genes	<i>Fold Change</i>	Valor de p	PFP
A_23_P113692	1,38	2,0E-04	3,0E-02
A_23_P135926	-1,20	1,0E-04	3,3E-02
A_23_P136961	-1,64	0,0E+00	1,9E-02
A_23_P170551	1,49	0,0E+00	4,9E-03
A_23_P17152	1,43	0,0E+00	9,9E-03
A_23_P393495	-1,31	0,0E+00	2,3E-02
A_24_P101271	1,32	0,0E+00	9,9E-03
A_24_P127042	1,48	1,0E-04	1,7E-02
A_24_P127543	1,47	0,0E+00	4,1E-03
A_24_P127661	1,42	0,0E+00	1,1E-02
A_24_P144054	1,46	0,0E+00	4,7E-03
A_24_P147849	1,25	1,0E-04	1,6E-02
A_24_P152974	-1,33	1,0E-04	3,4E-02
A_24_P204574	-1,32	1,0E-04	3,9E-02
A_24_P221475	1,48	0,0E+00	9,7E-03
A_24_P25040	1,49	0,0E+00	2,3E-03
A_24_P273074	1,48	0,0E+00	1,2E-02
A_24_P323974	1,49	1,0E-04	1,8E-02
A_24_P324074	1,43	0,0E+00	6,0E-03
A_24_P358305	1,52	1,0E-04	1,5E-02
A_24_P366465	1,51	0,0E+00	1,2E-02
A_24_P384210	1,43	0,0E+00	9,9E-03
A_24_P392271	1,43	2,0E-04	3,0E-02
A_24_P400751	1,50	0,0E+00	6,2E-03
A_24_P41540	1,44	3,0E-04	4,3E-02
A_24_P452293	-1,35	0,0E+00	2,0E-02
A_24_P466439	-1,39	1,0E-04	3,5E-02
A_24_P494658	1,48	1,0E-04	2,5E-02
A_24_P681563	1,43	0,0E+00	1,3E-02
A_24_P698816	1,42	0,0E+00	8,7E-03
A_24_P717462	1,44	1,0E-04	1,4E-02
A_24_P754989	1,52	0,0E+00	3,6E-03
A_24_P778928	1,50	0,0E+00	1,2E-02
A_24_P780353	1,39	0,0E+00	2,4E-03
A_24_P807445	1,34	1,0E-04	2,8E-02
A_24_P843552	1,44	2,0E-04	3,7E-02
A_24_P850187	1,55	0,0E+00	1,4E-03
A_24_P850336	1,57	0,0E+00	1,7E-03
A_24_P910381	1,43	0,0E+00	5,8E-03
A_24_P911746	1,48	0,0E+00	9,4E-03
A_24_P918875	-1,63	0,0E+00	2,0E-02
A_24_P920677	-1,40	0,0E+00	0,0E+00
A_24_P928250	1,74	0,0E+00	0,0E+00
A_24_P929867	-1,33	0,0E+00	1,9E-02
A_24_P930487	1,61	0,0E+00	1,5E-03
A_24_P938433	1,46	1,0E-04	1,3E-02
A_32_P160793	1,42	2,0E-04	3,9E-02
A_32_P172198	1,81	0,0E+00	0,0E+00
A_32_P1841	-1,53	1,0E-04	3,4E-02
A_32_P185089	-1,47	1,0E-04	3,7E-02
A_32_P186382	-1,19	1,0E-04	3,4E-02
A_32_P209250	1,34	1,0E-04	2,1E-02
A4GALT	-1,33	0,0E+00	1,7E-02
AA714537	1,47	1,0E-04	1,9E-02
AATK	1,41	1,0E-04	2,2E-02
ACBD5	1,40	2,0E-04	3,4E-02
ADAMTS10	-1,34	1,0E-04	3,4E-02
ADAMTS7	-1,60	0,0E+00	2,0E-02
ADRA1D	-1,62	0,0E+00	1,8E-02

AF113674	-1,29	1,0E-04	2,9E-02
AF116626	-1,65	0,0E+00	1,1E-02
AF119839	-1,33	1,0E-04	3,3E-02
AF123320	-1,28	1,0E-04	3,3E-02
AF159295	1,76	0,0E+00	2,2E-03
AF181286	-1,33	0,0E+00	1,9E-02
AF264621	1,37	2,0E-04	3,0E-02
AI382143	1,37	2,0E-04	3,8E-02
AJ276555	1,41	3,0E-04	4,1E-02
AK000992	-1,58	1,0E-04	3,3E-02
AK021715	1,32	3,0E-04	4,5E-02
AK021751	1,59	0,0E+00	0,0E+00
AK097322	-1,49	0,0E+00	1,2E-02
AK097954	1,38	2,0E-04	3,9E-02
AK126431	1,12	0,0E+00	7,5E-03
AL713714	1,44	0,0E+00	0,0E+00
ALAS2	1,29	0,0E+00	7,0E-04
ANK1	-1,43	1,0E-04	3,3E-02
ANKRD11	1,19	2,0E-04	3,8E-02
ANKRD22	1,23	1,0E-04	1,9E-02
ANXA2	1,59	0,0E+00	9,0E-04
ANXA2P3	1,28	1,0E-04	2,7E-02
APOBEC3A	1,39	1,0E-04	2,2E-02
APOL6	-1,10	1,0E-04	3,2E-02
ASPA	1,41	0,0E+00	9,9E-03
ATP2B2	-1,34	1,0E-04	3,1E-02
AW797858	-1,57	1,0E-04	3,2E-02
AY358224	1,37	1,0E-04	1,7E-02
BARHL2	-1,40	0,0E+00	7,2E-03
BC002534	-1,52	0,0E+00	2,5E-03
BC004387	-1,24	1,0E-04	3,0E-02
BC010055	-1,56	0,0E+00	2,3E-03
BC013933	-1,51	0,0E+00	1,7E-03
BC014971	1,13	3,0E-04	4,7E-02
BC029473	-1,30	1,0E-04	3,1E-02
BC030768	-1,36	1,0E-04	3,0E-02
BC031278	1,48	1,0E-04	1,3E-02
BC031342	1,49	0,0E+00	2,5E-03
BC038757	-1,43	0,0E+00	1,7E-02
BC067907	-1,35	1,0E-04	4,0E-02
BC111482	1,51	0,0E+00	9,0E-04
BCL7B	1,30	1,0E-04	2,1E-02
BE693409	1,57	0,0E+00	4,3E-03
BF436068	-1,55	1,0E-04	3,2E-02
BG001037	-1,61	1,0E-04	3,2E-02
BG182941	1,23	2,0E-04	3,6E-02
BG216262	1,33	3,0E-04	4,8E-02
BQ002790	-1,53	1,0E-04	3,0E-02
BTN2A1	1,52	0,0E+00	2,5E-03
BTNL8	1,24	2,0E-04	3,9E-02
BX096603	-1,49	2,0E-04	4,7E-02
BX119852	-1,28	1,0E-04	3,4E-02
BX427435	-2,35	0,0E+00	0,0E+00
C10orf18	1,34	3,0E-04	4,2E-02
C19orf6	1,25	1,0E-04	2,9E-02
C20orf151	-1,31	0,0E+00	1,6E-02
C22orf24	-1,34	1,0E-04	3,1E-02
C3orf45	-1,27	1,0E-04	3,1E-02
C6orf25	-1,35	1,0E-04	4,0E-02
CA1	1,16	2,0E-04	3,6E-02
CA2	-1,42	1,0E-04	3,8E-02
CACNA1E	1,47	3,0E-04	4,2E-02
CAMP	-1,19	1,0E-04	3,5E-02
CAPZA2	1,66	0,0E+00	0,0E+00
CART1	-1,26	1,0E-04	3,2E-02
CBWD5	1,40	0,0E+00	2,7E-03
CCDC108	1,63	0,0E+00	2,9E-03

CCDC112	1,42	2,0E-04	3,5E-02
CCL2	1,30	2,0E-04	3,5E-02
CCL3	1,34	0,0E+00	2,7E-03
CCL3L3	1,37	0,0E+00	2,1E-03
CD226	-1,52	2,0E-04	4,3E-02
CD46	1,50	0,0E+00	3,6E-03
CDC14A	1,36	3,0E-04	4,1E-02
CEACAM8	-1,40	0,0E+00	2,6E-03
CKLF	1,61	0,0E+00	9,0E-04
CLEC2D	1,46	1,0E-04	2,2E-02
CMIP	1,52	1,0E-04	1,5E-02
CNOT6L	-1,54	1,0E-04	3,5E-02
CNTNAP2	-1,51	0,0E+00	2,1E-02
COL3A1	-1,33	1,0E-04	3,0E-02
CPLX2	-1,35	0,0E+00	9,4E-03
CR594528	1,42	2,0E-04	3,6E-02
CR598849	-1,43	0,0E+00	1,8E-02
CR626634	1,54	0,0E+00	0,0E+00
CRCT1	1,33	0,0E+00	1,1E-02
CRYBB2	1,37	0,0E+00	1,5E-03
CV399637	2,05	0,0E+00	0,0E+00
CXCL1	1,55	0,0E+00	1,8E-03
CXCL2	1,69	0,0E+00	0,0E+00
CXCL3	1,37	1,0E-04	2,4E-02
CYorf14	1,42	0,0E+00	1,7E-03
CYorf15A	1,31	0,0E+00	2,4E-03
CYorf15B	1,66	0,0E+00	0,0E+00
DDX17	-1,60	0,0E+00	1,9E-02
DDX3Y	1,75	0,0E+00	8,4E-03
DEFA3	-1,30	0,0E+00	2,6E-02
DEFA4	-1,18	0,0E+00	2,0E-02
DIDO1	1,36	2,0E-04	3,6E-02
DIRC1	1,26	2,0E-04	3,8E-02
DKFZp667G2110	1,44	1,0E-04	2,7E-02
DKK4	-1,46	0,0E+00	2,0E-03
DUT	1,14	3,0E-04	4,1E-02
EGR1	1,36	0,0E+00	5,5E-03
EGR2	1,33	0,0E+00	9,3E-03
EIF1AY	1,60	0,0E+00	0,0E+00
ENST00000260303	-1,46	0,0E+00	1,9E-02
ENST00000262969	-1,23	1,0E-04	3,4E-02
ENST00000283964	-1,52	2,0E-04	4,4E-02
ENST00000316772	1,23	0,0E+00	1,0E-02
ENST00000332804	1,31	0,0E+00	9,3E-03
ENST00000339425	1,39	1,0E-04	1,3E-02
ENST00000371310	-1,31	0,0E+00	2,6E-02
ENST00000376881	1,24	2,0E-04	3,3E-02
ENST00000389400	1,44	2,0E-04	3,6E-02
ERAF	1,21	0,0E+00	1,2E-02
ERG	1,47	1,0E-04	1,6E-02
ESAM	1,32	2,0E-04	3,2E-02
ETV7	1,43	0,0E+00	4,1E-03
FAM55A	-1,35	0,0E+00	1,9E-02
FANCC	-1,35	0,0E+00	2,0E-02
FBXL17	1,28	3,0E-04	4,1E-02
FFAR2	1,37	1,0E-04	2,5E-02
FGF5	1,49	0,0E+00	3,9E-03
FGFR1	1,25	0,0E+00	4,2E-03
FKSG2	1,57	0,0E+00	2,3E-03
FLJ22596	-1,32	2,0E-04	4,5E-02
FLJ22659	1,41	2,0E-04	4,0E-02
FREM1	-1,22	2,0E-04	4,4E-02
FRMD4A	1,45	1,0E-04	1,3E-02
FSCN3	1,59	0,0E+00	9,8E-03
FTCD	-1,37	1,0E-04	3,7E-02
G0S2	1,86	0,0E+00	0,0E+00
GABARAPL3	1,44	2,0E-04	3,6E-02

GALNT3	1,48	0,0E+00	6,9E-03
GDNF	1,45	0,0E+00	1,8E-03
GFAP	1,36	0,0E+00	7,3E-03
GFRA2	-1,68	0,0E+00	6,2E-03
GIPR	-1,59	1,0E-04	3,3E-02
GNGT1	1,34	2,0E-04	3,4E-02
GPR12	-1,48	1,0E-04	3,4E-02
GPR98	1,55	0,0E+00	7,6E-03
GSG1L	-1,32	1,0E-04	3,4E-02
GSTT1	1,20	3,0E-04	4,9E-02
H62159	-1,34	0,0E+00	2,1E-02
HBA2	-1,32	1,0E-04	3,9E-02
HBD	1,01	1,0E-04	2,6E-02
HBG1	1,11	0,0E+00	3,9E-03
HEPH	-1,39	2,0E-04	4,8E-02
HEY2	-1,46	0,0E+00	0,0E+00
HIST1H4E	-1,63	0,0E+00	2,4E-02
HLA-DOB	-1,37	1,0E-04	3,4E-02
HLA-DQA1	-1,31	0,0E+00	5,9E-03
HLA-DQA2	1,02	0,0E+00	8,6E-03
HLA-DQB1	1,28	0,0E+00	1,7E-03
HLA-DRB6	1,26	0,0E+00	1,1E-02
HPSE	1,48	0,0E+00	4,2E-03
HRASLS5	1,46	1,0E-04	1,5E-02
HSPC268	1,34	1,0E-04	2,8E-02
ICMT	1,31	1,0E-04	2,2E-02
ID4	-1,28	2,0E-04	4,4E-02
IGFBP5	-1,33	0,0E+00	2,1E-02
IGH@	-1,12	2,0E-04	4,8E-02
IL20	-1,41	1,0E-04	3,3E-02
IL21	-1,48	0,0E+00	1,0E-02
IL27	1,46	0,0E+00	1,4E-03
IL8	1,72	0,0E+00	0,0E+00
ITGB3	-1,32	1,0E-04	2,9E-02
JAKMIP1	1,38	2,0E-04	3,6E-02
JAM3	-1,52	0,0E+00	1,4E-02
JARID1D	1,39	0,0E+00	0,0E+00
KBTBD5	-1,20	0,0E+00	2,1E-02
KCNG1	-1,38	1,0E-04	3,0E-02
KCNJ15	1,38	3,0E-04	4,2E-02
KCNQ1DN	-1,22	1,0E-04	3,1E-02
KDR	-1,49	0,0E+00	1,0E-03
KIAA2002	-1,39	2,0E-04	4,4E-02
KLF17	-1,30	1,0E-04	4,0E-02
KLF6	1,83	0,0E+00	0,0E+00
KLRC2	-1,18	0,0E+00	2,5E-02
KRAS	1,43	1,0E-04	1,7E-02
KRT1	-1,15	0,0E+00	6,2E-03
KRT77	-1,28	1,0E-04	3,1E-02
L1CAM	-1,16	1,0E-04	2,8E-02
LILRB1	1,33	0,0E+00	1,3E-02
LOC165186	1,53	0,0E+00	2,3E-03
LOC286359	-1,28	1,0E-04	4,0E-02
LOC338864	-1,35	1,0E-04	3,1E-02
LOC339352	1,55	1,0E-04	1,5E-02
LOC342979	-1,32	0,0E+00	9,7E-03
LOC343495	1,44	1,0E-04	1,9E-02
LOC344741	1,63	0,0E+00	7,9E-03
LOC388532	1,55	0,0E+00	5,5E-03
LOC389607	-1,47	1,0E-04	3,5E-02
LOC391387	1,48	0,0E+00	1,4E-03
LOC401233	1,01	1,0E-04	1,6E-02
LOC402562	1,34	1,0E-04	2,5E-02
LOC440345	-1,57	2,0E-04	4,9E-02
LOC441774	2,11	0,0E+00	0,0E+00
LOC51152	-1,42	2,0E-04	4,0E-02
LOC643143	-1,44	2,0E-04	4,8E-02

LOC644540	1,41	2,0E-04	3,9E-02
LOC644974	-1,52	1,0E-04	2,9E-02
LOC645326	1,23	3,0E-04	4,2E-02
LOC648794	1,41	2,0E-04	3,5E-02
LOC649058	1,21	0,0E+00	4,1E-03
LOC649228	1,43	0,0E+00	8,3E-03
LOC652863	1,56	0,0E+00	2,4E-03
LOC653071	1,32	0,0E+00	4,6E-03
LOC653483	1,58	0,0E+00	0,0E+00
LOC729684	1,66	0,0E+00	1,3E-03
LOC729956	1,45	3,0E-04	4,7E-02
LOC730174	1,51	0,0E+00	5,2E-03
LOC730452	1,46	0,0E+00	6,1E-03
LOC731190	1,40	1,0E-04	1,8E-02
LRP5L	1,42	0,0E+00	4,6E-03
LRRC14	1,31	0,0E+00	5,4E-03
LRRN3	-1,52	0,0E+00	2,1E-02
LTF	-1,22	0,0E+00	2,1E-02
MAB21L2	1,43	0,0E+00	1,2E-03
MAGI1	1,33	3,0E-04	4,5E-02
MALAT1	-1,57	1,0E-04	3,9E-02
MAN2A1	1,54	0,0E+00	4,0E-03
MASP1	1,19	2,0E-04	3,7E-02
MBNL1	-1,53	1,0E-04	4,0E-02
MCAT	1,26	0,0E+00	6,2E-03
MDGA1	-1,48	0,0E+00	0,0E+00
MGC10334	-1,71	0,0E+00	3,0E-03
MIA2	-1,22	1,0E-04	3,4E-02
MXRA8	-1,36	0,0E+00	2,1E-02
MYEOV2	-1,22	1,0E-04	4,0E-02
MYL4	-1,32	0,0E+00	8,6E-03
MYL9	-1,35	1,0E-04	3,1E-02
MYOM2	1,23	0,0E+00	1,3E-03
NFE2L1	2,20	0,0E+00	0,0E+00
NLF1	1,43	2,0E-04	3,6E-02
NNAT	-1,27	1,0E-04	3,9E-02
NP111770	-1,20	1,0E-04	2,9E-02
NRN1	-1,25	1,0E-04	3,5E-02
NYD-SP18	-1,34	0,0E+00	1,9E-02
OLAH	-1,28	2,0E-04	4,4E-02
OLFM4	1,06	0,0E+00	9,2E-03
PARP4	1,50	0,0E+00	6,4E-03
PAX6	-1,28	1,0E-04	3,4E-02
PCMTD1	1,54	0,0E+00	9,9E-03
PDE1C	-1,34	0,0E+00	1,9E-02
PLEKHA6	-1,58	0,0E+00	0,0E+00
PRSS36	1,60	0,0E+00	0,0E+00
PSPH	-1,19	5,0E-05	1,9E-02
PTGS2	1,49	0,0E+00	4,3E-03
PTX3	1,33	2,0E-04	3,7E-02
PYY2	-1,65	0,0E+00	2,0E-02
RAB32	1,42	1,0E-04	1,8E-02
REEP3	1,55	0,0E+00	1,8E-03
REST	-1,33	1,0E-04	3,7E-02
RGS1	1,31	1,0E-04	1,6E-02
RGS7BP	-1,42	2,0E-04	5,0E-02
RIMS2	1,26	1,0E-04	2,4E-02
RNF166	1,49	0,0E+00	1,8E-03
RNF180	-1,35	0,0E+00	1,9E-02
RP5-1022P6,2	1,23	2,0E-04	3,6E-02
RPL24	1,54	0,0E+00	3,3E-03
RPL32P3	1,24	2,0E-04	3,0E-02
RPL9	1,38	1,0E-04	2,2E-02
RPN1	1,48	0,0E+00	4,1E-03
RPS4Y1	2,01	0,0E+00	7,0E-04
RPS4Y2	2,17	0,0E+00	4,2E-03
RSPO2	1,47	0,0E+00	0,0E+00

S100A7A	1,38	1,0E-04	2,8E-02
SAMD10	1,40	1,0E-04	1,9E-02
SCRT2	1,65	0,0E+00	2,2E-03
SEC31A	1,58	0,0E+00	9,0E-04
SELE	-1,38	1,0E-04	3,4E-02
SELENBP1	1,23	0,0E+00	4,1E-03
SEMA3D	-1,35	1,0E-04	3,0E-02
SET	1,42	1,0E-04	1,3E-02
SF3A1	1,42	0,0E+00	4,7E-03
SFN	-1,57	1,0E-04	3,7E-02
SHOX2	-1,32	2,0E-04	4,8E-02
SLC23A3	-1,41	0,0E+00	8,5E-03
SLC26A1	1,43	1,0E-04	1,4E-02
SLC6A17	-1,34	1,0E-04	3,2E-02
SLC6A19	1,50	0,0E+00	7,5E-03
SMCHD1	1,43	0,0E+00	4,7E-03
SP5	1,39	2,0E-04	3,8E-02
SPP1	1,42	2,0E-04	3,6E-02
SPRN	-1,40	2,0E-04	4,3E-02
SURF4	1,64	0,0E+00	0,0E+00
SYNGR4	1,44	3,0E-04	4,4E-02
TAF9B	1,50	0,0E+00	8,0E-03
TBX1	-1,63	0,0E+00	2,5E-03
TBX3	-1,12	0,0E+00	6,9E-03
tcag7,1239	1,48	1,0E-04	2,3E-02
TCEAL7	-1,37	1,0E-04	2,3E-02
TCL1A	-1,31	2,0E-04	4,7E-02
THBS2	1,69	0,0E+00	0,0E+00
THC2474831	1,68	0,0E+00	0,0E+00
THC2512545	1,70	0,0E+00	1,0E-03
THC2529957	-1,35	1,0E-04	3,5E-02
THC2533996	1,45	0,0E+00	1,2E-02
THC2534144	-1,54	2,0E-04	4,4E-02
THC2541839	1,12	1,0E-04	2,0E-02
THC2563238	1,36	2,0E-04	3,4E-02
THC2572360	1,52	0,0E+00	3,0E-04
THC2577566	1,51	0,0E+00	8,6E-03
THC2585201	2,08	0,0E+00	0,0E+00
THC2594845	1,37	1,0E-04	1,3E-02
THC2598362	-1,53	0,0E+00	2,0E-02
THC2626445	-1,34	0,0E+00	2,6E-02
THC2639372	1,41	3,0E-04	4,1E-02
THC2648739	-1,40	2,0E-04	4,4E-02
THC2655508	1,34	0,0E+00	1,8E-03
THC2673830	-1,37	1,0E-04	3,2E-02
THC2676656	-1,29	1,0E-04	3,1E-02
THC2695821	-1,37	0,0E+00	1,8E-02
THC2696211	-1,57	0,0E+00	0,0E+00
THC2698892	-1,36	0,0E+00	2,1E-02
THC2719403	-1,48	1,0E-04	3,1E-02
THC2728305	-1,57	2,0E-04	4,5E-02
THC2737361	1,68	0,0E+00	3,8E-03
THC2739443	1,35	0,0E+00	2,5E-03
THC2747806	-1,41	1,0E-04	3,8E-02
THPO	-1,33	1,0E-04	3,4E-02
TMEM16H	1,38	2,0E-04	3,8E-02
TMEM176A	-1,27	0,0E+00	1,5E-03
TMEM176B	-1,48	0,0E+00	0,0E+00
TMEM95	-1,50	2,0E-04	4,8E-02
TMSB4X	1,39	2,0E-04	3,5E-02
TMTC1	1,20	2,0E-04	2,9E-02
TNFAIP8L3	-1,41	0,0E+00	1,9E-02
TNN	-1,27	1,0E-04	3,8E-02
TNNT1	1,44	0,0E+00	1,5E-03
TNT	-1,42	1,0E-04	3,1E-02
TPM1	1,49	0,0E+00	1,4E-03
TRAF7	1,50	0,0E+00	1,4E-03

TRIM14	1,38	0,0E+00	1,1E-02
TRIM29	1,40	2,0E-04	3,5E-02
TTY15	1,42	0,0E+00	0,0E+00
UCP3	-1,53	1,0E-04	3,2E-02
UGT2A3	1,37	2,0E-04	3,3E-02
UTS2	-1,02	1,0E-04	2,7E-02
UTY	1,44	0,0E+00	1,7E-03
VCX2	-1,22	1,0E-04	3,1E-02
VPS29	1,47	0,0E+00	3,5E-03
WASF3	1,27	1,0E-04	2,4E-02
XIST	-2,74	0,0E+00	1,0E-03
XPO6	1,42	1,0E-04	2,6E-02
ZBED5	1,39	0,0E+00	9,7E-03
ZC3H7B	1,33	2,0E-04	4,0E-02
ZFY	1,16	0,0E+00	4,1E-03
ZNF319	1,36	3,0E-04	4,7E-02
ZNF429	-1,37	1,0E-04	3,2E-02
ZNF467	1,57	0,0E+00	2,3E-03
ZNF501	-1,40	0,0E+00	2,1E-02
ZNF516	1,31	1,0E-04	1,7E-02
ZNF683	1,31	0,0E+00	4,7E-03

ANEXO D: Genes diferencialmente expressos em pacientes DM2 descompensados comparados aos controles. PFP: predição de dados falso-positivos.

Descompensado versus Controle			
Genes	Fold Change	Valor de p	PFP
A_23_P136961	-1,67	0,0E+00	1,4E-02
A_23_P17152	1,41	0,0E+00	1,3E-02
A_24_P101271	1,41	0,0E+00	3,3E-03
A_24_P118382	1,43	2,0E-04	4,4E-02
A_24_P127042	1,45	1,0E-04	2,8E-02
A_24_P127543	1,57	0,0E+00	2,2E-03
A_24_P127661	1,51	0,0E+00	2,9E-03
A_24_P144054	1,49	0,0E+00	3,9E-03
A_24_P204257	1,46	1,0E-04	2,3E-02
A_24_P221475	1,53	0,0E+00	1,1E-02
A_24_P25040	1,61	0,0E+00	8,0E-04
A_24_P255763	1,42	1,0E-04	3,1E-02
A_24_P272735	1,32	2,0E-04	3,4E-02
A_24_P273074	1,60	0,0E+00	6,9E-03
A_24_P323974	1,50	1,0E-04	2,3E-02
A_24_P324074	1,36	1,0E-04	2,8E-02
A_24_P366465	1,61	0,0E+00	7,4E-03
A_24_P384210	1,42	1,0E-04	2,3E-02
A_24_P392271	1,59	0,0E+00	3,3E-03
A_24_P392947	1,29	2,0E-04	3,4E-02
A_24_P400751	1,64	0,0E+00	1,9E-03
A_24_P401663	1,47	2,0E-04	4,4E-02
A_24_P452175	1,33	1,0E-04	2,8E-02
A_24_P494658	1,54	1,0E-04	1,9E-02
A_24_P521662	1,38	2,0E-04	4,1E-02
A_24_P681563	1,47	0,0E+00	1,0E-02
A_24_P698816	1,55	0,0E+00	2,7E-03
A_24_P717462	1,56	0,0E+00	3,2E-03
A_24_P754989	1,53	0,0E+00	3,4E-03
A_24_P778928	1,48	1,0E-04	2,4E-02
A_24_P780353	1,47	0,0E+00	6,0E-04

A_24_P807445	1,42	0,0E+00	1,6E-02
A_24_P843552	1,47	1,0E-04	2,8E-02
A_24_P850187	1,65	0,0E+00	6,0E-04
A_24_P850336	1,53	0,0E+00	2,5E-03
A_24_P918875	-1,62	0,0E+00	2,4E-02
A_24_P920677	-1,13	1,0E-04	1,8E-02
A_24_P928250	1,75	0,0E+00	8,0E-04
A_24_P930487	1,69	0,0E+00	4,0E-04
A_32_P134679	-1,44	0,0E+00	1,7E-02
A_32_P172198	1,93	0,0E+00	1,0E-03
A_32_P186382	-1,12	1,0E-04	4,1E-02
A_32_P209250	-1,25	1,0E-04	3,6E-02
AA714537	1,47	1,0E-04	2,5E-02
ADRA1D	-1,92	0,0E+00	1,2E-03
AF159295	1,87	0,0E+00	6,0E-04
AK021715	1,32	1,0E-04	2,8E-02
AK021751	1,71	0,0E+00	7,0E-04
AK024173	1,33	1,0E-04	2,2E-02
AK097322	-1,49	0,0E+00	2,0E-02
AK126431	-1,57	0,0E+00	0,0E+00
AL713714	-1,21	0,0E+00	4,3E-03
ALAS2	1,17	0,0E+00	3,0E-03
ANKDD1A	1,46	1,0E-04	2,1E-02
ANKRD11	1,25	1,0E-04	2,3E-02
ANXA2	1,42	0,0E+00	1,6E-02
APOL6	1,24	0,0E+00	1,1E-02
ARTS-1	1,40	0,0E+00	8,5E-03
BC013933	1,00	2,0E-04	4,5E-02
BC029473	-1,40	0,0E+00	2,5E-02
BC031278	1,40	1,0E-04	3,0E-02
BC031342	1,40	0,0E+00	1,0E-02
BC037919	1,12	1,0E-04	2,2E-02
BC111482	1,23	1,0E-04	2,0E-02
BE646426	1,49	2,0E-04	3,4E-02
BPI	1,23	0,0E+00	1,6E-02
BTN2A1	1,56	0,0E+00	2,3E-03
BTNL3	1,27	0,0E+00	4,0E-03
BX427435	-2,06	0,0E+00	0,0E+00
C19orf33	-1,23	1,0E-04	3,5E-02
C19orf6	1,25	2,0E-04	4,4E-02
C6orf25	-1,50	0,0E+00	2,5E-02
C6orf85	1,43	1,0E-04	3,0E-02
CA2	-1,46	1,0E-04	4,3E-02
CACNA1E	1,50	2,0E-04	3,5E-02
CAMP	1,05	2,0E-04	4,5E-02
CAPZA2	1,56	0,0E+00	2,2E-03
CBWD5	1,29	1,0E-04	1,9E-02
CCDC108	1,81	0,0E+00	7,0E-04
CCL3L3	1,26	1,0E-04	2,4E-02
CCR6	1,49	0,0E+00	3,2E-03
CEACAM6	1,24	0,0E+00	7,3E-03
CEACAM8	1,00	1,0E-04	3,0E-02
CENPK	1,36	1,0E-04	2,7E-02
CKLF	1,29	1,0E-04	3,0E-02
CMIP	1,56	0,0E+00	1,4E-02
COL17A1	1,37	2,0E-04	4,4E-02
CR594528	1,51	0,0E+00	1,2E-02
CR604283	1,42	2,0E-04	3,4E-02
CR625615	-1,20	0,0E+00	2,4E-02
CR626634	1,86	0,0E+00	0,0E+00
CRCT1	1,45	0,0E+00	5,1E-03
CROP	1,25	1,0E-04	2,6E-02
CRYBB2	-1,12	1,0E-04	3,5E-02
CTSG	1,44	0,0E+00	1,4E-03
CV399637	1,95	0,0E+00	5,0E-04
CXCL1	1,15	1,0E-04	2,9E-02
CYorf15A	-1,15	0,0E+00	1,8E-02

CYorf15B	-1,11	0,0E+00	1,8E-02
DDX3Y	-1,40	0,0E+00	2,0E-03
DEFA3	1,12	1,0E-04	1,9E-02
DEFA4	1,33	0,0E+00	5,0E-04
DHFR	1,36	1,0E-04	1,9E-02
DIRC1	1,49	0,0E+00	4,0E-03
DUT	1,15	2,0E-04	3,4E-02
EIF1AY	-1,03	5,0E-05	2,1E-02
ENST00000299756	-1,31	0,0E+00	2,4E-02
ENST00000322032	1,23	2,0E-04	4,0E-02
ENST00000327591	-1,25	1,0E-04	4,1E-02
ENST00000332804	1,36	0,0E+00	5,3E-03
ENST00000339425	-1,19	0,0E+00	3,1E-02
ENST00000389400	1,46	1,0E-04	2,3E-02
FAM84B	1,38	1,0E-04	2,3E-02
FANCC	-1,50	0,0E+00	3,7E-03
FGFR1	1,30	0,0E+00	2,3E-03
FKSG2	1,61	0,0E+00	2,9E-03
FLJ10781	1,27	2,0E-04	4,3E-02
FOXC1	1,32	1,0E-04	2,8E-02
FOXE1	1,38	2,0E-04	3,3E-02
FRMD4A	1,49	0,0E+00	1,1E-02
G0S2	1,07	0,0E+00	1,1E-02
GABRA3	1,40	2,0E-04	4,2E-02
GALNT3	1,35	3,0E-04	4,8E-02
GDNF	1,41	0,0E+00	8,5E-03
GFAP	1,62	0,0E+00	9,0E-04
GFRA2	-1,70	0,0E+00	1,0E-02
GPR12	-1,56	0,0E+00	2,4E-02
GPR78	1,47	2,0E-04	4,1E-02
GPT	1,27	2,0E-04	3,4E-02
HBA2	-1,34	0,0E+00	2,0E-02
HBD	-1,07	1,0E-04	3,4E-02
HBG1	1,21	0,0E+00	2,4E-03
HEY2	1,00	3,0E-04	4,9E-02
HIST1H3D	-1,76	0,0E+00	6,0E-03
HIST1H4E	-1,61	0,0E+00	3,0E-02
HLA-DQA1	1,14	0,0E+00	0,0E+00
HLA-DQA2	1,18	5,0E-05	1,6E-02
HNRPA1	1,42	1,0E-04	2,3E-02
HP	1,27	0,0E+00	1,2E-02
HPR	1,37	0,0E+00	1,1E-02
HSPC268	1,31	1,0E-04	3,1E-02
ICMT	1,27	2,0E-04	3,7E-02
IL27	1,77	0,0E+00	9,0E-04
IL8	1,17	0,0E+00	6,8E-03
ITGB3	-1,43	0,0E+00	3,0E-02
JAM3	-1,55	0,0E+00	2,5E-02
JARID1D	-1,15	1,0E-04	2,0E-02
KBTBD5	1,31	0,0E+00	1,3E-03
KCNQ1DN	-1,17	0,0E+00	3,1E-02
KDR	1,06	2,0E-04	3,5E-02
KLF6	1,60	0,0E+00	8,0E-04
KLK3	1,49	1,0E-04	3,2E-02
KLRC2	1,20	2,0E-04	4,2E-02
KRT1	1,12	0,0E+00	3,0E-03
KRT72	1,11	1,0E-04	1,8E-02
KRTAP5-8	1,20	2,0E-04	4,3E-02
L1CAM	-1,01	1,0E-04	4,6E-02
LOC120364	1,45	1,0E-04	3,1E-02
LOC165186	1,34	1,0E-04	3,1E-02
LOC339352	1,52	2,0E-04	3,7E-02
LOC343495	1,47	1,0E-04	1,9E-02
LOC344741	1,44	2,0E-04	3,6E-02
LOC388532	1,63	0,0E+00	2,2E-03
LOC389607	-1,68	0,0E+00	6,5E-03
LOC391387	1,65	0,0E+00	6,0E-04

LOC401233	1,08	1,0E-04	1,9E-02
LOC402562	1,44	0,0E+00	8,5E-03
LOC440396	1,46	1,0E-04	2,0E-02
LOC441245	1,34	0,0E+00	4,1E-03
LOC441377	-1,36	0,0E+00	3,1E-02
LOC441774	-1,21	0,0E+00	6,9E-03
LOC645326	1,28	0,0E+00	1,2E-02
LOC645412	1,34	3,0E-04	5,0E-02
LOC646446	1,37	1,0E-04	2,8E-02
LOC646753	-1,37	0,0E+00	2,4E-02
LOC648794	1,44	1,0E-04	2,6E-02
LOC649058	1,22	0,0E+00	5,1E-03
LOC649228	1,51	0,0E+00	4,0E-03
LOC652863	1,53	0,0E+00	3,9E-03
LOC653071	1,37	1,0E-04	2,3E-02
LOC653483	2,05	0,0E+00	0,0E+00
LOC728550	1,49	0,0E+00	6,0E-03
LOC729684	1,64	0,0E+00	1,1E-03
LOC729956	1,49	1,0E-04	3,0E-02
LOC730174	1,50	0,0E+00	8,3E-03
LOC730259	-1,15	0,0E+00	3,1E-02
LOC730452	1,35	1,0E-04	3,2E-02
LRP5L	1,41	0,0E+00	5,4E-03
LRRC14	1,35	1,0E-04	1,9E-02
LRRC2	1,20	1,0E-04	2,3E-02
LTF	1,08	1,0E-04	2,0E-02
MAB21L2	1,56	0,0E+00	6,0E-04
MALAT1	-1,70	0,0E+00	1,5E-02
MAN2A1	1,46	0,0E+00	1,6E-02
MARS	1,37	2,0E-04	3,8E-02
MCAT	1,60	0,0E+00	5,0E-04
MDGA1	1,11	0,0E+00	3,5E-03
MGC10334	-1,52	0,0E+00	3,0E-02
MGC26718	-1,40	0,0E+00	6,4E-03
MGC70863	-1,35	0,0E+00	1,9E-02
MIA2	-1,16	0,0E+00	3,2E-02
MSX1	1,40	0,0E+00	7,8E-03
MYL4	-1,43	0,0E+00	2,0E-03
MYL9	-1,44	0,0E+00	3,1E-02
MYOM2	1,71	0,0E+00	0,0E+00
NFE2L1	2,20	0,0E+00	1,1E-03
OLFM4	1,50	0,0E+00	0,0E+00
PARP4	1,39	3,0E-04	4,9E-02
PF4V1	1,16	2,0E-04	3,6E-02
PLEKHA6	1,08	0,0E+00	1,5E-02
PLEKHG4	1,29	1,0E-04	2,8E-02
POFUT1	1,22	1,0E-04	2,8E-02
PRSS36	2,09	0,0E+00	0,0E+00
PSPH	-1,30	5,0E-05	2,2E-02
PYY2	-1,70	0,0E+00	9,6E-03
RBM24	1,27	1,0E-04	2,9E-02
REEP3	1,33	1,0E-04	2,1E-02
RNF166	1,42	0,0E+00	3,4E-03
RP11-78J21,1	1,40	1,0E-04	2,6E-02
RPL14	1,35	2,0E-04	4,2E-02
RPL24	1,59	0,0E+00	2,1E-03
RPL32P3	1,25	1,0E-04	2,3E-02
RPL9	1,40	1,0E-04	2,1E-02
RPN1	1,41	0,0E+00	1,4E-02
RPS26	-1,34	0,0E+00	3,1E-02
RPS4Y1	-1,34	0,0E+00	3,5E-04
RPS4Y2	-1,35	0,0E+00	3,5E-04
S100A5	-1,53	1,0E-04	3,7E-02
S100B	1,19	0,0E+00	1,5E-02
SAMD10	1,47	0,0E+00	8,2E-03
SCRT2	1,72	0,0E+00	1,3E-03
SEC31A	1,48	0,0E+00	2,4E-03

SELENBP1	1,16	0,0E+00	7,7E-03
SET	1,45	0,0E+00	1,3E-02
SF3A1	1,44	0,0E+00	3,9E-03
SLC23A3	1,05	2,0E-04	4,1E-02
SLC38A2	-1,62	1,0E-04	3,5E-02
SLC6A19	1,40	1,0E-04	3,1E-02
SMG1	1,31	2,0E-04	3,5E-02
SURF4	1,60	0,0E+00	5,0E-04
SYNGR4	1,53	2,0E-04	3,6E-02
TAF9B	1,46	0,0E+00	1,5E-02
TBCD	1,41	1,0E-04	3,1E-02
TBX1	-1,71	0,0E+00	2,5E-03
TBX3	-1,09	0,0E+00	2,4E-02
tcag7,1239	1,51	1,0E-04	2,1E-02
THBS2	1,27	2,0E-04	4,4E-02
THC2474831	2,04	0,0E+00	0,0E+00
THC2503530	1,52	1,0E-04	1,8E-02
THC2505910	1,42	1,0E-04	1,8E-02
THC2512545	1,69	0,0E+00	6,0E-04
THC2533996	1,47	0,0E+00	8,5E-03
THC2536227	1,29	2,0E-04	3,6E-02
THC2565422	1,42	1,0E-04	2,7E-02
THC2572360	1,62	0,0E+00	8,0E-04
THC2585201	2,03	0,0E+00	7,0E-04
THC2638839	1,31	2,0E-04	3,7E-02
THC2655508	1,65	0,0E+00	8,0E-04
THC2674391	1,34	2,0E-04	3,4E-02
THC2696211	-1,03	0,0E+00	2,4E-03
THC2698892	1,22	2,0E-04	3,7E-02
THC2737361	1,49	2,0E-04	3,7E-02
THC2739443	1,49	0,0E+00	1,2E-03
TMC6	1,42	0,0E+00	1,2E-02
TMEFF2	1,45	2,0E-04	3,8E-02
TMEM176A	-1,11	1,0E-04	4,5E-02
TMEM176B	-1,25	0,0E+00	6,2E-03
TMEM95	-1,72	0,0E+00	1,4E-02
TNFRSF17	1,41	0,0E+00	7,4E-03
TNNT1	1,22	0,0E+00	5,1E-03
TNT	1,19	2,0E-04	4,4E-02
TPM1	1,30	0,0E+00	8,8E-03
TRAF7	1,50	0,0E+00	6,0E-04
TRIM14	1,34	1,0E-04	1,9E-02
TRUB1	1,44	1,0E-04	2,8E-02
U77706	-1,50	0,0E+00	1,4E-02
UCP3	-1,54	1,0E-04	3,7E-02
UTS2	-1,60	0,0E+00	1,4E-03
VGLL3	1,40	1,0E-04	1,9E-02
VPS29	1,41	0,0E+00	8,3E-03
XIST	1,47	0,0E+00	7,5E-04
ZBED5	1,40	0,0E+00	8,3E-03
ZC3H5	1,33	2,0E-04	4,0E-02
ZFY	-1,15	0,0E+00	1,5E-02
ZNF467	1,46	0,0E+00	1,1E-02

ANEXO E: Genes diferencialmente expressos em pacientes DM2 descompensados comparados aos compensados. PFP: predição de dados falso-positivos.

Descompensado versus Compensado			
Genes	<i>Fold Change</i>	Valor de p	PFP
A_23_P113692	-1,36	1,0E-04	2,8E-02
A_23_P158868	1,34	0,0E+00	1,4E-02
A_23_P170551	-1,28	1,0E-04	2,0E-02
A_24_P110172	-1,49	0,0E+00	9,3E-03
A_24_P112542	1,20	1,0E-04	3,2E-02
A_24_P147849	-1,08	3,0E-04	4,1E-02
A_24_P323298	1,41	1,0E-04	1,9E-02
A_24_P502724	1,46	0,0E+00	1,3E-02
A_24_P522399	-1,30	1,0E-04	2,0E-02
A_24_P565390	1,37	0,0E+00	5,0E-03
A_24_P585198	-1,62	0,0E+00	1,1E-03
A_24_P770746	1,55	0,0E+00	1,6E-02
A_24_P911746	-1,57	0,0E+00	9,0E-04
A_24_P913198	-1,47	1,0E-04	1,5E-02
A_24_P913391	-1,40	0,0E+00	1,4E-02
A_24_P915117	-1,43	1,0E-04	2,1E-02
A_24_P919629	-1,43	4,0E-04	4,9E-02
A_24_P922726	-1,47	1,0E-04	1,5E-02
A_24_P924118	-1,35	2,0E-04	2,9E-02
A_24_P928133	1,61	0,0E+00	1,6E-03
A_24_P930237	-1,40	1,0E-04	1,6E-02
A_24_P938433	-1,45	0,0E+00	2,2E-03
A_32_P103966	-1,17	3,0E-04	4,1E-02
A_32_P209250	-1,68	0,0E+00	0,0E+00
A_32_P212598	1,28	2,0E-04	3,6E-02
A_32_P3221	1,39	0,0E+00	1,3E-02
AA601031	1,17	1,0E-04	2,9E-02
AA703521	-1,40	3,0E-04	4,7E-02
ADAMTS12	-1,42	1,0E-04	1,7E-02
ADAMTS20	1,50	0,0E+00	1,3E-02
ADM	-1,43	0,0E+00	1,4E-02
AF050199	-1,39	0,0E+00	1,1E-02
AF086187	1,33	2,0E-04	4,4E-02
AF116651	-1,54	0,0E+00	6,4E-03
AF118086	1,51	0,0E+00	1,4E-02
AF119887	-1,40	0,0E+00	1,4E-02
AF231918	-1,48	0,0E+00	1,0E-02
AF264621	-1,47	0,0E+00	9,4E-03
AF268194	-1,54	0,0E+00	7,0E-03
AF274944	-1,40	3,0E-04	4,1E-02
AF314543	-1,54	0,0E+00	7,7E-03
AF332145	1,30	2,0E-04	4,6E-02
AF343666	1,34	0,0E+00	1,3E-02
AI051572	-1,38	2,0E-04	3,4E-02
AI248320	-1,37	2,0E-04	3,8E-02
AI382143	-1,53	0,0E+00	4,3E-03
AJ252276	1,43	0,0E+00	1,8E-02
AK021785	-1,43	0,0E+00	5,8E-03
AK022024	-1,55	0,0E+00	4,3E-03
AK025225	-1,37	3,0E-04	4,1E-02
AK027383	-1,24	4,0E-04	4,8E-02
AK057884	-1,36	1,0E-04	2,8E-02
AK093002	-1,30	3,0E-04	4,7E-02
AK097954	-1,43	1,0E-04	1,5E-02
AK126431	-1,76	0,0E+00	0,0E+00
AK128099	1,43	2,0E-04	3,9E-02
AL038125	-1,37	1,0E-04	1,8E-02
AL109704	-1,39	2,0E-04	3,7E-02
AL713714	-1,73	0,0E+00	0,0E+00

ALAS2	-1,11	0,0E+00	4,7E-03
ALF	1,32	2,0E-04	3,8E-02
AMPH	-1,39	0,0E+00	1,2E-02
ANK1	1,42	0,0E+00	9,3E-03
ANKRD20A2	-1,36	0,0E+00	1,2E-02
ANKRD22	-1,38	0,0E+00	1,1E-02
ANXA3	-1,15	1,0E-04	2,4E-02
APOD	-1,38	2,0E-04	3,2E-02
APOL6	1,37	0,0E+00	1,7E-03
AQP9	-1,35	2,0E-04	3,8E-02
ARG1	1,10	2,0E-04	3,6E-02
ARHGEF4	1,34	1,0E-04	2,8E-02
ASPA	-1,44	0,0E+00	1,1E-02
ATF3	-1,39	1,0E-04	2,0E-02
ATP1A4	-1,46	0,0E+00	1,4E-02
ATRNL1	-1,41	2,0E-04	3,1E-02
AU148142	-1,51	0,0E+00	7,4E-03
AW136683	1,17	1,0E-04	3,4E-02
AY010113	-1,08	3,0E-04	4,3E-02
AY358224	-1,55	0,0E+00	4,3E-03
B4GALNT3	1,20	2,0E-04	3,6E-02
BARHL2	1,37	1,0E-04	2,4E-02
BC002534	1,60	0,0E+00	5,8E-03
BC008476	1,47	1,0E-04	2,4E-02
BC010055	1,72	0,0E+00	1,9E-03
BC013933	1,51	0,0E+00	5,7E-03
BC014971	-1,13	1,0E-04	1,9E-02
BC015876	-1,38	3,0E-04	4,8E-02
BC015977	-1,39	2,0E-04	3,7E-02
BC016022	-1,32	0,0E+00	1,2E-02
BC021741	1,16	1,0E-04	1,9E-02
BC030813	1,25	1,0E-04	3,2E-02
BC037919	1,17	0,0E+00	1,8E-02
BC038757	1,41	1,0E-04	1,9E-02
BC040150	1,37	2,0E-04	4,3E-02
BC067767	-1,34	4,0E-04	4,9E-02
BC071797	1,33	1,0E-04	2,8E-02
BE693409	-1,69	0,0E+00	0,0E+00
BM984396	-1,32	1,0E-04	1,8E-02
BNC2	1,26	0,0E+00	1,6E-02
BPI	1,23	1,0E-04	3,1E-02
BQ015182	-1,36	3,0E-04	4,1E-02
BQ428696	-1,34	3,0E-04	3,9E-02
BQ932036	-1,30	2,0E-04	3,6E-02
BTNL3	1,21	0,0E+00	4,0E-03
BTNL8	-1,36	0,0E+00	7,3E-03
BX118699	1,35	2,0E-04	3,8E-02
BX648958	-1,37	4,0E-04	4,8E-02
C10orf79	-1,41	2,0E-04	2,9E-02
C11orf16	1,31	1,0E-04	2,1E-02
C12orf39	-1,34	0,0E+00	1,0E-02
C15orf38	1,26	1,0E-04	2,8E-02
C19orf33	-1,22	0,0E+00	1,4E-02
C1orf150	-1,38	2,0E-04	3,2E-02
C1orf76	1,37	1,0E-04	3,2E-02
C1QB	-1,30	3,0E-04	4,0E-02
C20orf105	-1,40	2,0E-04	3,6E-02
C20orf133	1,40	1,0E-04	2,1E-02
C21orf15	-1,45	0,0E+00	5,5E-03
C22orf33	-1,43	0,0E+00	1,2E-02
C2orf52	1,53	0,0E+00	2,6E-03
C3orf46	1,33	2,0E-04	3,8E-02
CA1	-1,05	1,0E-04	2,5E-02
CABYR	1,35	1,0E-04	3,3E-02
CACNG6	1,26	2,0E-04	3,9E-02
CALD1	-1,24	3,0E-04	4,4E-02
CAMP	1,25	0,0E+00	5,5E-03

CB049726	-1,45	1,0E-04	1,7E-02
CCDC63	1,40	1,0E-04	3,3E-02
CCL2	-1,12	3,0E-04	4,1E-02
CCL3	-1,20	0,0E+00	1,1E-02
CCL3L3	-1,13	5,0E-05	1,4E-02
CEACAM6	1,35	5,0E-05	1,5E-02
CEACAM8	1,40	0,0E+00	1,9E-03
CLEC1B	-1,22	3,0E-04	4,1E-02
CNTNAP2	1,63	0,0E+00	0,0E+00
COL13A1	1,02	0,0E+00	9,5E-03
COL17A1	1,30	1,0E-04	1,9E-02
COQ10B	-1,40	2,0E-04	3,0E-02
CR625615	-1,18	1,0E-04	1,9E-02
CR749708	-1,43	1,0E-04	1,7E-02
CRYBB2	-1,54	0,0E+00	0,0E+00
CSF3	-1,36	1,0E-04	2,2E-02
CTSG	1,40	0,0E+00	1,5E-03
CXCL1	-1,35	0,0E+00	4,2E-03
CXCL2	-1,51	0,0E+00	0,0E+00
CXCL3	-1,51	0,0E+00	1,0E-02
CYorf14	-1,48	0,0E+00	0,0E+00
CYorf15A	-1,51	0,0E+00	0,0E+00
CYorf15B	-1,93	0,0E+00	0,0E+00
CYP11B2	-1,37	3,0E-04	4,4E-02
DACH2	1,32	1,0E-04	3,2E-02
DB090170	-1,37	1,0E-04	2,4E-02
DDX3Y	-2,45	0,0E+00	1,2E-02
DEFA3	1,45	0,0E+00	0,0E+00
DEFA4	1,57	0,0E+00	0,0E+00
DES	1,39	2,0E-04	3,7E-02
DGKB	-1,41	1,0E-04	1,7E-02
DIP2B	-1,19	2,0E-04	3,7E-02
DIRC1	1,19	2,0E-04	4,2E-02
DKFZP564O0823	1,37	2,0E-04	4,6E-02
DKFZp666G057	1,46	0,0E+00	3,2E-03
DKK4	1,43	1,0E-04	1,9E-02
DPY19L2	-1,38	2,0E-04	3,4E-02
DSCR4	1,34	1,0E-04	3,3E-02
DSP	-1,01	1,5E-04	2,8E-02
DUSP1	-1,35	0,0E+00	1,4E-02
EGR1	-1,15	1,0E-04	2,1E-02
EGR2	-1,15	1,0E-04	1,5E-02
EIF1AY	-1,65	0,0E+00	0,0E+00
ELA2	1,16	1,0E-04	3,2E-02
ELA3B	1,42	0,0E+00	1,3E-02
ENST00000244820	1,43	2,0E-04	4,2E-02
ENST00000259219	1,27	2,0E-04	3,9E-02
ENST00000260303	1,36	2,0E-04	3,8E-02
ENST00000283657	1,30	1,0E-04	3,2E-02
ENST00000295410	1,23	2,0E-04	3,9E-02
ENST00000316772	-1,55	0,0E+00	0,0E+00
ENST00000322032	1,21	0,0E+00	6,9E-03
ENST00000331696	1,20	3,0E-04	5,0E-02
ENST00000339425	-1,66	0,0E+00	0,0E+00
ENST00000359119	-1,37	2,0E-04	2,9E-02
ENST00000359488	1,22	2,0E-04	3,7E-02
ENST00000367932	1,33	1,0E-04	3,0E-02
ENST00000370419	-1,47	0,0E+00	7,6E-03
ENST00000376881	-1,27	0,0E+00	1,2E-02
ENST00000377226	1,25	3,0E-04	5,0E-02
ENST00000379900	1,44	1,0E-04	3,4E-02
ENST00000379913	1,14	1,0E-04	2,9E-02
EPB41L4A	1,01	1,0E-04	2,9E-02
EPB42	-1,10	2,0E-04	3,4E-02
ERAF	-1,13	0,0E+00	9,0E-03
EREG	-1,29	3,0E-04	4,4E-02
ETNK2	-1,41	2,0E-04	2,9E-02

ETV7	-1,43	0,0E+00	4,4E-03
F10112	-1,40	0,0E+00	9,9E-03
F13B	-1,29	2,0E-04	3,7E-02
FABP1	-1,32	3,0E-04	4,2E-02
FAM118A	-1,31	1,0E-04	1,6E-02
FAM55A	1,37	1,0E-04	3,3E-02
FBXL17	-1,32	1,0E-04	1,4E-02
FCER2	1,25	2,0E-04	4,4E-02
FCRL1	1,39	1,0E-04	3,0E-02
FCRL5	1,27	2,0E-04	4,4E-02
FGF17	1,29	0,0E+00	1,4E-02
FGF20	-1,45	1,0E-04	2,1E-02
FGF5	-1,71	0,0E+00	0,0E+00
FGFR2	-1,52	0,0E+00	7,8E-03
FLJ10159	1,31	1,0E-04	2,4E-02
FLJ22814	1,33	2,0E-04	4,2E-02
FLJ37673	1,50	0,0E+00	3,9E-03
FMN1	-1,25	1,0E-04	1,8E-02
FN1	-1,34	1,5E-04	2,6E-02
FOLR3	-1,27	0,0E+00	1,4E-02
FOXC1	1,34	0,0E+00	1,8E-02
FOXR1	-1,30	1,0E-04	1,6E-02
FST	1,57	1,0E-04	2,4E-02
FTCD	1,35	2,0E-04	3,7E-02
G0S2	-1,73	0,0E+00	0,0E+00
G30	-1,45	1,0E-04	1,7E-02
GARNL3	-1,38	4,0E-04	4,8E-02
GCNT3	-1,34	1,0E-04	2,2E-02
GFAP	1,20	2,0E-04	4,4E-02
GHR	1,00	1,0E-04	1,7E-02
GLRA2	-1,42	0,0E+00	9,5E-03
gm127	-1,46	0,0E+00	5,0E-03
GNGT1	-1,40	0,0E+00	1,0E-02
GPR98	-1,65	0,0E+00	0,0E+00
GPT	1,20	1,0E-04	2,2E-02
GSTM3	1,20	2,0E-04	4,4E-02
GSTT1	-1,30	1,0E-04	1,8E-02
HBD	-1,08	5,0E-05	1,2E-02
HBG1	1,09	0,0E+00	7,9E-03
HBM	-1,05	2,0E-04	3,7E-02
HEPH	1,37	0,0E+00	1,6E-02
HEY2	1,47	0,0E+00	1,8E-03
HIP1	-1,39	3,0E-04	4,7E-02
HIST1H1T	1,43	1,0E-04	2,3E-02
HLA-DQA1	1,49	0,0E+00	1,4E-03
HLA-DQA2	1,11	1,0E-04	2,1E-02
HLA-DQB1	-1,35	0,0E+00	5,1E-03
HLA-DRB6	-1,37	0,0E+00	2,3E-03
HP	1,16	1,0E-04	1,9E-02
HPR	1,13	3,0E-04	5,0E-02
HRK	1,38	0,0E+00	1,7E-02
HTRA3	1,36	1,0E-04	3,4E-02
ICEBERG	-1,34	2,0E-04	3,5E-02
IFI6	1,35	2,0E-04	3,9E-02
IGF1	1,37	3,0E-04	4,9E-02
IGH@	1,09	1,0E-04	2,8E-02
IGHA1	1,24	0,0E+00	9,7E-03
IGHD	1,41	0,0E+00	5,1E-03
IGJ	1,13	2,0E-04	4,3E-02
IGKC	1,29	2,0E-04	3,6E-02
IL1A	-1,38	2,5E-04	3,5E-02
IL1B	-1,25	2,0E-04	3,6E-02
IL20	1,48	0,0E+00	1,8E-02
IL21	1,41	1,0E-04	3,3E-02
IL27	1,22	0,0E+00	7,5E-03
IL8	-1,47	0,0E+00	0,0E+00
IRF5	-1,15	2,5E-04	4,1E-02

ITGAD	1,04	1,0E-04	2,1E-02
ITGB3	-1,07	3,0E-04	4,4E-02
JARID1D	-1,61	0,0E+00	0,0E+00
KBTBD5	1,57	0,0E+00	0,0E+00
KCNG1	1,52	0,0E+00	0,0E+00
KCNK18	-1,49	0,0E+00	4,5E-03
KDR	1,58	0,0E+00	1,7E-03
KIAA0087	-1,53	0,0E+00	4,3E-03
KIAA0101	-1,43	1,0E-04	1,9E-02
KIAA0367	1,47	0,0E+00	1,7E-02
KIAA1045	-1,37	3,0E-04	4,3E-02
KIAA1446	-1,25	0,0E+00	9,0E-03
KIAA1751	-1,33	3,0E-04	4,1E-02
KIF14	1,47	0,0E+00	1,8E-02
KLF17	1,35	3,0E-04	4,9E-02
KLRC1	1,25	3,0E-04	4,8E-02
KLRC2	1,42	0,0E+00	1,6E-03
KRAS	-1,37	3,0E-04	4,5E-02
KRT1	1,29	5,0E-05	9,7E-03
KRT12	-1,43	1,0E-04	1,5E-02
KRT72	1,03	1,0E-04	3,1E-02
KRTAP5-8	1,25	0,0E+00	9,1E-03
L31408	-1,46	0,0E+00	1,1E-02
L3MBTL4	-1,42	2,0E-04	2,9E-02
LAMA1	-1,52	0,0E+00	3,3E-03
LCN2	1,21	1,0E-04	2,8E-02
LDHAL6B	-1,46	1,0E-04	1,5E-02
LEP	1,41	1,0E-04	2,8E-02
LHFPL1	-1,34	1,0E-04	1,4E-02
LOC114227	-1,45	0,0E+00	7,4E-03
LOC121498	-1,35	3,0E-04	4,7E-02
LOC196541	-1,47	0,0E+00	1,0E-02
LOC283454	1,22	2,0E-04	3,6E-02
LOC283663	1,33	2,0E-04	3,6E-02
LOC401098	-1,40	3,0E-04	4,3E-02
LOC401233	1,07	1,0E-04	1,9E-02
LOC441245	1,23	0,0E+00	7,4E-03
LOC441774	-2,55	0,0E+00	0,0E+00
LOC645733	1,28	0,0E+00	9,1E-03
LOC645749	-1,40	1,0E-04	2,8E-02
LOC653483	1,29	0,0E+00	1,7E-03
LOC654433	-1,32	0,0E+00	6,3E-03
LOC730259	-1,12	0,0E+00	9,5E-03
LQK1	-1,37	0,0E+00	8,8E-03
LRAT	-1,44	1,0E-04	1,8E-02
LRRC15	1,39	0,0E+00	7,3E-03
LRRC2	1,35	0,0E+00	9,2E-03
LRRN3	1,45	0,0E+00	9,2E-03
LRRTM4	-1,47	0,0E+00	1,4E-02
LTF	1,32	0,0E+00	1,9E-03
M27126	-1,25	0,0E+00	1,4E-02
MAB21L2	1,09	5,0E-05	1,6E-02
MAGI1	-1,40	0,0E+00	9,4E-03
MARCO	-1,26	2,0E-04	3,8E-02
MASP1	-1,29	2,0E-04	3,3E-02
MCAT	1,28	0,0E+00	2,3E-03
MDGA1	1,64	0,0E+00	0,0E+00
MEG3	1,07	1,0E-04	2,4E-02
MGC26718	-1,72	0,0E+00	0,0E+00
MGC45438	1,40	2,0E-04	3,6E-02
MGC70863	-1,21	4,0E-04	4,9E-02
MME	-1,37	1,0E-04	1,7E-02
MYL4	-1,08	1,0E-04	1,9E-02
MYO5B	1,76	0,0E+00	2,5E-03
MYOM2	1,39	0,0E+00	0,0E+00
NEXN	-1,36	1,0E-04	1,6E-02
NLGN1	-1,41	0,0E+00	1,2E-02

NOL4	-1,43	0,0E+00	1,2E-02
NP511407	-1,49	0,0E+00	7,2E-03
NPSA	-1,44	2,0E-04	3,8E-02
NRP2	1,29	1,0E-04	2,0E-02
NSUN7	-1,35	2,0E-04	3,5E-02
ODZ4	-1,44	1,0E-04	2,0E-02
OLFM4	1,41	5,0E-05	9,8E-03
OSTalpha	1,52	0,0E+00	7,3E-03
PAK7	-1,38	0,0E+00	9,1E-03
PAX3	1,39	1,0E-04	2,1E-02
PCDH9	1,35	1,0E-04	2,3E-02
PCDHB10	-1,40	0,0E+00	1,3E-02
PCK1	-1,30	0,0E+00	4,6E-03
PDE1C	1,32	0,0E+00	9,4E-03
PDK4	-1,48	0,0E+00	1,3E-02
PDPN	-1,35	2,0E-04	3,7E-02
PDZK1IP1	-1,17	2,0E-04	3,2E-02
PF4V1	1,33	0,0E+00	2,0E-03
PLA2G4C	1,15	3,0E-04	5,0E-02
PLAT	1,44	1,0E-04	2,4E-02
PLCH2	-1,41	3,0E-04	4,2E-02
PLEKHA6	1,70	0,0E+00	2,6E-03
PLGLB1	-1,29	3,0E-04	4,4E-02
PLK4	-1,36	3,0E-04	4,0E-02
PLN	-1,42	1,0E-04	1,6E-02
PNLIPRP1	-1,26	1,0E-04	2,4E-02
POFUT2	1,49	1,0E-04	2,0E-02
PPP2R2C	-1,41	0,0E+00	1,4E-02
PRKAA2	-1,34	1,0E-04	2,0E-02
PRKY	-1,31	1,0E-04	1,8E-02
PRO2964	1,52	0,0E+00	5,7E-03
PRSS36	1,30	0,0E+00	2,4E-03
PSCA	1,39	2,0E-04	3,8E-02
PSPH	-1,10	0,0E+00	9,9E-03
PTGS2	-1,37	0,0E+00	7,8E-03
PTN	1,58	0,0E+00	7,4E-03
RANBP3L	-1,37	3,0E-04	4,3E-02
RASIP1	1,25	0,0E+00	9,5E-03
RBM24	1,27	0,0E+00	1,1E-02
REST	1,26	1,0E-04	1,9E-02
RGS1	-1,38	0,0E+00	8,0E-03
RGS7BP	1,52	0,0E+00	8,6E-03
RHD	-1,25	1,0E-04	1,8E-02
RIMS2	-1,36	0,0E+00	1,3E-02
RNF180	1,46	2,0E-04	3,9E-02
RPS4Y1	-2,69	0,0E+00	9,0E-04
RPS4Y2	-2,92	0,0E+00	1,7E-03
RSPO2	-1,69	0,0E+00	0,0E+00
RTP3	-1,35	2,0E-04	3,2E-02
S100A7A	-1,53	0,0E+00	2,1E-03
S100B	1,16	2,0E-04	4,3E-02
S73202	1,34	1,0E-04	2,1E-02
SELE	1,37	1,0E-04	2,6E-02
SELENBP1	-1,06	1,0E-04	2,5E-02
SEMG2	1,41	2,0E-04	4,4E-02
SETD5	1,28	3,0E-04	4,8E-02
SHOX2	1,37	0,0E+00	2,5E-03
SIGLEC11	-1,35	0,0E+00	1,1E-02
SLC1A7	-1,26	4,0E-04	5,0E-02
SLC22A11	-1,43	2,0E-04	3,5E-02
SLC23A3	1,48	0,0E+00	5,2E-03
SLC24A3	-1,26	1,0E-04	1,9E-02
SLCO2B1	1,27	1,0E-04	2,4E-02
SP5	-1,38	1,0E-04	2,2E-02
SPATA9	-1,49	0,0E+00	2,2E-03
SPP1	-1,54	0,0E+00	4,2E-03
SPRN	1,54	0,0E+00	1,6E-02

SPRYD5	1,38	0,0E+00	5,2E-03
SUSD5	-1,48	0,0E+00	5,0E-03
SYT16	1,29	1,0E-04	2,9E-02
TCEAL7	1,42	1,0E-04	2,1E-02
TCL1A	1,49	0,0E+00	1,9E-03
TEP1	1,28	1,0E-04	3,2E-02
THBS2	-1,32	3,0E-04	4,5E-02
THC2474831	1,21	0,0E+00	1,4E-02
THC2488609	-1,46	0,0E+00	9,1E-03
THC2529957	1,30	1,0E-04	2,9E-02
THC2530077	-1,29	1,0E-04	2,7E-02
THC2536227	1,80	0,0E+00	0,0E+00
THC2541839	-1,33	0,0E+00	2,1E-03
THC2550720	1,38	3,0E-04	5,0E-02
THC2562611	1,57	0,0E+00	8,5E-03
THC2576067	-1,26	3,0E-04	4,1E-02
THC2598362	1,48	0,0E+00	4,9E-03
THC2608721	-1,51	0,0E+00	4,3E-03
THC2631233	-1,38	1,0E-04	2,0E-02
THC2638839	1,75	0,0E+00	7,0E-04
THC2639372	-1,45	1,0E-04	2,1E-02
THC2645080	1,34	1,0E-04	2,9E-02
THC2650372	-1,28	2,0E-04	3,0E-02
THC2652700	1,39	0,0E+00	1,8E-03
THC2654448	1,26	1,0E-04	3,4E-02
THC2655508	1,23	0,0E+00	2,6E-03
THC2657613	-1,41	1,0E-04	2,0E-02
THC2659440	-1,50	0,0E+00	1,1E-02
THC2660273	-1,33	2,0E-04	3,8E-02
THC2661428	-1,46	1,0E-04	1,6E-02
THC2663978	1,31	1,0E-04	2,2E-02
THC2664792	1,51	0,0E+00	7,2E-03
THC2669092	-1,21	3,0E-04	4,4E-02
THC2673830	1,36	1,0E-04	2,3E-02
THC2674391	1,36	1,0E-04	2,1E-02
THC2674915	-1,11	3,0E-04	3,9E-02
THC2681759	-1,41	0,0E+00	1,4E-02
THC2685029	-1,34	0,0E+00	1,3E-02
THC2687959	1,41	1,0E-04	2,9E-02
THC2696211	1,53	0,0E+00	5,7E-03
THC2698892	1,65	0,0E+00	2,4E-03
THC2702250	-1,41	3,0E-04	4,3E-02
THC2715307	-1,46	0,0E+00	1,0E-02
THC2728305	1,46	1,0E-04	3,2E-02
THC2728454	-1,47	0,0E+00	1,0E-02
THC2739443	1,10	0,0E+00	1,8E-02
THC2747806	1,38	2,0E-04	4,4E-02
THC2767659	1,37	2,0E-04	3,6E-02
THC2781239	1,39	2,0E-04	3,6E-02
TM4SF20	1,46	0,0E+00	4,2E-03
TMEM176A	1,15	0,0E+00	4,5E-03
TMEM176B	1,18	0,0E+00	1,7E-03
TMPRSS11A	-1,28	2,0E-04	3,8E-02
TNFAIP8L3	1,09	2,0E-04	3,5E-02
TNN	1,27	1,0E-04	2,8E-02
TNNT1	-1,18	1,0E-04	1,7E-02
TNT	1,69	0,0E+00	2,6E-03
TOM1L1	1,43	1,0E-04	2,4E-02
TP53	1,25	1,0E-04	3,3E-02
TRIM29	-1,43	0,0E+00	7,7E-03
TRIM40	1,57	0,0E+00	1,6E-02
TRPM1	-1,49	1,0E-04	1,5E-02
TRPV3	-1,37	3,0E-04	4,8E-02
TSHR	-1,40	3,0E-04	4,4E-02
TSPAN9	-1,42	1,0E-04	1,7E-02
TTY15	-1,37	0,0E+00	0,0E+00
TTY9A	-1,37	2,0E-04	3,5E-02

U44029	-1,38	2,0E-04	3,8E-02
UGT2A3	-1,46	0,0E+00	4,8E-03
UGT2B17	1,02	2,0E-04	4,5E-02
ULBP1	1,38	1,0E-04	2,6E-02
UPK1B	-1,46	0,0E+00	7,8E-03
USP9Y	-1,23	1,0E-04	1,8E-02
UTS2	-1,57	0,0E+00	0,0E+00
UTY	-1,39	0,0E+00	3,4E-03
VGLL3	1,56	0,0E+00	2,7E-03
XIST	4,03	0,0E+00	0,0E+00
ZDHHC22	1,37	2,0E-04	4,0E-02
ZFY	-1,33	0,0E+00	0,0E+00
ZNF429	1,19	2,0E-04	4,0E-02
ZNF556	-1,39	1,0E-04	1,8E-02
ZNF683	-1,35	0,0E+00	4,4E-03
ZNF69	1,34	2,0E-04	3,8E-02
ZNRF4	-1,38	4,0E-04	4,9E-02

ANEXO F: Termos biológicos enriquecidos com genes diferencialmente expressos da comparação pacientes DM2 compensados *versus* controles. O termo destacado em negrito foi selecionado para discussão.

Compensado <i>versus</i> Controle						
Categorias	Termos	Número de Genes	% de Genes	Valor de p	<i>Fold Change</i> de Enriquecimento	P de Benjamini-Hochberg
GOTERM_MF_FAT	GO:0042379-ligação ao receptor de quimiocina	8	2,79	5,3E-06	11,46	9,2E-04
GOTERM_CC_FAT	GO:0005615-espaco extracelular	26	9,06	4,4E-06	2,82	1,0E-03
SP_PIR_KEY WORDS	sinal	72	25,09	6,5E-06	1,67	1,1E-03
GOTERM_CC_FAT	GO:0044421-parte da região extracelular	31	10,80	1,0E-05	2,40	1,2E-03
GOTERM_MF_FAT	GO:0008009-atividade de quimiocinas	8	2,79	3,4E-06	12,20	1,2E-03
SP_PIR_KEY WORDS	citocina	13	4,53	5,4E-06	5,42	1,8E-03
GOTERM_MF_FAT	GO:0005125-atividade de citocinas	13	4,53	2,2E-05	4,68	2,5E-03
SMART	SM00199:SCY	7	2,44	3,3E-05	11,07	3,7E-03
UP_SEQ_FEATURE	peptídeo sinal	72	25,09	8,1E-06	1,66	7,0E-03
INTERPRO	IPR001811:quimiocina pequena, semelhante à interleucina 8	7	2,44	1,8E-05	12,47	8,7E-03
INTERPRO	IPR013783:dobra semelhante a das imunoglobulinas	21	7,32	7,2E-05	2,77	1,2E-02
GOTERM_MF	GO:0030246-ligação a	16	5,57	1,6E-	3,17	1,3E-02

_FAT	carboidratos	04				
INTERPRO	IPR007110:semelhante a imunoglobulinas	20	6,97	5,8E-05	2,92	1,4E-02
KEGG_PATHWAY	hsa04514:moléculas de adesão celular (CAMs)	10	3,48	2,0E-04	4,76	2,1E-02
GOTERM_CC_FAT	GO:0005576-região extracelular	45	15,68	4,8E-04	1,66	2,7E-02
SP_PIR_KEYWORDS	resposta inflamatória	7	2,44	5,4E-04	6,86	3,5E-02
GOTERM_CC_FAT	GO:0005833-complexo de hemoglobina	4	1,39	4,7E-04	24,77	3,6E-02
SP_PIR_KEYWORDS	ligação dissulfídica	60	20,91	4,5E-04	1,55	3,7E-02
SP_PIR_KEYWORDS	quimiotaxia	7	2,44	3,8E-04	7,33	4,1E-02
SP_PIR_KEYWORDS	secretado	39	13,59	8,2E-04	1,74	4,4E-02
GOTERM_BP_FAT	GO:0009611-resposta a ferimentos	20	6,97	9,6E-05	2,79	4,8E-02
GOTERM_BP_FAT	GO:0006954-resposta inflamatória	16	5,57	3,3E-05	3,64	5,0E-02

ANEXO G: Termos biológicos enriquecidos com genes diferencialmente expressos da comparação pacientes DM2 descompensados *versus* compensados. O termo destacado em negrito foi selecionado para discussão.

Descompensado <i>versus</i> Compensado						
Categorias	Termos	Número de genes	% de Genes	Valor de p	Fold Change de Enriquecimento	P de Benjamini-Hochberg
SP_PIR_KEYWORDS	sinal	104	30,68	8,3E-13	1,99	3,2E-10
UP_SEQ_FEATURE	peptídeo sinal	104	30,68	9,8E-13	1,99	1,2E-09
SP_PIR_KEYWORDS	ligação dissulfídica	93	27,43	3,7E-11	1,98	7,3E-09
UP_SEQ_FEATURE	ligação dissulfídica	90	26,55	8,7E-11	1,98	5,2E-08
GOTERM_CC_FAT	GO:0005615-espaco extracelular	38	11,21	8,7E-10	3,14	2,2E-07
GOTERM_CC_FAT	GO:0005576-região extracelular	72	21,24	1,8E-09	2,03	2,3E-07
GOTERM_CC_FAT	GO:0044421-parte da região extracelular	43	12,68	2,9E-08	2,53	2,5E-06
SP_PIR_KEYWORDS	secretado	59	17,40	2,0E-08	2,17	2,6E-06
GOTERM_BP_FAT	GO:0006955-resposta imune	34	10,03	4,9E-08	2,92	8,6E-05

SP_PIR_KEY WORDS	citocina	15	4,42	1,4E-06	5,16	1,3E-04
SP_PIR_KEY WORDS	ácido piroglutâmico	8	2,36	7,9E-06	10,83	5,1E-04
SP_PIR_KEY WORDS	região c das imunoglobulinas	5	1,47	7,6E-06	34,58	6,0E-04
SP_PIR_KEY WORDS	heterotetrâmero	9	2,65	1,4E-05	8,12	7,9E-04
SP_PIR_KEY WORDS	glicoproteína	102	30,09	1,7E-05	1,47	8,4E-04
SP_PIR_KEY WORDS	duplicação	15	4,42	2,0E-05	4,10	8,6E-04
INTERPRO	IPR003006:imunoglobulina/com plexo principal de histocompatibilidade, sítio conservado	11	3,24	1,6E-06	7,66	9,8E-04
SP_PIR_KEY WORDS	Resposta inflamatória	9	2,65	3,2E-05	7,28	1,2E-03
INTERPRO	IPR001811: quimiocina pequena, semelhante à interleucina 8	8	2,36	4,2E-06	11,82	1,3E-03
SMART	SM00199:SCY	8	2,36	1,2E-05	10,01	1,7E-03
INTERPRO	IPR013783:dobra semelhante a das imunoglobulinas	25	7,37	1,6E-05	2,74	2,4E-03
GOTERM_BP _FAT	GO:0009611-resposta a fermentos	26	7,67	3,0E-06	2,91	2,6E-03
GOTERM_BP _FAT	GO:0006952-resposta de defesa	28	8,26	4,6E-06	2,70	2,7E-03
GOTERM_MF _FAT	GO:0008009-atividade de quimiocinas	8	2,36	1,4E-05	9,90	3,0E-03
GOTERM_MF _FAT	GO:0042379-ligação ao receptor de quimiocina	8	2,36	2,1E-05	9,30	3,1E-03
INTERPRO	IPR003597:imunoglobulina constante 1	9	2,65	1,5E-05	8,02	3,1E-03
SP_PIR_KEY WORDS	ácido pirrolidona carboxílico	8	2,36	9,6E-05	7,43	3,4E-03
SMART	SM00407:IGc1	9	2,65	4,7E-05	6,79	3,4E-03
INTERPRO	IPR007110:semelhante a imunoglobulinas	23	6,78	2,9E-05	2,78	3,6E-03
GOTERM_MF _FAT	GO:0005125-atividade de citoquinas	15	4,42	8,4E-06	4,38	3,7E-03
GOTERM_BP _FAT	GO:0006954-resposta inflamatória	19	5,60	9,4E-06	3,47	4,1E-03
INTERPRO	IPR001089:quimiocina pequena, C-X-C	5	1,47	4,6E-05	23,30	4,6E-03
GOTERM_BP _FAT	GO:0051674-localização de células	18	5,31	1,7E-05	3,48	4,8E-03
GOTERM_BP _FAT	GO:0048870-motilidade celular	18	5,31	1,7E-05	3,48	4,8E-03
INTERPRO	IPR002473:quimiocina pequena, C-X-C/interleucina 8	5	1,47	6,3E-05	21,64	5,4E-03
GOTERM_BP _FAT	GO:0008284-regulação positiva da proliferação celular	21	6,19	2,2E-05	3,01	5,5E-03
GOTERM_MF _FAT	GO:0030246-ligação a carboidratos	19	5,60	5,1E-05	3,06	5,6E-03
GOTERM_BP _FAT	GO:0006928-movimento celular	23	6,78	1,6E-05	2,87	5,7E-03
GOTERM_BP	GO:0051384-resposta ao	9	2,65	4,7E-	6,85	1,0E-02

_FAT	estímulo de glucocorticóides	05				
INTERPRO	IPR018048:quimiocina pequena, C-X-C, sítio conservado	5	1,47	1,4E-04	17,82	1,1E-02
GOTERM_BP_FAT	GO:0016477-migração celular	16	4,72	6,6E-05	3,44	1,3E-02
GOTERM_BP_FAT	GO:0031960-resposta ao estímulo de corticosteróides	9	2,65	8,8E-05	6,28	1,5E-02
KEGG_PATHWAY	hsa04060:interação receptor de citocina-citocina	16	4,72	1,4E-04	3,11	1,6E-02
SP_PIR_KEYWORDS	inflamação	5	1,47	6,3E-04	12,45	1,7E-02
SP_PIR_KEYWORDS	domínio de imunoglobulina	19	5,60	6,1E-04	2,52	1,8E-02
SP_PIR_KEYWORDS	heparin binding	5	1,47	7,3E-04	11,97	1,9E-02
SP_PIR_KEYWORDS	heparin-binding	7	2,06	6,0E-04	6,70	1,9E-02
SP_PIR_KEYWORDS	macrófago	4	1,18	8,0E-04	20,75	1,9E-02
GOTERM_MF_FAT	GO:0004252-atividade de serina-endopeptidases	11	3,24	3,7E-04	4,07	3,2E-02
SP_PIR_KEYWORDS	imunoglobulina	5	1,47	1,4E-03	10,04	3,3E-02
SP_PIR_KEYWORDS	serina protease	9	2,65	1,6E-03	4,12	3,4E-02
INTERPRO	IPR013151:imunoglobulina	12	3,54	5,3E-04	3,60	3,5E-02
GOTERM_MF_FAT	GO:0008083-atividade de fator de crescimento	11	3,24	5,3E-04	3,89	3,8E-02
INTERPRO	IPR001254:peptidase S1 e S6, quimotripsina/Hap	9	2,65	6,6E-04	4,70	4,0E-02
INTERPRO	IPR013106:imunoglobulina variável	13	3,83	8,9E-04	3,16	4,8E-02
KEGG_PATHWAY	hsa05332:doença do enxerto contra hospedeiro	6	1,77	8,6E-04	7,82	4,8E-02
GOTERM_BP_FAT	GO:0032101-regulação da resposta ao estímulo externo	11	3,24	3,5E-04	4,10	5,0E-02

ANEXO H: Termos biológicos enriquecidos com genes diferencialmente expressos da comparação pacientes DM2 descompensados *versus* controles.

Descompensado <i>versus</i> Controle						
Categorias	Termos	Número de Genes	% de Genes	Valor de p	<i>Fold Change</i> de Enriquecimento	P de Benjamini-Hochberg
GOTERM_MF_FAT	GO:0005198-atividade de moléculas estruturais	19	9,69	1,1E-05	3,35	3,0E-03
SP_PIR_KEY_WORDS	antimicrobiana	6	3,06	4,0E-04	9,56	2,9E-02
SP_PIR_KEY_WORDS	heterotetrâmero	6	3,06	3,5E-04	9,84	3,4E-02
SP_PIR_KEY_WORDS	antibiótico	6	3,06	3,3E-04	9,98	4,7E-02
SP_PIR_KEY_WORDS	ribonucleoproteína	10	5,10	8,3E-04	4,06	4,8E-02

ANEXO I: Termos de *Gene Ontology* estatisticamente enriquecidos e/ou estatisticamente significativos em pacientes DM2 compensados *versus* controles. Valores de p em *itálico* apresentam diferença estatística ($p < 0,005$). Os sinais (+) e (-) indicam que o termo correspondente está induzido ou reprimido em pacientes DM2 compensados.

GO	Descrição da GO	Número de genes	Valor de p da permutação LS	Valor de p da permutação KS	Valor de p to teste GSA Efron-Tibshirani
GO:0000768	formação de sincício pela fusão da membrana plasmática	11	0,18122	<i>0,00325</i>	0,013 (+)
GO:0006414	alongamento da tradução	74	<i>0,00001</i>	<i>0,00017</i>	0,009 (-)
GO:0051998	atividade carboxil-O-metiltransferase em proteína	5	0,06903	0,35132	<i>< 0,001</i> (+)
GO:0010340	atividade carboxil-O-metiltransferase	5	0,06903	0,35132	<i>< 0,001</i> (+)
GO:0003954	atividade de NADH desidrogenase	36	<i>0,00036</i>	<i>0,00129</i>	<i>0,004</i> (-)
GO:0050136	atividade de NADH desidrogenase (quinona)	36	<i>0,00036</i>	<i>0,00129</i>	<i>0,004</i> (-)
GO:0004983	atividade do receptor do neuropeptídeo Y	8	0,04987	0,06962	<i>< 0,001</i> (+)
GO:0016860	atividade oxidoredutase intramolecular	34	0,19588	<i>0,00233</i>	0,047 (+)
GO:0016655	atividade oxidoredutase, agindo em NADH ou NADPH, quinona ou composto similar como aceitador	49	<i>0,00212</i>	<i>0,00432</i>	0,009 (-)
GO:0042273	biogênese da subunidade ribossomal grande	11	<i>0,00152</i>	<i>0,00015</i>	0,024 (+)
GO:0042274	biogênese da subunidade ribossomal pequena	14	<i>0,00018</i>	0,07919	<i>0,002</i> (-)
GO:0070469	cadeia respiratória	63	<i>0,00015</i>	<i>0,00068</i>	0,01 (-)
GO:0022904	cadeia respiratória de transporte de elétrons	90	<i>0,00001</i>	<i>0,00001</i>	<i>0,002</i> (-)
GO:0005746	cadeia respiratória mitocondrial	61	<i>0,00009</i>	<i>0,00079</i>	0,009 (-)
GO:0005451	cátion monovalente: atividade antiportadora de hidrogênio	8	<i>0,0025</i>	0,01344	<i>0,002</i> (+)
GO:0022624	complexo acessório de proteassoma	11	0,01556	<i>0,00183</i>	0,012 (+)
GO:0005753	complexo ATP sintase de transporte de prótons mitocondrial	17	0,00732	0,01476	<i>0,004</i> (-)
GO:0031332	complexo efetor RNAi	8	0,03775	0,03478	<i>0,002</i> (-)

GO:0045271	complexo I da cadeia respiratória	39	0,00002	0,00012	0,003 (-)
GO:0030964	complexo NADH desidrogenase	39	0,00002	0,00012	0,003 (-)
GO:0005771	corpo multivesicular	24	0,00251	0,00132	0,003 (+)
GO:0006613	direcionamento co-traducional de proteínas à membrana	82	0,00001	0,00006	0,01 (-)
GO:0030850	desenvolvimento da glândula da próstata	46	0,01095	0,00041	0,111 (+)
GO:0072009	desenvolvimento do epitélio do néfron	43	0,33766	0,0033	0,032 (+)
GO:0072080	desenvolvimento do túbulo do néfron	35	0,3825	0,00272	0,026 (+)
GO:0031498	desmontagem da cromatina	15	0,00801	0,06674	< 0,001 (+)
GO:0032986	desmontagem do complexo proteína-DNA	15	0,00801	0,06674	< 0,001 (+)
GO:0006337	desmontagem de nucleossomos	15	0,00801	0,06674	< 0,001 (+)
GO:0030183	diferenciação de células B	63	0,00216	0,01336	0,004 (-)
GO:0048863	diferenciação de células-tronco	94	0,04777	0,00161	0,038 (-)
GO:0045047	direcionamento de proteínas ao retículo endoplasmático	83	0,00001	0,00006	0,011 (-)
GO:0015985	energia acoplada ao transporte de prótons, a favor do gradiente eletroquímico	15	0,02378	0,08831	0,004 (-)
GO:0072599	estabelecimento da localização de proteínas para o retículo endoplasmático	83	0,00001	0,00006	0,011 (-)
GO:0006949	formação de sincício	12	0,08936	0,00181	0,014 (+)
GO:0006119	fosforilação oxidativa	54	0,00009	0,00078	0,008 (-)
GO:0033613	ligação de fator de transcrição de ativação	39	0,08238	0,09022	0,001 (-)
GO:0070972	localização de proteínas para o retículo endoplasmático	95	0,00001	0,00007	0,011 (-)
GO:0031902	membrana do endossomo tardio	68	0,00288	0,02889	0,057 (+)
GO:0022618	montagem de complexo ribonucleoproteico	74	0,00343	0,08326	0,021 (-)
GO:0019067	montagem, maturação, egresso e liberação viral	13	0,07502	0,00292	0,143 (+)
GO:0061383	morfogênese da trabécula	24	0,03644	0,00286	0,02 (-)
GO:0060439	morfogênese da traquéia	5	0,08757	0,00176	0,081 (+)

GO:0007440	morfogênese do intestino dianteiro	11	0,17506	0,00317	0,032 (-)
GO:0061333	morfogênese do túbulo renal	20	0,55904	0,00391	0,28 (+)
GO:0003215	morfogênese do ventrículo cardíaco direito	13	0,04332	0,00029	0,019 (+)
GO:0043230	organela extracelular	7	0,01642	0,001	0,023 (+)
GO:0065010	organela membranosa extracelular	7	0,01642	0,001	0,023 (+)
GO:0007032	organização de endossomos	22	0,00119	0,04379	0,022 (+)
GO:0032528	organização de microvilosidades	8	0,13418	0,00428	0,077 (+)
GO:0031122	organização de microtúbulos citoplasmáticos	10	0,00322	0,00426	0,007 (-)
GO:0006364	processamento de RNAr	76	0,00086	0,04678	0,04 (-)
GO:0008033	processamento de RNAt	64	0,01346	0,00278	0,125 (-)
GO:0009083	processo catabólico de aminoácidos de cadeia ramificada	19	0,00216	0,00438	0,035 (-)
GO:0000184	processo catabólico do RNAm transcrito no núcleo, degradação mediada por <i>nonsense</i>	94	0,00001	0,00003	0,013 (-)
GO:0042089	processo de biossíntese de citocinas	95	0,03305	0,00042	0,117 (+)
GO:0009081	processo metabólico de aminoácidos de cadeia ramificada	22	0,00482	0,01151	0,031 (-)
GO:0042107	processo metabólico de citocinas	97	0,04806	0,00105	0,138 (+)
GO:0043112	processo metabólico de receptores	89	0,01535	0,00038	0,026 (+)
GO:0016072	processo metabólico de RNAr	80	0,00048	0,03636	0,032 (-)
GO:0060767	proliferação de células epiteliais envolvidas no desenvolvimento da glândula da próstata	11	0,01776	0,00317	0,137 (+)
GO:0005801	rede cis de Golgi	21	0,00223	0,00161	0,004 (-)
GO:0033003	regulação da ativação de mastócitos	24	0,00884	0,00235	0,059 (-)
GO:0033006	regulação da ativação de mastócitos envolvidos em resposta imune	17	0,02987	0,00436	0,096 (-)
GO:0043300	regulação da degranulação de leucócitos	19	0,034	0,00342	0,141 (-)
GO:0043304	regulação da degranulação de mastócitos	16	0,02552	0,00459	0,075 (-)
GO:0051150	regulação da diferenciação de células musculares lisas	10	0,03684	0,03699	0,001 (+)

GO:0045667	regulação da diferenciação dos osteoblastos	82	0,01537	0,00384	0,092 (-)
GO:0002886	regulação da imunidade mediada por leucócitos mielóides	21	0,03535	0,00088	0,144 (+)
GO:0002864	regulação da resposta inflamatória aguda a estímulos antigênicos	10	0,00878	0,00283	0,027 (-)
GO:1900449	regulação da via de sinalização do receptor de glutamato	21	0,074	0,06092	0,004 (+)
GO:0043567	regulação da via de sinalização do receptor do fator de crescimento semelhante à insulina	16	0,12267	0,00099	0,03 (+)
GO:0045682	regulação do desenvolvimento da epiderme	27	0,0299	0,00701	0,004 (+)
GO:0060078	regulação do potencial de membrana pós-sináptico	40	0,25558	0,15389	0,004 (+)
GO:0060079	regulação do potencial de membrana pós-sináptico excitatório	35	0,26963	0,23625	0,004 (+)
GO:0050684	regulação do processamento de RNAm	25	0,00261	0,02361	0,07 (-)
GO:0042035	regulação do processo de biossíntese de citocinas	87	0,05817	0,00118	0,091 (-)
GO:0043484	regulação do <i>splicing</i> do RNA	32	0,00002	0,00008	0,058 (-)
GO:0048024	regulação do <i>splicing</i> do RNAm nuclear, via spliceossomo	15	0,00141	0,0033	0,054 (-)
GO:0002710	regulação negativa da imunidade mediada por células T	9	0,0041	0,08183	0,071 (-)
GO:0032096	regulação negativa da resposta a alimentos	9	0,01832	0,02884	< 0,001 (+)
GO:0002820	regulação negativa da resposta imune adaptativa	15	0,00082	0,05233	0,065 (+)
GO:0002823	regulação negativa da resposta imune adaptativa baseada na recombinação somática de receptores imunes sintetizados a partir de domínios da superfamília das imunoglobulinas	13	0,00012	0,01644	0,03 (+)
GO:0017148	regulação negativa da tradução	39	0,00202	0,00427	0,006 (-)
GO:0033119	regulação negativa do <i>splicing</i> do RNA	7	0,01703	0,00321	0,002 (-)
GO:0001954	regulação positiva da adesão célula-matriz	25	0,0179	0,00138	0,029 (-)
GO:0042108	regulação positiva do processo de biossíntese de citocinas	57	0,09342	0,00075	0,177 (+)
GO:0032236	regulação positiva do transporte de íons de cálcio via atividade do canal de cálcio operado por estoque	7	0,01376	0,00337	0,01 (-)
GO:2000311	regulação da atividade do receptor de glutamato seletivo para propionato de alfa-amino-3-hidróxi-5-metil-4-isoxazole	17	0,06376	0,06772	0,003 (+)

GO:0002438	resposta inflamatória aguda a estímulos antigênicos	10	0,00878	0,00283	0,027 (-)
GO:0022626	ribossomo citosólico	69	0,00001	0,00033	0,01 (-)
GO:0015986	síntese de ATP acoplada ao transporte de prótons	15	0,02378	0,08831	0,004 (-)
GO:0042773	síntese de ATP acoplada ao transporte de elétrons	45	0,00018	0,00085	0,007 (-)
GO:0042775	síntese de ATP mitocondrial acoplada ao transporte de elétrons	45	0,00018	0,00085	0,007 (-)
GO:0006614	direcionamento co-traducional de proteínas à membrana dependente de SRP	82	0,00001	0,00006	0,01 (-)
GO:0015934	subunidade ribossomal grande	60	0,00004	0,01456	0,025 (-)
GO:0015935	subunidade ribossomal pequena	51	0,00001	0,0033	0,016 (-)
GO:0006415	terminação da tradução	69	0,00001	0,0001	0,016 (-)
GO:0045022	transporte do endossomo precoce para o endossomo tardio	16	0,00283	0,10341	0,066 (-)
GO:0048009	via de sinalização do receptor do fator de crescimento semelhante à insulina	26	0,09363	0,00074	0,029 (+)

ANEXO J: Termos de *Gene Ontology* estatisticamente enriquecidos e/ou estatisticamente significativos em pacientes DM2 descompensados *versus* controles. Valores de p em *itálico* apresentam diferença estatística ($p < 0,005$). Os sinais (+) e (-) indicam que o termo correspondente está induzido ou reprimido em pacientes DM2 descompensados. Os termos destacados em **negrito** foram selecionados para discussão.

GO	Descrição da GO	Número de genes	Valor de p da permutação LS	Valor de p da permutação KS	Valor de p to teste GSA Efron-Tibshirani
GO:0000184	processo catabólico do RNAm transcrito no núcleo, degradação mediada por <i>nonsense</i>	94	<i>0,00001</i>	<i>0,00001</i>	0,023 (-)
GO:0006119	fosforilação oxidativa	54	<i>0,00001</i>	<i>0,00001</i>	0,001 (-)
GO:0006353	transcrição dependente de DNA, terminação	67	<i>0,00001</i>	<i>0,00001</i>	< 0,001 (+)
GO:0006414	alongamento da tradução	74	<i>0,00001</i>	<i>0,00001</i>	0,036 (-)
GO:0006415	terminação da tradução	69	<i>0,00001</i>	<i>0,00001</i>	0,038 (-)
GO:0006613	direcionamento co-traducional de proteínas à membrana	82	<i>0,00001</i>	<i>0,00001</i>	0,029 (-)
GO:0006614	direcionamento co-traducional de proteínas à membrana dependente de SRP	82	<i>0,00001</i>	<i>0,00001</i>	0,029 (-)
GO:0006984	via de sinalização retículo endoplasmático-núcleo	90	<i>0,00001</i>	<i>0,00057</i>	0,002 (-)
GO:0022904	cadeia respiratória de transporte de elétrons	90	<i>0,00001</i>	<i>0,00001</i>	< 0,001 (-)
GO:0031123	processamento da extremidade 3' do RNA	75	<i>0,00001</i>	<i>0,00001</i>	0,001 (-)
GO:0031124	processamento da extremidade 3' do RNAm	64	<i>0,00001</i>	<i>0,00001</i>	0,001 (-)
GO:0042773	síntese de ATP acoplada ao transporte de elétrons	45	<i>0,00001</i>	<i>0,00001</i>	0,002 (-)
GO:0042775	síntese de ATP mitocondrial acoplada ao transporte de elétrons	45	<i>0,00001</i>	<i>0,00001</i>	0,002 (-)
GO:0045047	direcionamento de proteínas ao retículo endoplasmático	83	<i>0,00001</i>	<i>0,00001</i>	0,028 (-)
GO:0070972	localização de proteínas para o retículo endoplasmático	95	<i>0,00001</i>	<i>0,00001</i>	0,026 (-)
GO:0072599	estabelecimento da localização de proteínas para o retículo endoplasmático	83	<i>0,00001</i>	<i>0,00001</i>	0,028 (-)

GO:0005746	cadeia respiratória mitocondrial	61	0,00001	0,00001	0,001 (-)
GO:0022626	ribossomo citosólico	69	0,00001	0,00001	0,018 (-)
GO:0030964	complexo NADH desidrogenase	39	0,00001	0,00001	0,002 (-)
GO:0045271	complexo I da cadeia respiratória	39	0,00001	0,00001	0,002 (-)
GO:0070469	cadeia respiratória	63	0,00001	0,00001	0,001 (-)
GO:0003729	ligação de RNAm	73	0,00001	0,00006	0,051 (-)
GO:0022618	montagem de complexo ribonucleoproteico	74	0,00001	0,00001	0,012 (+)
GO:0051168	exportação nuclear	91	0,00001	0,00037	0,016 (+)
GO:0051028	transporte de RNAm	90	0,00002	0,00002	0,075 (-)
GO:0004722	atividade de proteínas serina/treonina fosfatases	41	0,00002	0,00008	0,001 (-)
GO:0006399	processo metabólico de RNAt	100	0,00003	0,00001	0,003 (+)
GO:0018196	modificação de peptidil-asparagina	81	0,00003	0,00145	0,01 (-)
GO:0034976	resposta ao estresse do retículo endoplasmático	97	0,00003	0,00146	0,001 (-)
GO:0035967	resposta celular a proteínas topologicamente incorretas	84	0,00004	0,00057	0,003 (-)
GO:0071826	organização de subunidades de complexo ribonucleoproteico	78	0,00005	0,00001	0,02 (+)
GO:0016072	processo metabólico de RNAr	80	0,00005	0,00016	0,01 (+)
GO:0032069	regulação da atividade nuclease	67	0,00007	0,00039	0,001 (-)
GO:0006487	glicosilação N-ligada de proteínas	84	0,00008	0,00195	0,019 (-)
GO:0008033	processamento de RNAt	64	0,00008	0,00013	< 0,001 (+)
GO:0015935	subunidade ribossomal pequena	51	0,00008	0,0003	0,071 (-)
GO:0003954	atividade de NADH desidrogenase	36	0,00011	0,00011	0,002 (-)
GO:0050136	atividade de NADH desidrogenase (quinona)	36	0,00011	0,00011	0,002 (-)
GO:0000288	processo catabólico do RNAm transcrito no núcleo, degradação dependente de deadenilação	48	0,00015	0,00012	0,028 (-)
GO:0006446	regulação da iniciação traducional	40	0,00015	0,00001	0,041 (-)

GO:0032075	regulação positiva da atividade nucleaze	61	0,00017	0,00047	0,001 (-)
GO:0006364	processamento de RNAr	76	0,00018	0,00067	0,057 (+)
GO:0017148	regulação negativa da tradução	39	0,00026	0,00008	0,001 (-)
GO:0000245	montagem do complexo spliceossomo	24	0,00027	0,00013	< 0,001 (+)
GO:0006405	exportação de RNA do núcleo	54	0,0003	0,00196	0,011 (+)
GO:0000387	montagem de snRNP ao spliceossomo	26	0,00034	0,00001	< 0,001 (+)
GO:0006406	exportação de RNAm do núcleo	47	0,00034	0,00137	0,016 (+)
GO:0034101	homeostase de eritrócitos	75	0,00036	0,00278	0,002 (-)
GO:0040033	regulação negativa da tradução, mediada por ncRNA	6	0,00037	0,005	0,002 (-)
GO:0045974	regulação da tradução, mediada por ncRNA	6	0,00037	0,005	0,002 (-)
GO:0045947	regulação negativa da iniciação da tradução	12	0,0004	0,00038	0,001 (+)
GO:0009451	modificação do RNA	42	0,00041	0,00206	< 0,001 (+)
GO:0006361	iniciação da transcrição a partir do promotor da RNA polimerase I	22	0,00048	0,00009	< 0,001 (+)
GO:0030968	resposta a proteínas não dobradas no retículo endoplasmático	79	0,00051	0,00411	0,002 (-)
GO:0034620	resposta celular a proteínas não dobradas	79	0,00051	0,00411	0,002 (-)
GO:0015934	subunidade ribossomal grande	60	0,00053	0,00002	0,098 (-)
GO:1901070	processo de biossíntese de compostos contendo guanosina	15	0,00058	0,00953	< 0,001 (+)
GO:0035257	ligação a receptores nucleares de hormônio	89	0,00058	0,00003	0,002 (-)
GO:0030218	diferenciação de eritrócitos	69	0,00059	0,00327	0,003 (-)
GO:0030532	complexo ribonucleoproteico nuclear pequeno	28	0,00069	0,00018	< 0,001 (+)
GO:0002474	processamento de antígenos e apresentação de antígenos de peptídeos via MHC de classe I	90	0,0007	0,00011	0,189 (-)
GO:0051019	ligação de proteína quinase ativada por mitógeno	16	0,00078	0,00647	0,008 (-)
GO:0008186	atividade ATPase dependente de RNA	21	0,00085	0,00069	0,077 (+)

GO:0035770	grânulo ribonucleoproteico	60	0,00088	0,00231	0,001 (-)
GO:0005753	complexo ATP sintase de transporte de prótons mitocondrial	17	0,00088	0,00035	< 0,001 (-)
GO:0005801	rede cis de Golgi	21	0,001	0,00066	0,001 (-)
GO:0030663	membrana de vesículas revestidas por COPI	15	0,00106	0,00883	0,013 (-)
GO:0006360	transcrição a partir do promotor da RNA polimerase I	29	0,00106	0,00068	0,001 (+)
GO:0015078	atividade transportadora transmembrana de íons de hidrogênio	82	0,00108	0,00045	0,013 (-)
GO:0043484	regulação do <i>splicing</i> do RNA	32	0,00109	0,00823	0,079 (-)
GO:0008287	complexo de proteínas serina/treonina fosfatases	41	0,00117	0,00238	0,015 (-)
GO:0031902	membrana do endossomo tardio	68	0,00135	0,00174	0,034 (-)
GO:0030880	complexo RNA polimerase	83	0,00138	0,00165	0,048 (+)
GO:0004723	atividade de proteínas serina/treonina fosfatases dependente de cálcio	6	0,00146	0,01793	0,006 (-)
GO:0008026	atividade helicase dependente de ATP	99	0,00147	0,00021	0,298 (-)
GO:0070035	atividade helicase dependente de NTP de purinas	99	0,00147	0,00021	0,298 (-)
GO:0005798	vesícula associada ao Golgi	56	0,00148	0,00331	0,003 (-)
GO:0043555	regulação da tradução em resposta ao estresse	10	0,0016	0,00193	< 0,001 (+)
GO:0000289	encurtamento da cauda poli(A) do RNAm transcrito no núcleo	24	0,0017	0,00185	0,024 (-)
GO:0045259	complexo ATP sintase de transporte de prótons	18	0,00176	0,00125	0,002 (-)
GO:0034728	organização dos nucleossomos	100	0,00176	0,01015	0,161 (-)
GO:0033119	regulação negativa do <i>splicing</i> do RNA	7	0,0019	0,04849	0,001 (-)
GO:0042455	processo de biossíntese de ribonucleosídeos	26	0,00199	0,0381	0,022 (+)
GO:0006383	transcrição a partir do promotor da RNA polimerase III	46	0,00199	0,0002	< 0,001 (+)
GO:0000123	complexo de histonas acetiltransferases	61	0,00206	0,0007	0,027 (-)
GO:0004004	atividade helicase do RNA dependente de ATP	20	0,0021	0,00238	0,046 (+)

GO:0000428	complexo RNA polimerase direcionado por DNA	82	0,00224	0,00332	0,085 (+)
GO:0055029	complexo RNA polimerase direcionado por DNA nuclear	82	0,00224	0,00332	0,085 (+)
GO:0042273	biogênese da subunidade ribossomal grande	11	0,00235	0,00183	< 0,001 (+)
GO:0042451	processo de biossíntese de nucleosídeos de purina	25	0,0024	0,03709	0,042 (+)
GO:0046129	processo de biossíntese de ribonucleosídeos de purina	25	0,0024	0,03709	0,042 (+)
GO:0048002	processamento de antígenos e apresentação de antígenos de peptídeos	97	0,00241	0,00037	0,231 (-)
GO:0048524	regulação positiva de reprodução viral	73	0,00245	0,00388	0,037 (+)
GO:0016441	silenciamento gênico pós-transcricional	25	0,00249	0,00418	0,085 (-)
GO:0035194	silenciamento gênico pós-transcricional por RNA	25	0,00249	0,00418	0,085 (-)
GO:0034708	complexo metiltransferase	55	0,00253	0,00019	0,058 (-)
GO:0035097	complexo de histonas metiltransferases	55	0,00253	0,00019	0,058 (-)
GO:0006368	alongamento da transcrição a partir do promotor da RNA polimerase II	72	0,00256	0,01028	0,22 (+)
GO:0032993	complexo proteína-DNA	89	0,00273	0,00366	0,072 (-)
GO:0050434	regulação positiva da transcrição viral	54	0,00289	0,01184	0,059 (+)
GO:0042645	nucleóide mitocondrial	34	0,00308	0,00401	< 0,001 (+)
GO:0031332	complexo efector RNAi	8	0,00309	0,00603	0,001 (-)
GO:0009163	processo de biossíntese de nucleosídeos	41	0,00318	0,03938	0,016 (+)
GO:0035258	ligação a receptores de hormônios esteróides	55	0,00319	0,00033	0,015 (-)
GO:0016655	atividade oxidoredutase, agindo em NADH ou NADPH, quinona ou composto similar como aceitador	49	0,00341	0,00899	0,007 (-)
GO:0003724	atividade helicase do RNA	27	0,00346	0,00188	0,066 (-)
GO:0009295	nucleóide	35	0,00357	0,00284	< 0,001 (+)
GO:0000380	<i>splicing</i> do RNAm nuclear alternativo, via spliceossomo	14	0,00364	0,01376	0,128 (-)
GO:0006376	seleção do sítio de <i>splicing</i> do RNAm	8	0,00374	0,00125	0,038 (-)

GO:0016891	atividade endorribonuclease, produzindo 5'-fosfomonoésteres	23	0,00377	0,00066	0,017 (-)
GO:0000502	complexo proteassoma	61	0,00425	0,00001	0,347 (-)
GO:0055037	endossomo reciclador	57	0,00439	0,00743	0,003 (-)
GO:0006400	modificação do RNAt	15	0,00452	0,00657	0,002 (+)
GO:0030374	atividade co-ativadora de transcrição do receptor nuclear dependente de ligante	28	0,00458	0,01277	0,024 (-)
GO:0005884	filamento de actina	46	0,00465	0,01742	0,031 (-)
GO:0016469	complexo ATPase de dois setores de transporte de prótons	42	0,00469	0,00597	0,002 (-)
GO:0004540	atividade ribonuclease	52	0,00495	0,00189	0,001 (-)
GO:0043021	ligação de complexo ribonucleoproteico	38	0,00566	0,00081	0,071 (-)
GO:0005795	pilha de cisternas de Golgi	91	0,00597	0,00016	0,05 (+)
GO:0031072	ligação de proteínas de choque térmico	73	0,00602	0,0006	0,008 (+)
GO:0032592	integrante da membrana mitocondrial	24	0,00634	0,00282	< 0,001 (-)
GO:0031047	silenciamento gênico por RNA	41	0,00665	0,00306	0,13 (-)
GO:0009260	processo de biossíntese de ribonucleotídeos	79	0,00695	0,00405	0,045 (+)
GO:2000045	regulação da transição G1/S do ciclo celular mitótico	89	0,00707	0,00068	0,165 (-)
GO:0045022	transporte do endossomo precoce para o endossomo tardio	16	0,00717	0,00186	0,028 (-)
GO:0044665	complexo MLL1/2	27	0,00724	0,00002	0,024 (-)
GO:0003988	atividade da acetil-CoA C-aciltransferase	6	0,00734	0,00393	0,027 (+)
GO:0007033	organização de vacúolos	49	0,00759	0,00687	0,002 (+)
GO:0008334	processo metabólico de RNAm de histonas	22	0,00811	0,00306	0,098 (+)
GO:0061383	morfogênese da trabécula	24	0,00922	0,04613	0,003 (-)
GO:0022624	complexo acessório de proteassoma	11	0,00976	0,00474	0,009 (+)
GO:0030307	regulação positiva do crescimento celular	79	0,01006	0,03651	0,004 (-)
GO:0051225	montagem das fibras do fuso	28	0,01109	0,00254	0,044 (+)

GO:0030032	montagem de lamelipódios	28	0,01128	0,00381	0,008 (-)
GO:0007032	organização de endossomos	22	0,01138	0,01348	0,001 (+)
GO:0019205	atividade quinase de compostos contendo nucleobases	39	0,01166	0,00661	0,002 (+)
GO:0032055	regulação negativa da tradução em resposta ao estresse	6	0,01205	0,02507	0,001 (+)
GO:0006337	desmontagem de nucleossomos	15	0,0127	0,0267	< 0,001 (+)
GO:0031498	desmontagem da cromatina	15	0,0127	0,0267	< 0,001 (+)
GO:0032986	desmontagem do complexo proteína-DNA	15	0,0127	0,0267	< 0,001 (+)
GO:0071158	regulação positiva do bloqueio do ciclo celular	74	0,0129	0,00087	0,287 (-)
GO:0016681	atividade oxidorreductase, agindo em difenóis e substâncias relacionadas como doadores, citocromo como aceitador	5	0,01388	0,00048	< 0,001 (-)
GO:0009148	processo de biossíntese de trifosfato de nucleosídeo de pirimidina	17	0,01417	0,00179	0,015 (+)
GO:0009201	processo de biossíntese de trifosfato de ribonucleosídeo	56	0,0148	0,00039	0,126 (+)
GO:0043487	regulação da estabilidade do RNA	31	0,01509	0,01128	< 0,001 (+)
GO:0072401	transdução de sinal envolvida no <i>checkpoint</i> da integridade do DNA	63	0,01529	0,00132	0,486 (-)
GO:0072422	transdução de sinal envolvida no <i>checkpoint</i> de danos no DNA	63	0,01529	0,00132	0,486 (-)
GO:0000153	complexo citoplasmático ubiquitina ligase	6	0,0155	0,01903	0,002 (-)
GO:0009142	processo de biossíntese de trifosfato de nucleosídeo	60	0,01551	0,00083	0,177 (+)
GO:0042590	processamento de antígenos e apresentação de antígenos de peptídeos exógenos via MHC de classe I	72	0,01611	0,00263	0,375 (-)
GO:0008154	polimerização e despolimerização da actina	98	0,01631	0,01604	0,001 (-)
GO:0010591	regulação da montagem de lamelipódios	11	0,01655	0,00165	0,005 (-)
GO:0031571	<i>checkpoint</i> de danos no DNA na transição G1/S do ciclo celular mitótico	68	0,01663	0,00083	0,45 (-)
GO:0017048	ligação da GTPase Rho	45	0,01691	0,03114	0,002 (-)
GO:0000291	processo catabólico do RNAm transcrito no núcleo, exonucleolítico	22	0,01719	0,00476	0,177 (-)

GO:0032271	regulação da polimerização proteica	79	0,01726	0,00944	0,003 (-)
GO:0043488	regulação da estabilidade do RNAm	30	0,01742	0,02147	0,002 (+)
GO:0051436	regulação negativa da atividade ligase da proteína ubiquitina envolvida no ciclo celular mitótico	64	0,01759	0,00066	0,356 (+)
GO:0006241	processo de biossíntese de CTP	14	0,01796	0,00698	0,002 (+)
GO:0009209	processo de biossíntese de trifosfato de ribonucleosídeo de pirimidina	14	0,01796	0,00698	0,002 (+)
GO:0046036	processo metabólico de CTP	14	0,01796	0,00698	0,002 (+)
GO:0031122	organização de microtúbulos citoplasmáticos	10	0,01851	0,00112	0,053 (-)
GO:0009156	processo de biossíntese de monofosfato de ribonucleosídeo	32	0,01851	0,00442	0,033 (+)
GO:0016893	atividade endonuclease, ativa com ácidos ribo- ou desoxirribonucleico e produzindo fosfomonoésteres 5'	31	0,01899	0,00253	0,09 (-)
GO:0072395	transdução de sinal envolvida no <i>checkpoint</i> do ciclo celular	64	0,01915	0,0019	0,504 (+)
GO:0007040	organização de lisossomos	26	0,01979	0,04627	0,003 (+)
GO:0015985	energia acoplada ao transporte de prótons, a favor do gradiente eletroquímico	15	0,02013	0,00463	0,01 (-)
GO:0015986	síntese de ATP acoplada ao transporte de prótons	15	0,02013	0,00463	0,01 (-)
GO:0005072	receptor do fator de crescimento transformador beta, atividade mediadora citoplasmática	10	0,02029	0,0152	0,003 (-)
GO:0051352	regulação negativa da atividade ligase	69	0,02075	0,00048	0,43 (+)
GO:0051444	regulação negativa da atividade ligase da proteína ubiquitina	69	0,02075	0,00048	0,43 (+)
GO:0005793	compartimento intermediário entre retículo endoplasmático-Golgi	53	0,02082	0,00463	0,011 (+)
GO:0072413	transdução de sinal envolvida no <i>checkpoint</i> do ciclo celular mitótico	62	0,02174	0,00269	0,452 (-)
GO:0072431	transdução de sinal envolvida no <i>checkpoint</i> de danos no DNA na transição G1/S do ciclo celular mitótico	62	0,02174	0,00269	0,452 (-)
GO:0072474	transdução de sinal envolvida no <i>checkpoint</i> G1/S do ciclo celular mitótico	62	0,02174	0,00269	0,452 (-)
GO:0008064	regulação da polimerização e despolimerização da actina	74	0,0245	0,02821	0,003 (-)

GO:0009208	processo metabólico de trifosfato de ribonucleosídeo de pirimidina	15	0,0247	0,01573	0,004 (+)
GO:0045604	regulação da diferenciação de células da epiderme	16	0,02688	0,02034	0,004 (+)
GO:0031575	<i>checkpoint</i> da transição G1/S do ciclo celular mitótico	76	0,02742	0,00316	0,355 (-)
GO:0032762	produção de citocinas por mastócitos	5	0,02778	0,13248	0,002 (-)
GO:0070925	montagem de organelas	74	0,02779	0,00194	0,069 (+)
GO:0072404	transdução de sinal envolvida no <i>checkpoint</i> da transição G1/S	63	0,02784	0,00362	0,471 (-)
GO:0042787	ubiquitinação proteica envolvida em processo catabólico de proteínas dependente de ubiquitina	53	0,02835	0,00063	0,122 (-)
GO:0034134	via de sinalização de receptores do tipo toll 2	67	0,02909	0,00152	0,013 (-)
GO:0030832	regulação do comprimento de filamentos de actina	75	0,02931	0,03149	0,003 (-)
GO:0016679	atividade oxidorreductase, agindo em difenóis e substâncias relacionadas como doadores	6	0,02963	0,00512	< 0,001 (-)
GO:0031304	intrínseco à membrana interna mitocondrial	9	0,0306	0,02357	0,003 (-)
GO:0061136	regulação do processo catabólico de proteínas no proteassoma	53	0,031	0,00063	0,078 (-)
GO:0032434	regulação do processo catabólico de proteínas no proteassoma dependente de ubiquitina	44	0,0339	0,00132	0,072 (-)
GO:0031397	regulação negativa da ubiquitinação de proteínas	86	0,03419	0,00097	0,481 (+)
GO:0060768	regulação da proliferação de células epiteliais envolvidas no desenvolvimento da glândula da próstata	10	0,03602	0,00277	0,068 (-)
GO:0060767	proliferação de células epiteliais envolvidas no desenvolvimento da glândula da próstata	11	0,0385	0,00448	0,138 (-)
GO:0070897	montagem do complexo de pré-iniciação transcricional dependente de DNA	7	0,03859	0,09882	0,003 (-)
GO:0010340	atividade carboxil-O-metiltransferase	5	0,0386	0,0069	0,002 (+)
GO:0051998	atividade carboxil-O-metiltransferase em proteína	5	0,0386	0,0069	0,002 (+)
GO:0018105	fosforilação de peptidil-serina	95	0,04009	0,09761	0,002 (-)
GO:0032273	regulação positiva da polimerização de proteínas	39	0,04101	0,06979	< 0,001 (-)

GO:0051439	regulação da atividade ligase da proteína ubiquitina envolvida no ciclo celular mitótico	72	0,0428	0,00322	0,402 (+)
GO:0006261	replicação do DNA dependente de DNA	76	0,04399	0,00173	0,237 (+)
GO:0001522	síntese de pseudouridina	12	0,04489	0,0916	< 0,001 (+)
GO:0008171	atividade O-metiltransferase	10	0,04682	0,0117	0,001 (+)
GO:0051438	regulação da atividade ligase da proteína ubiquitina	89	0,04706	0,00094	0,335 (+)
GO:0043371	regulação negativa da diferenciação de células T alpha-beta CD4-positivas	7	0,04722	0,0795	0,004 (-)
GO:0045623	regulação negativa da diferenciação de células T auxiliares	7	0,04722	0,0795	0,004 (-)
GO:0009206	processo de biossíntese de trifosfato de ribonucleosídeo de purina	51	0,04734	0,00083	0,129 (-)
GO:0002755	via de sinalização de receptores do tipo toll dependente de MyD88	70	0,05143	0,004	0,013 (-)
GO:0016866	atividade transferase intramolecular	23	0,05304	0,04811	0,003 (+)
GO:0051437	regulação positiva da atividade ligase da proteína ubiquitina envolvida no ciclo celular mitótico	67	0,05458	0,0046	0,365 (+)
GO:0006370	adição do <i>cap</i> 7-metil-guanosina ao RNAm	28	0,05669	0,13785	< 0,001 (+)
GO:0051443	regulação positiva da atividade ligase da proteína ubiquitina	77	0,05685	0,00251	0,236 (+)
GO:0009452	adição do <i>cap</i> 7-metil-guanosina ao RNA	31	0,05701	0,21588	< 0,001 (+)
GO:0036260	Adição do <i>cap</i> ao RNA	31	0,05701	0,21588	< 0,001 (+)
GO:0000303	resposta ao superóxido	16	0,05755	0,00574	0,004 (-)
GO:0060251	regulação da proliferação de células da glia	13	0,05785	0,00493	0,095 (+)
GO:0045275	complexo III da cadeia respiratória	5	0,05904	0,00054	0,055 (+)
GO:0009145	processo de biossíntese de trifosfato de nucleosídeo de purina	52	0,05946	0,00191	0,148 (-)
GO:0051340	regulação da atividade ligase	93	0,0631	0,00297	0,293 (+)
GO:0060216	hematopoiese definitiva	12	0,06705	0,00117	0,006 (-)
GO:0016832	atividade aldeído-liase	6	0,06856	0,20311	0,003 (+)

GO:0008173	atividade metiltransferase no RNA	20	0,07468	0,02131	0,004 (+)
GO:0006013	processo metabólico de manose	8	0,08142	0,16635	0,003 (+)
GO:2000757	regulação negativa da acetilação de peptidil-lisina	9	0,08207	0,04572	0,003 (+)
GO:0005791	retículo endoplasmático rugoso	36	0,08276	0,03424	0,002 (-)
GO:0030838	regulação positiva da polimerização de filamentos de actina	27	0,08388	0,07913	0,003 (-)
GO:0045616	regulação da diferenciação de queratinócitos	13	0,10017	0,071	< 0,001 (+)
GO:0060632	regulação de movimento baseado em microtúbulos	7	0,13143	0,00449	0,12 (-)
GO:2000074	regulação do desenvolvimento das células pancreáticas do tipo B	5	0,13894	0,44909	0,003 (-)
GO:0045682	regulação do desenvolvimento da epiderme	27	0,15225	0,16614	0,004 (+)
GO:0016423	atividade metiltransferase do RNAt (guanina)	5	0,16722	0,01677	0,001 (+)
GO:2000311	regulação da atividade do receptor de glutamato seletivo para propionato de alfa-amino-3-hidróxi-5-metil-4-isoxazole	17	0,1675	0,09621	0,001 (+)
GO:0071956	manutenção de componente celular ao nível celular	11	0,16758	0,16021	0,002 (+)
GO:0000394	<i>splicing</i> do RNA, via clivagem endonucleolítica e ligação	6	0,16899	0,00232	0,167 (+)
GO:0006388	<i>splicing</i> do RNAt, via clivagem endonucleolítica e ligação	6	0,16899	0,00232	0,167 (+)
GO:0008175	atividade metiltransferase do RNAt	7	0,17349	0,01081	0,004 (+)
GO:0051131	montagem de complexo proteico mediado por chaperonas	12	0,17745	0,24379	0,003 (+)
GO:0006801	processo metabólico do superóxido	39	0,18397	0,18723	0,002 (-)
GO:0045628	regulação da diferenciação de células T auxiliares tipo 2	8	0,21039	0,00498	0,192 (+)
GO:0043064	organização de flagelo	7	0,22057	0,07472	0,002 (+)
GO:0032104	regulação da resposta a estímulos extracelulares	31	0,25814	0,04091	0,003 (+)
GO:0032107	regulação da resposta aos níveis de nutrientes	31	0,25814	0,04091	0,003 (+)
GO:0048010	via de sinalização do receptor do fator de crescimento endotelial vascular	39	0,29317	0,19535	0,004 (+)

ANEXO L: Termos de *Gene Ontology* estatisticamente enriquecidos e/ou estatisticamente significativos em pacientes DM2 descompensados *versus* compensados. Valores de p em *itálico* apresentam diferença estatística ($p < 0,005$). Os sinais (+) e (-) indicam que o termo correspondente está induzido ou reprimido em pacientes DM2 descompensados. O termo destacado em **negrito** foi selecionado para discussão.

GO	Descrição da GO	Número de genes	Valor de p da permutação LS	Valor de p da permutação KS	Valor de p to teste GSA Efron-Tibshirani
GO:0032490	detecção de moléculas de origem bacteriana	7	<i>0,00004</i>	<i>0,00027</i>	0,01 (-)
GO:0032649	regulação da produção de interferon-gamma	51	<i>0,00018</i>	<i>0,00038</i>	0,007 (-)
GO:0009595	detecção de estímulos bióticos	18	<i>0,00026</i>	<i>0,00176</i>	0,015 (-)
GO:0002695	regulação negativa da ativação de leucócitos	83	<i>0,00029</i>	<i>0,00036</i>	0,03 (+)
GO:0044058	regulação do processo do sistema digestivo	17	<i>0,00032</i>	<i>0,00738</i>	$< 0,001$ (-)
GO:0047555	atividade fosfodiesterase 3',5'-GMP-cíclico	9	<i>0,00032</i>	0,02264	$< 0,001$ (+)
GO:0048259	regulação de endocitose mediada por receptor	36	<i>0,00039</i>	<i>0,00368</i>	$< 0,001$ (-)
GO:0050866	regulação negativa da ativação celular	91	<i>0,00056</i>	<i>0,00086</i>	0,027 (+)
GO:0032609	produção de interferon-gamma	56	<i>0,00062</i>	<i>0,00187</i>	0,009 (-)
GO:0001952	regulação da adesão célula-matriz	55	<i>0,00063</i>	0,03145	0,036 (+)
GO:0042116	ativação de macrófagos	35	<i>0,00064</i>	<i>0,0001</i>	<i>0,003</i> (-)
GO:0052552	modulação por organismo da resposta imune de outro organismo envolvido em interação simbiótica	5	<i>0,00065</i>	<i>0,00053</i>	<i>0,003</i> (-)
GO:0052553	modulação pelo simbionte da resposta imune do hospedeiro	5	<i>0,00065</i>	<i>0,00053</i>	<i>0,003</i> (-)
GO:0052555	regulação positiva por organismo da resposta imune de outro organismo envolvido em interação simbiótica	5	<i>0,00065</i>	<i>0,00053</i>	<i>0,003</i> (-)
GO:0052556	regulação positiva pelo simbionte da resposta imune do hospedeiro	5	<i>0,00065</i>	<i>0,00053</i>	<i>0,003</i> (-)
GO:0042088	resposta imune das células T auxiliares do tipo 1	28	<i>0,00072</i>	<i>0,00274</i>	<i>0,003</i> (-)

GO:0015665	atividade de transporte transmembrana de álcool	9	0,00073	0,04309	0,008 (+)
GO:0048260	regulação positiva de endocitose mediada por receptor	25	0,0008	0,01788	< 0,001 (-)
GO:0010810	regulação da adesão célula-substrato	89	0,00109	0,02525	0,011 (+)
GO:0052564	resposta à resposta imune de outro organismo envolvido em interação simbiótica	6	0,00116	0,00382	0,002 (-)
GO:0052572	resposta à resposta imune do hospedeiro	6	0,00116	0,00382	0,002 (-)
GO:0002281	ativação de macrófagos envolvidos em resposta imune	11	0,00117	0,00317	0,005 (-)
GO:0015166	atividade de transporte transmembrana de poliol	5	0,00142	0,02632	0,038 (-)
GO:0015168	atividade de transporte transmembrana de glicerol	5	0,00142	0,02632	0,038 (-)
GO:0030276	ligação da clatrina	9	0,00146	0,00053	0,017 (-)
GO:0032675	regulação da produção de interleucina-6	55	0,00154	0,01741	0,001 (-)
GO:0042108	regulação positiva do processo de biossíntese de citocinas	57	0,00158	0,04884	0,011 (-)
GO:0002700	regulação da produção de mediadores moleculares da resposta imune	58	0,00162	0,00104	0,007 (-)
GO:0001570	vasculogênese	59	0,00169	0,00155	0,019 (-)
GO:0032602	produção de quimiocinas	45	0,0017	0,00007	< 0,001 (-)
GO:0045807	regulação positiva de endocitose	63	0,0017	0,01561	0,006 (-)
GO:0031201	complexo SNARE	22	0,00185	0,00381	0,046 (+)
GO:0001954	regulação positiva da adesão célula-matriz	25	0,00195	0,04469	0,018 (+)
GO:0009581	detecção de estímulos externos	69	0,00204	0,00887	0,054 (-)
GO:0045766	regulação positiva da angiogênese	73	0,00205	0,02846	0,058 (-)
GO:0008277	regulação da via de sinalização da proteína do receptor acoplado à proteína G	93	0,00212	0,01572	0,055 (-)
GO:0032642	regulação da produção de quimiocinas	43	0,00228	0,00028	< 0,001 (-)
GO:0050869	regulação negativa da ativação de células B	25	0,00238	0,00833	0,129 (-)
GO:0042035	regulação do processo de biossíntese de citocinas	87	0,00255	0,0508	0,021 (-)

GO:0045123	extravasamento celular	20	0,00259	0,01875	0,02 (-)
GO:0043647	processo metabólico de inositol fosfato	24	0,00268	0,10388	0,01 (-)
GO:0048286	desenvolvimento do alvéolo pulmonar	32	0,00285	0,01003	< 0,001 (-)
GO:0002685	regulação da migração de leucócitos	76	0,0032	0,00171	0,006 (-)
GO:0002029	dessensibilização da via de sinalização da proteína do receptor acoplado à proteína G	14	0,00332	0,00435	0,038 (-)
GO:0022401	adaptação negativa da via de sinalização	14	0,00332	0,00435	0,038 (-)
GO:0023058	adaptação da via de sinalização	14	0,00332	0,00435	0,038 (-)
GO:0032096	regulação negativa da resposta a alimentos	9	0,0034	0,00898	0,07 (+)
GO:0032493	resposta a lipoproteínas bacterianas	5	0,00341	0,01946	0,023 (-)
GO:0070339	resposta a lipopeptídeos bacterianos	5	0,00341	0,01946	0,023 (-)
GO:0071220	resposta celular a lipoproteínas bacterianas	5	0,00341	0,01946	0,023 (-)
GO:0071221	resposta celular a lipopeptídeos bacterianos	5	0,00341	0,01946	0,023 (-)
GO:0032635	produção de interleucina-6	57	0,00365	0,05647	< 0,001 (-)
GO:0051250	regulação negativa da ativação de linfócitos	72	0,0037	0,00338	0,048 (+)
GO:0009066	processo metabólico de aminoácidos da família do aspartato	30	0,00375	0,01483	0,001 (+)
GO:0005104	ligação do receptor do fator de crescimento de fibroblastos	19	0,00379	0,02427	0,044 (-)
GO:0045620	regulação negativa da diferenciação de linfócitos	25	0,00387	0,00727	0,088 (+)
GO:0006553	processo metabólico de lisina	8	0,004	0,01758	0,006 (+)
GO:0006554	processo catabólico de lisina	8	0,004	0,01758	0,006 (+)
GO:0060713	morfogênese da camada labiríntica	16	0,0041	0,08164	0,003 (-)
GO:0009593	detecção de estímulos químicos	66	0,00422	0,01706	0,018 (-)
GO:0004114	atividade fosfodiesterase 3',5'-nucleotídeo-cíclico	22	0,00423	0,10932	< 0,001 (+)
GO:0071353	resposta celular à interleucina-4	8	0,00429	0,01663	0,02 (+)

GO:0006884	homeostase do volume celular	12	0,00429	0,03661	0,002 (-)
GO:0060462	desenvolvimento do lóbulo pulmonar	6	0,00432	0,02724	0,058 (+)
GO:0060463	morfogênese do lóbulo pulmonar	6	0,00432	0,02724	0,058 (+)
GO:0070374	regulação positiva da cascata de ERK1 e ERK2	75	0,00466	0,09245	0,009 (-)
GO:0045682	regulação do desenvolvimento da epiderme	27	0,00473	0,11384	0,02 (-)
GO:0052031	modulação pelo simbionte de resposta de defesa do hospedeiro	7	0,00482	0,01184	0,011 (-)
GO:0052255	modulação por organismo da resposta de defesa de outro organismo envolvido em interação simbiótica	7	0,00482	0,01184	0,011 (-)
GO:0052509	regulação positiva pelo simbionte da resposta de defesa do hospedeiro	7	0,00482	0,01184	0,011 (-)
GO:0052510	regulação positiva por organismo da resposta de defesa de outro organismo envolvido em interação simbiótica	7	0,00482	0,01184	0,011 (-)
GO:0032878	regulação do estabelecimento ou da manutenção da polaridade celular	11	0,00486	0,02943	0,053 (-)
GO:0051767	processo de biossíntese de óxido nítrico sintetase	10	0,00537	0,00267	0,033 (-)
GO:0051769	regulação do processo de biossíntese de óxido nítrico sintetase	10	0,00537	0,00267	0,033 (-)
GO:0046880	regulação da secreção do hormônio folículo estimulante	6	0,00581	0,03819	0,002 (+)
GO:0050707	regulação da secreção de citocinas	64	0,00598	0,00854	0,003 (-)
GO:0048745	desenvolvimento do tecido muscular liso	17	0,00631	0,00915	< 0,001 (-)
GO:0002053	regulação positiva da proliferação de células mesenquimais	28	0,00642	0,00409	0,009 (-)
GO:0060053	neurofilamento do citoesqueleto	9	0,00661	0,00273	0,059 (-)
GO:0009068	processo catabólico de aminoácidos da família do aspartato	14	0,00737	0,07176	0,004 (+)
GO:0051023	regulação da secreção de imunoglobulinas	10	0,00797	0,00027	0,045 (+)
GO:0004112	atividade fosfodiesterase de nucleotídeo-cíclico	23	0,00809	0,16055	< 0,001 (+)
GO:0033210	via de sinalização mediada por leptina	5	0,00816	0,01792	0,001 (+)
GO:0090022	regulação da quimiotaxia de neutrófilos	17	0,00849	0,0048	0,031 (-)

GO:0002440	produção de mediadores moleculares da resposta imune	86	0,00937	0,00223	0,092 (-)
GO:0060711	desenvolvimento da camada labiríntica	31	0,01063	0,12592	0,003 (-)
GO:0008172	atividade de S-metiltransferase	6	0,01162	0,00147	0,006 (+)
GO:0051150	regulação da diferenciação de células musculares lisas	10	0,01234	0,00819	0,003 (-)
GO:0002367	produção de citocinas envolvidas na resposta imune	39	0,01425	0,01845	< 0,001 (-)
GO:0030183	diferenciação de células B	63	0,01431	0,04488	0,001 (+)
GO:0048305	secreção de imunoglobulinas	12	0,01501	0,00082	0,086 (+)
GO:0050663	secreção de citocinas	75	0,01817	0,00198	0,004 (-)
GO:0042033	processo de biossíntese de quimiocinas	13	0,01917	0,00147	0,004 (-)
GO:0002718	regulação da produção de citocinas envolvidas na resposta imune	35	0,01947	0,09618	< 0,001 (-)
GO:0032276	regulação da secreção de gonadotropinas	8	0,02288	0,15633	0,001 (+)
GO:0060334	regulação da via de sinalização mediada por interferon-gamma	23	0,0233	0,0013	0,133 (-)
GO:0006809	processo de biossíntese do óxido nítrico	45	0,02456	0,00341	0,006 (-)
GO:0005771	corpo multivesicular	24	0,02482	0,20857	0,003 (-)
GO:0070091	secreção de glucagon	6	0,02498	0,00247	0,062 (+)
GO:0035004	atividade fosfatidilinositol 3-quinase	10	0,0251	0,02808	< 0,001 (+)
GO:0060330	regulação da resposta ao interferon-gamma	24	0,02516	0,00083	0,135 (-)
GO:0045073	regulação do processo de biossíntese de quimiocinas	12	0,02732	0,00311	0,009 (-)
GO:0002698	regulação negativa do processo imune efetor	40	0,02828	0,00346	0,001 (-)
GO:0050706	regulação da secreção de interleucina-1 beta	16	0,0286	0,00327	0,036 (-)
GO:0001959	regulação de vias de sinalização mediadas por citocinas	71	0,02878	0,00287	0,031 (-)
GO:0060759	regulação da resposta ao estímulo de citocinas	77	0,02938	0,00108	0,036 (-)
GO:0050755	processo metabólico de quimiocinas	14	0,03036	0,00495	0,006 (-)
GO:0015245	atividade de transporte de ácidos graxos	9	0,03622	0,03094	0,002 (-)

GO:0001890	desenvolvimento da placenta	96	0,03737	0,20914	< 0,001 (-)
GO:0050701	secreção de interleucina-1	23	0,03825	0,0011	0,018 (-)
GO:0045080	regulação positiva do processo de biossíntese de quimiocinas	10	0,03846	0,00182	0,02 (-)
GO:2000300	regulação da exocitose das vesículas sinápticas	6	0,03959	0,36604	0,003 (-)
GO:0045428	regulação do processo de biossíntese de óxido nítrico	39	0,04334	0,00355	0,004 (-)
GO:0048284	fusão de organelas	31	0,04661	0,07102	0,004 (-)
GO:0050702	secreção de interleucina-1 beta	20	0,0479	0,00232	0,027 (-)
GO:0050892	absorção intestinal	19	0,04823	0,04539	0,001 (-)
GO:0030801	regulação positiva do processo metabólico de nucleotídeo cíclico	60	0,05032	0,00401	0,22 (+)
GO:0007286	desenvolvimento de espermátides	62	0,0539	0,02646	0,003 (+)
GO:0051145	diferenciação de células musculares lisas	31	0,05629	0,07237	0,001 (-)
GO:0001961	regulação positiva de vias de sinalização mediadas por citocinas	13	0,05845	0,15603	0,004 (-)
GO:0060760	regulação positiva da resposta ao estímulo de citocinas	14	0,05919	0,17878	0,001 (-)
GO:0045981	regulação positiva do processo metabólico de nucleotídeos	61	0,05978	0,00338	0,23 (+)
GO:1900544	regulação positiva do processo metabólico de nucleotídeos de purina	61	0,05978	0,00338	0,23 (+)
GO:2001212	regulação da vasculogênese	6	0,06248	0,08558	< 0,001 (-)
GO:0044320	resposta celular ao estímulo de leptinas	8	0,07259	0,24444	0,001 (+)
GO:0044321	resposta ao estímulo de leptinas	8	0,07259	0,24444	0,001 (+)
GO:0031348	regulação negativa da resposta de defesa	72	0,08436	0,00166	0,077 (-)
GO:0000188	inativação da atividade MAPK	24	0,09139	0,00341	0,036 (-)
GO:0050728	regulação negativa da resposta inflamatória	59	0,10647	0,00199	0,104 (-)
GO:0002673	regulação da resposta inflamatória aguda	47	0,12861	0,00369	0,157 (-)
GO:0002674	regulação negativa da resposta inflamatória aguda	8	0,16393	0,00295	0,116 (+)

GO:0006282	regulação do reparo do DNA	39	0,20336	0,03435	0,002 (+)
GO:0003073	regulação da pressão sanguínea arterial sistêmica	51	0,33871	0,02743	0,001 (-)
GO:0007131	recombinação meiótica recíproca	31	0,35774	0,05994	0,002 (+)
GO:0035825	recombinação do DNA recíproca	31	0,35774	0,05994	0,002 (+)

ANEXO M: microRNAs diferencialmente expressos em pacientes DM2 compensados comparados aos controles. PFP: predição de dados falso-positivos.

Compensado versus Controle			
microRNAs	Fold Change	Valor de p	PFP
ebv-miR-BART19-3p	1,28	6,0E-04	3,7E-02
hcmv-miR-UL36	-1,30	7,0E-04	4,5E-02
hcmv-miR-US25-2-5p	-1,32	1,5E-04	1,2E-02
hsa-let-7a	-1,28	6,0E-04	4,2E-02
hsa-let-7c*	-1,34	2,0E-04	1,9E-02
hsa-let-7d	-1,30	6,0E-04	4,3E-02
hsa-let-7f	-1,34	3,0E-04	2,3E-02
hsa-miR-1	-1,36	1,5E-04	1,4E-02
hsa-miR-101	1,44	0,0E+00	2,4E-03
hsa-miR-107	-1,46	0,0E+00	4,6E-03
hsa-miR-10a*	1,59	1,0E-04	6,9E-03
hsa-miR-1246	1,31	9,0E-04	4,7E-02
hsa-miR-126	-1,47	0,0E+00	1,9E-03
hsa-miR-126*	-1,24	4,5E-04	3,1E-02
hsa-miR-1260	1,46	0,0E+00	1,4E-03
hsa-miR-1274a	1,34	0,0E+00	5,6E-03
hsa-miR-1274b	1,27	9,0E-04	4,8E-02
hsa-miR-1288	-1,26	5,0E-04	3,7E-02
hsa-miR-1299	1,49	4,0E-04	3,1E-02
hsa-miR-1305	-1,35	0,0E+00	4,7E-03
hsa-miR-1308	1,30	4,0E-04	2,7E-02
hsa-miR-130a	-1,47	0,0E+00	8,0E-04
hsa-miR-133b	-1,36	3,0E-04	2,5E-02
hsa-miR-135b	-1,29	2,0E-04	1,8E-02
hsa-miR-136	1,23	2,5E-04	2,2E-02
hsa-miR-140-3p	1,31	6,0E-04	3,5E-02
hsa-miR-142-3p	1,55	0,0E+00	5,0E-04
hsa-miR-142-5p	1,34	1,0E-04	1,4E-02
hsa-miR-144	-1,17	4,5E-04	3,2E-02
hsa-miR-144*	-1,36	1,0E-04	1,0E-02
hsa-miR-146a	1,29	7,0E-04	4,2E-02
hsa-miR-146b-5p	1,30	5,0E-04	3,1E-02
hsa-miR-148b	-1,36	2,5E-04	2,0E-02
hsa-miR-150	1,29	1,0E-04	1,0E-02
hsa-miR-151-3p	-1,34	3,0E-04	2,6E-02
hsa-miR-151-5p	-1,45	0,0E+00	3,8E-03
hsa-miR-155	1,34	2,0E-04	1,5E-02
hsa-miR-15a	1,31	9,0E-04	4,7E-02
hsa-miR-17	-1,34	3,0E-04	2,7E-02
hsa-miR-185	-1,33	5,5E-04	3,7E-02
hsa-miR-186	1,35	2,0E-04	1,9E-02
hsa-miR-18a	-1,34	3,5E-04	2,9E-02
hsa-miR-1914*	-1,28	4,0E-04	2,8E-02
hsa-miR-199a-3p	-1,43	0,0E+00	4,0E-03
hsa-miR-199a-5p	-1,45	0,0E+00	2,9E-03
hsa-miR-199b-5p	1,32	3,5E-04	2,6E-02
hsa-miR-21	1,27	7,0E-04	4,0E-02
hsa-miR-21*	1,30	9,0E-04	4,9E-02
hsa-miR-22	-1,31	4,0E-04	3,1E-02
hsa-miR-222	1,32	2,0E-04	1,7E-02
hsa-miR-223	-1,29	2,5E-04	2,1E-02
hsa-miR-224	-1,36	1,0E-04	1,4E-02
hsa-miR-23a*	-1,35	1,0E-04	1,4E-02
hsa-miR-23b	-1,40	1,0E-04	1,3E-02
hsa-miR-25	1,19	9,0E-04	4,9E-02

hsa-miR-26a	1,37	0,0E+00	5,4E-03
hsa-miR-27b	-1,40	1,0E-04	8,4E-03
hsa-miR-29a	1,31	4,0E-04	2,8E-02
hsa-miR-29b	1,59	0,0E+00	4,0E-04
hsa-miR-29c	1,31	5,0E-04	3,5E-02
hsa-miR-302b	1,36	1,0E-04	9,4E-03
hsa-miR-302e	1,31	9,0E-04	4,8E-02
hsa-miR-30b	1,32	1,0E-04	1,5E-02
hsa-miR-30e	1,34	2,5E-04	2,1E-02
hsa-miR-32	1,37	1,0E-04	9,7E-03
hsa-miR-338-3p	1,39	1,0E-04	8,7E-03
hsa-miR-33a	1,28	6,0E-04	3,6E-02
hsa-miR-342-3p	1,29	4,0E-04	2,6E-02
hsa-miR-342-5p	1,25	7,0E-04	4,2E-02
hsa-miR-376a	1,06	2,0E-04	1,6E-02
hsa-miR-376c	1,05	6,5E-04	4,0E-02
hsa-miR-378	1,32	3,0E-04	2,7E-02
hsa-miR-410	-1,08	7,0E-04	4,3E-02
hsa-miR-424	1,49	0,0E+00	8,0E-04
hsa-miR-450a	1,33	6,0E-04	3,9E-02
hsa-miR-451	-1,94	0,0E+00	0,0E+00
hsa-miR-486-5p	-1,44	0,0E+00	4,3E-03
hsa-miR-494	1,26	3,0E-04	2,5E-02
hsa-miR-504	1,41	7,0E-04	4,0E-02
hsa-miR-545*	1,27	7,0E-04	4,3E-02
hsa-miR-548c-3p	1,72	0,0E+00	0,0E+00
hsa-miR-548f	1,45	0,0E+00	1,9E-03
hsa-miR-548g	1,29	5,0E-04	3,5E-02
hsa-miR-551b	-1,38	4,0E-04	2,8E-02
hsa-miR-570	1,42	5,0E-04	3,2E-02
hsa-miR-575	-1,27	6,5E-04	4,4E-02
hsa-miR-582-5p	1,34	1,5E-04	1,4E-02
hsa-miR-584	-1,35	2,5E-04	2,1E-02
hsa-miR-603	1,29	7,0E-04	4,3E-02
hsa-miR-625	-1,43	0,0E+00	5,5E-03
hsa-miR-641	1,99	0,0E+00	2,0E-04
hsa-miR-720	1,33	3,0E-04	2,3E-02
hsa-miR-886-3p	1,74	0,0E+00	1,8E-03
hsa-miR-923	1,48	0,0E+00	5,0E-04
hsa-miR-93*	1,47	2,0E-04	1,8E-02
kshv-miR-K12-2	1,40	1,0E-04	1,0E-02
kshv-miR-K12-4-5p	1,48	6,0E-04	4,0E-02

ANEXO N: microRNAs diferencialmente expressos em pacientes DM2 descompensados comparados aos controles. PFP: predição de dados falso-positivos.

Descompensado versus Controle			
microRNAs	Fold Change	Valor de p	PFP
hcmv-miR-US25-2-5p	-1,32	1,0E-04	1,5E-02
hsa-let-7e	-1,32	6,0E-04	4,9E-02
hsa-miR-1	-1,45	0,0E+00	7,2E-03
hsa-miR-107	-1,51	3,0E-04	3,3E-02
hsa-miR-126	-1,58	0,0E+00	1,6E-03
hsa-miR-126*	-1,43	5,0E-05	7,9E-03

hsa-miR-1260	1,38	1,0E-04	1,9E-02
hsa-miR-1305	-1,20	1,0E-04	1,5E-02
hsa-miR-130a	-1,50	0,0E+00	5,6E-03
hsa-miR-140-3p	1,40	1,5E-04	2,7E-02
hsa-miR-142-3p	1,36	0,0E+00	7,3E-03
hsa-miR-142-5p	1,40	0,0E+00	9,5E-03
hsa-miR-144	1,16	1,0E-04	2,5E-02
hsa-miR-146a	1,29	3,0E-04	4,4E-02
hsa-miR-150	1,37	1,0E-04	1,9E-02
hsa-miR-151-3p	-1,41	1,5E-04	1,9E-02
hsa-miR-151-5p	-1,41	4,0E-04	4,0E-02
hsa-miR-155	1,33	2,0E-04	3,7E-02
hsa-miR-17	-1,34	5,0E-04	4,5E-02
hsa-miR-181a	1,31	3,0E-04	4,2E-02
hsa-miR-185	-1,37	3,0E-04	3,2E-02
hsa-miR-186	1,40	1,0E-04	1,9E-02
hsa-miR-18a	-1,36	4,5E-04	4,3E-02
hsa-miR-199a-3p	-1,74	0,0E+00	5,5E-04
hsa-miR-199a-5p	-1,67	0,0E+00	1,3E-03
hsa-miR-221	-1,42	4,0E-04	4,0E-02
hsa-miR-222	1,47	5,0E-05	1,3E-02
hsa-miR-223	-1,42	1,0E-04	1,5E-02
hsa-miR-26a	1,44	0,0E+00	8,7E-03
hsa-miR-27b	-1,40	3,0E-04	3,0E-02
hsa-miR-29a	1,40	1,0E-04	2,4E-02
hsa-miR-29b	1,40	0,0E+00	9,1E-03
hsa-miR-29c	1,43	0,0E+00	1,0E-02
hsa-miR-30e	1,42	1,0E-04	1,9E-02
hsa-miR-31	1,29	2,5E-04	3,5E-02
hsa-miR-335	-1,40	4,0E-04	3,8E-02
hsa-miR-342-3p	1,39	1,5E-04	2,6E-02
hsa-miR-342-5p	1,23	3,0E-04	3,7E-02
hsa-miR-361-3p	1,39	1,0E-04	2,2E-02
hsa-miR-374b	-1,52	1,0E-04	1,8E-02
hsa-miR-376a	-1,29	0,0E+00	7,0E-03
hsa-miR-376c	-1,27	1,0E-04	1,9E-02
hsa-miR-377	-1,28	3,0E-04	3,1E-02
hsa-miR-410	-1,31	3,0E-04	3,1E-02
hsa-miR-424	1,42	0,0E+00	8,4E-03
hsa-miR-432	-1,37	3,0E-04	3,0E-02
hsa-miR-451	-1,36	0,0E+00	1,1E-03
hsa-miR-483-3p	1,31	3,0E-04	4,3E-02
hsa-miR-494	1,52	0,0E+00	1,2E-02
hsa-miR-548c-3p	1,25	2,0E-04	3,6E-02
hsa-miR-548f	1,34	1,0E-04	2,4E-02
hsa-miR-551b	-1,40	2,0E-04	2,3E-02
hsa-miR-744	-1,40	5,0E-04	4,5E-02
hsa-miR-923	1,56	0,0E+00	1,8E-03

ANEXO O: microRNAs diferencialmente expressos em pacientes DM2 descompensados comparados aos compensados. PFP: predição de dados falso-positivos.

Descompensado versus Compensado			
microRNAs	<i>Fold Change</i>	Valor de p	PFP
ebv-miR-BART9	1,38	3,0E-04	5,0E-02
hsa-let-7c	-1,44	0,0E+00	1,2E-02
hsa-let-7e*	1,36	3,0E-04	5,0E-02
hsa-miR-1	-1,29	3,0E-04	3,5E-02
hsa-miR-101	-1,35	1,0E-04	2,1E-02
hsa-miR-107	1,36	3,0E-04	5,0E-02
hsa-miR-10a*	-1,56	4,0E-04	4,0E-02
hsa-miR-1180	-1,38	2,0E-04	2,3E-02
hsa-miR-1224-3p	1,39	2,0E-04	4,0E-02
hsa-miR-1252	-1,37	1,0E-04	2,1E-02
hsa-miR-126*	-1,42	1,0E-04	1,7E-02
hsa-miR-1260	-1,39	1,0E-04	1,4E-02
hsa-miR-1274a	-1,47	1,0E-04	1,6E-02
hsa-miR-1305	1,31	1,0E-04	3,0E-02
hsa-miR-1307	-1,43	5,0E-05	1,4E-02
hsa-miR-130a	1,18	1,5E-04	3,5E-02
hsa-miR-130a*	1,36	3,0E-04	5,0E-02
hsa-miR-136	-1,39	1,0E-04	1,9E-02
hsa-miR-142-3p	-1,39	5,0E-05	1,1E-02
hsa-miR-144	1,24	0,0E+00	2,6E-02
hsa-miR-144*	1,39	2,0E-04	4,5E-02
hsa-miR-146b-5p	-1,34	2,0E-04	2,3E-02
hsa-miR-148a	-1,52	0,0E+00	7,6E-03
hsa-miR-148b	-1,38	2,0E-04	2,5E-02
hsa-miR-150	1,44	1,0E-04	2,0E-02
hsa-miR-151-5p	1,26	2,0E-04	4,6E-02
hsa-miR-17	-1,36	3,0E-04	3,1E-02
hsa-miR-181a	1,39	2,0E-04	4,4E-02
hsa-miR-181d	-1,40	1,0E-04	1,6E-02
hsa-miR-18a	-1,36	5,0E-04	4,8E-02
hsa-miR-1909	-1,47	2,0E-04	2,7E-02
hsa-miR-1914	1,36	3,0E-04	5,1E-02
hsa-miR-199a-3p	-1,31	2,5E-04	3,0E-02
hsa-miR-199a-5p	-1,34	0,0E+00	1,1E-02
hsa-miR-19a	-1,37	4,0E-04	4,0E-02
hsa-miR-200c*	1,37	3,0E-04	4,9E-02
hsa-miR-20b	-1,40	1,0E-04	1,8E-02
hsa-miR-21	-1,39	1,5E-04	2,3E-02
hsa-miR-22	1,33	3,0E-04	5,1E-02
hsa-miR-221	-1,37	3,0E-04	3,1E-02
hsa-miR-222*	1,38	2,0E-04	4,8E-02
hsa-miR-223	-1,33	3,0E-04	3,5E-02
hsa-miR-224	1,44	5,0E-05	2,7E-02
hsa-miR-23a	-1,52	0,0E+00	3,8E-03
hsa-miR-26a	-1,41	2,5E-04	2,9E-02
hsa-miR-27b*	-1,34	4,0E-04	4,2E-02
hsa-miR-296-5p	1,38	2,0E-04	4,5E-02
hsa-miR-29b	-1,38	1,0E-04	1,7E-02
hsa-miR-302b	-1,42	1,0E-04	1,5E-02
hsa-miR-302c*	1,39	1,0E-04	3,9E-02
hsa-miR-30b	-1,32	4,5E-04	4,4E-02
hsa-miR-31	1,31	1,5E-04	3,5E-02
hsa-miR-32	-1,51	0,0E+00	4,4E-03
hsa-miR-323-3p	1,02	1,0E-04	2,6E-02
hsa-miR-328	1,36	2,0E-04	4,5E-02

hsa-miR-335*	-1,35	6,0E-04	4,9E-02
hsa-miR-338-3p	-1,42	1,0E-04	1,5E-02
hsa-miR-34b	1,39	2,0E-04	4,1E-02
hsa-miR-362-3p	-1,37	2,0E-04	2,7E-02
hsa-miR-376a	-1,36	1,0E-04	1,8E-02
hsa-miR-376b	-1,35	4,0E-04	4,0E-02
hsa-miR-376c	-1,34	1,0E-04	1,7E-02
hsa-miR-377	-1,38	1,0E-04	1,5E-02
hsa-miR-410	-1,52	1,0E-04	1,6E-02
hsa-miR-424	-1,41	1,0E-04	1,5E-02
hsa-miR-432	-1,33	5,0E-04	4,8E-02
hsa-miR-451	1,39	0,0E+00	1,9E-02
hsa-miR-452	-1,36	4,0E-04	3,9E-02
hsa-miR-483-3p	1,42	0,0E+00	2,7E-02
hsa-miR-491-3p	1,40	1,0E-04	4,0E-02
hsa-miR-494	1,31	1,0E-04	4,1E-02
hsa-miR-515-3p	1,36	2,0E-04	4,8E-02
hsa-miR-517c	1,44	5,0E-05	2,5E-02
hsa-miR-519d	1,36	3,0E-04	5,1E-02
hsa-miR-520e	1,42	0,0E+00	2,4E-02
hsa-miR-520f	1,48	5,0E-05	2,7E-02
hsa-miR-520g	1,47	0,0E+00	2,3E-02
hsa-miR-522	1,43	1,0E-04	2,7E-02
hsa-miR-548c-3p	-1,39	0,0E+00	1,8E-03
hsa-miR-548f	-1,27	1,0E-04	1,5E-02
hsa-miR-548g	-1,49	0,0E+00	5,3E-03
hsa-miR-548i	-1,47	4,0E-04	4,0E-02
hsa-miR-556-3p	-1,35	5,0E-04	4,7E-02
hsa-miR-556-5p	-1,40	1,0E-04	1,9E-02
hsa-miR-572	-1,53	5,0E-04	4,5E-02
hsa-miR-575	1,40	1,0E-04	2,8E-02
hsa-miR-582-3p	-1,34	4,0E-04	4,0E-02
hsa-miR-582-5p	-1,40	1,0E-04	1,8E-02
hsa-miR-595	-1,37	2,0E-04	2,9E-02
hsa-miR-605	1,47	0,0E+00	1,8E-02
hsa-miR-609	1,41	2,0E-04	4,0E-02
hsa-miR-620	-1,35	5,0E-04	4,7E-02
hsa-miR-641	-1,86	0,0E+00	1,2E-02
hsa-miR-657	1,42	0,0E+00	2,4E-02
hsa-miR-873	1,39	2,0E-04	4,0E-02
hsa-miR-886-3p	-1,74	0,0E+00	1,2E-02
hsa-miR-922	1,43	1,0E-04	2,5E-02
hsa-miR-923	1,04	1,0E-04	2,6E-02
hsa-miR-92a	1,44	1,0E-04	2,9E-02
hsa-miR-98	-1,35	4,0E-04	4,0E-02
kshv-miR-K12-4-5p	-1,63	1,0E-04	1,3E-02

Tabela: MicroRNAs associados à hiperglicemia descritos na literatura.

MicroRNAs Associados à Hiperglicemia			
MicroRNAs	Referências	MicroRNAs	Referências
hsa-miR-221	(Li et al., 2009); (Togliatto et al., 2011)	hsa-miR-374b	(Du et al., 2010)
hsa-miR-21	(Dey et al., 2011)	hsa-miR-596	(Du et al., 2010)
hsa-miR-486-5p	(Kim et al., 2012)	hsa-miR-296-5p	(Du et al., 2010)
hsa-miR-222	(Togliatto et al., 2011)	hsa-miR-523	(Du et al., 2010)
hsa-miR-29a	(Du et al., 2010)	hsa-miR-760	(Du et al., 2010)
hsa-miR-29c	(Du et al., 2010)	hsa-miR-298	(Du et al., 2010)
hsa-miR-195	(Du et al., 2010)	hsa-miR-133a	(Fred et al., 2010)
hsa-miR-532-5p	(Du et al., 2010)	hsa-miR-146	(Fred et al., 2010)
hsa-miR-923	(Du et al., 2010)	hsa-miR-155	(Spinetti et al., 2013)
hsa-miR-29b	(Du et al., 2010)	hsa-miR-126	(Mocharla et al., 2013)
hsa-miR-16	(Du et al., 2010)	hsa-miR-1	(Li et al., 2012).
hsa-miR-362-3p	(Du et al., 2010)	hsa-miR-133	(Li et al., 2012).

Tabela: MicroRNAs associados ao Diabetes Mellitus Tipo 2 descritos na literatura.

MicroRNAs Associados ao Diabetes Mellitus Tipo 2			
MicroRNAs	Referências	MicroRNAs	Referências
hsa-let-7b	(Zampetaki et al., 2010)	hsa-miR-29a	(Gallagher et al., 2010; Karolina et al., 2011; Kong et al., 2011)
hsa-let-7e	(Zampetaki et al., 2010)	hsa-miR-29b	(Zampetaki et al., 2010)
hsa-miR-100	(Gallagher et al., 2010)	hsa-miR-30b*	(Gallagher et al., 2010)
hsa-miR-106b	(Gallagher et al., 2010)	hsa-miR-30c-2*	(Gallagher et al., 2010)
hsa-miR-10a	(Gallagher et al., 2010)	hsa-miR-30d	(Karolina et al., 2011); (Kong et al., 2011)
hsa-miR-10b	(Gallagher et al., 2010)	hsa-miR-30e	(Gallagher et al., 2010)
hsa-miR-122	(Zampetaki et al., 2010)	hsa-miR-32*	(Gallagher et al., 2010)
hsa-miR-124a	(Kong et al., 2011)	hsa-miR-320	(Zampetaki et al., 2010; Karolina et al., 2011)
hsa-miR-125-5p	(Zampetaki et al., 2010)	hsa-miR-331-3p	(Gallagher et al., 2010)
hsa-miR-126	(Zampetaki et al., 2010; Mocharla et al., 2013)	hsa-miR-342-3p	(Gallagher et al., 2010; Zampetaki et al., 2010)
hsa-miR-126*	(Gallagher et al., 2010)	hsa-miR-34a	(Kong et al., 2011)
hsa-miR-128	(Gallagher et al., 2010)	hsa-miR-362-3p	(Gallagher et al., 2010)

hsa-miR-133a	(Gallagher et al., 2010)
hsa-miR-134	(Zampetaki et al., 2010)
hsa-miR-138-1*	(Gallagher et al., 2010)
hsa-miR-139-3p	(Zampetaki et al., 2010)
hsa-miR-139-5p	(Zampetaki et al., 2010)
hsa-miR-140-5p	(Zampetaki et al., 2010)
hsa-miR-142-3p	(Gallagher et al., 2010)
hsa-miR-142-5p	(Gallagher et al., 2010)
hsa-miR-143	(Gallagher et al., 2010)
hsa-miR-144	(Gallagher et al., 2010; Karolina et al., 2011)
hsa-miR-146a	(Balasubramanyam et al., 2011); (Karolina et al., 2011); (Kong et al., 2011)
hsa-miR-146b-5p	(Zampetaki et al., 2010)
hsa-miR-150	(Zampetaki et al., 2010; Karolina et al., 2011)
hsa-miR-152	(Gallagher et al., 2010)
hsa-miR-154	(Gallagher et al., 2010)
hsa-miR-155	(Spinetti et al., 2013)
hsa-miR-15a	(Gallagher et al., 2010; Zampetaki et al., 2010)
hsa-miR-15b	(Gallagher et al., 2010)
hsa-miR-16	(Zampetaki et al., 2010)
hsa-miR-181a-2*	(Gallagher et al., 2010)
hsa-miR-182	(Karolina et al., 2011)
hsa-miR-185	(Gallagher et al., 2010)
hsa-miR-190	(Gallagher et al., 2010)
hsa-miR-191	(Zampetaki et al., 2010)
hsa-miR-192	(Karolina et al., 2011)
hsa-miR-193a-5p	(Gallagher et al., 2010)
hsa-miR-196a	(Gallagher et al., 2010)
hsa-miR-197	(Zampetaki et al., 2010)
hsa-miR-199a-3p	(Gallagher et al., 2010)
hsa-miR-199b-5p	(Gallagher et al., 2010)
hsa-miR-208a	(Gallagher et al., 2010)
hsa-miR-20b	(Zampetaki et al., 2010)
hsa-miR-21	(Zampetaki et al., 2010)

hsa-miR-371-5p	(Gallagher et al., 2010)
hsa-miR-374a	(Gallagher et al., 2010)
hsa-miR-374b	(Gallagher et al., 2010)
hsa-miR-375	(Kong et al., 2011); (Zhao et al., 2010)
hsa-miR-378*	(Gallagher et al., 2010)
hsa-miR-422a	(Gallagher et al., 2010)
hsa-miR-423-3p	(Gallagher et al., 2010)
hsa-miR-423-5p	(Zampetaki et al., 2010)
hsa-miR-424	(Gallagher et al., 2010)
hsa-miR-433	(Zampetaki et al., 2010)
hsa-miR-451	(Gallagher et al., 2010)
hsa-miR-455-5p	(Gallagher et al., 2010)
hsa-miR-486-5p	(Zampetaki et al., 2010)
hsa-miR-503	(Gallagher et al., 2010)
hsa-miR-518c*	(Gallagher et al., 2010)
hsa-miR-519d	(Gallagher et al., 2010)
hsa-miR-574-3p	(Zampetaki et al., 2010)
hsa-miR-589	(Gallagher et al., 2010)
hsa-miR-597	(Gallagher et al., 2010)
hsa-miR-600	(Gallagher et al., 2010)
hsa-miR-634	(Gallagher et al., 2010)
hsa-miR-658	(Gallagher et al., 2010)
hsa-miR-665	(Gallagher et al., 2010)
hsa-miR-668	(Gallagher et al., 2010)
hsa-miR-765	(Gallagher et al., 2010)
hsa-miR-768-3p	(Gallagher et al., 2010)
hsa-miR-768-5p	(Gallagher et al., 2010)
hsa-miR-801	(Gallagher et al., 2010)
hsa-miR-885-5p	(Zampetaki et al., 2010)
hsa-miR-9	(Kong et al., 2011)
hsa-miR-921	(Gallagher et al., 2010)
hsa-miR-923	(Gallagher et al., 2010)
hsa-miR-93	(Gallagher et al., 2010)

hsa-miR-223	(Zampetaki et al., 2010)	hsa-miR-937	(Gallagher et al., 2010)
hsa-miR-24	(Zampetaki et al., 2010)	hsa-miR-95	(Gallagher et al., 2010)
hsa-miR-25	(Zampetaki et al., 2010)	hsa-miR-98	(Gallagher et al., 2010)
hsa-miR-27b	(Gallagher et al., 2010)	hsa-miR-99a	(Gallagher et al., 2010)
hsa-miR-28-3p	(Zampetaki et al., 2010)	hsa-miR-99b	(Zampetaki et al., 2010)

**ONE-WEEK INTERVENTION PERIOD RESULTED IN IMPROVEMENT OF
GLYCEMIC CONTROL AND REDUCTION IN DNA DAMAGE LEVELS IN
PATIENTS WITH TYPE 2 DIABETES MELLITUS**

Danilo J. Xavier^a; Paula Takahashi^a; Fernanda S. Manoel-Caetano^{a,d}; Maria C. Foss-Freitas^b; Milton C. Foss^b; Eduardo A. Donadi^b; Geraldo A. Passos^{a,c}; Elza T. Sakamoto-Hojo^{a,d}

^aDepartment of Genetics, Faculty of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo – USP, Ribeirão Preto, SP, Brazil.

^bDepartment of Medical Clinic, Faculty of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo – USP, Ribeirão Preto, SP, Brazil.

^cDepartment of Morphology, Stomatology, and Physiology, School of Dentistry of Ribeirão Preto, University of São Paulo – USP, Ribeirão Preto, SP, Brazil.

^dDepartment of Biology, Faculty of Philosophy, Science, and Letters of Ribeirão Preto, University of São Paulo – USP, Ribeirão Preto, SP, Brazil.

ABSTRACT

Type 2 diabetes mellitus is a chronic metabolic disease that results from the combination of insulin resistance and/or pancreatic β -cell dysfunction, which in turn, gives rise to hyperglycemia. The latter induces the production of elevated levels of reactive oxygen species (ROS), which leads to a reduction in cellular antioxidant defenses, as well as to the induction of several DNA lesions, including 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG). Because it has been proposed that glycemic control may attenuate the harmful effects of hyperglycemia, in the present work, we examined the effects of a seven-day clinical intervention period (to reach adequate blood glucose levels) on DNA damage presented by T2DM patients compared to non-diabetic individuals by performing the alkaline comet assay. Furthermore, we analyzed the transcriptional levels of genes implicated in antioxidant defense and response to oxidative stress in samples of T2DM patients before and after the hospitalization period by the PCR array method. Our findings indicated that the seven-day period was sufficient to improve glycemic control and to significantly decrease ($p < 0.05$) DNA damage levels in T2DM patients, although those levels were still higher than those of the control subjects. We also reported a tendency for lower levels of oxidative DNA damage in T2DM patients after the hospitalization period, even though a statistically significant difference in the transcriptional expression of any of the 84 genes investigated was not observed. Because high levels of DNA damage have been implicated in metabolic diabetic complications and 8-OHdG can lead to transversions, it is extremely important for T2DM patients to achieve and maintain an adequate glycemic control.

INTRODUCTION

Type 2 diabetes mellitus (T2DM) is a chronic, progressive, heterogeneous, and poorly understood metabolic disease (Marx, 2002; Bloomgarden, 2012), which develops as a result of the combination of insulin resistance and/or pancreatic β -cell dysfunction (Marx, 2002; Bloomgarden, 2012). It is estimated that 346 million people have diabetes worldwide, with T2DM accounting for approximately 90% of all diagnosed cases (WHO, 2011). In addition, the prevalence of T2DM has increased dramatically, mainly due to high-calorie diet and to sedentary lifestyle, which contribute to excess body weight (Hardoon et al., 2010). Although T2DM typically affects people in the age range of 45-65 years (King et al., 1998), it has also been recently diagnosed in overweight children (Badaru e Pihoker, 2012; Low et al., 2012).

Hyperglycemia is widely recognized as a link between diabetes and diabetic complications (Giardino et al., 1996; Brownlee, 2001; Allen et al., 2005). One of the major hypotheses to explain the onset of diabetic complications is the increase in oxidative stress due to the accumulation of reactive oxygen species (ROS) as a consequence of hyperglycemia (Brownlee, 2001; Niedowicz e Daleke, 2005).

ROS accumulation can lead to the depletion of cellular antioxidant defenses, such as vitamins E and C as well as glutathione peroxidase (Niedowicz and Daleke, 2005). Consistent

with the fact that hyperglycemia can trigger ROS generation, reduced levels of GSH have been reported both in cells exposed to high glucose concentrations and in diabetic patients (Sharpe et al., 1998; Catherwood et al., 2002), suggesting that the antioxidant defense system is compromised in those patients (Dincer et al., 2002).

In addition, overproduction of ROS can induce several DNA lesions, including oxidized bases, abasic sites, DNA strand breaks, and cross-links between DNA and proteins (Lee e Wei, 2007). The 8-position of guanine is highly susceptible to ROS attack and when this occurs, 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) is generated (Neeley e Essigmann, 2006). The latter is an extensively studied DNA lesion and it is considered a biomarker of oxidative DNA damage (Collins, 2009). Furthermore, several studies have observed higher levels of 8-OHdG in peripheral blood lymphocytes from diabetic patients (Dandona et al., 1996; Blasiak et al., 2004; Adaikalakoteswari et al., 2007; Pan et al., 2007). The presence of 8-OHdG can be measured by the alkaline comet assay (single-cell gel electrophoresis assay) employing the hOGG1 enzyme, a glycosylase that removes 8-OHdG, generating alkali-labile sites and causing DNA breaks that can be detected by the comet assay (Collins, 2009).

Glycemic control has been proposed to minimize the harmful effects of hyperglycemia (Stolar et al., 2008; Ismail-Beigi, 2012b). To improve glycemic control (HbA1c levels below 7%), the American Diabetes Association recommends lifestyle modifications, such as a balanced diet combined with daily physical activity and drug therapy (American Diabetes Association, 2012). Among the recommended medications available for glycemic management of T2DM are insulin, sulfonylurea, and thiazolidinediones (Khan et al., 2006; Stolar et al., 2008; Nathan et al., 2009; Ismail-Beigi, 2012a; Ismail-Beigi, 2012b). Another strategy to enhance glycemic control is metformin administration, whose mechanism of action is related with decreased hepatic glucose production and reduced insulin resistance in muscle tissue and liver (Uwaifo e Ratner, 2007). Metformin is considered the cornerstone of T2DM, since it presents only a few side effects and it rarely causes severe hypoglycemia (Nathan et al., 2009), in contrast to the other medications aforementioned. However, glycemic management should be individualized for each patient with T2DM, with an adequate blood glucose target being set (fasting/pre-prandial: 70-130 mg/dL; post-prandial: < 180 mg/dL) (American Diabetes Association, 2010). Additionally, the clinical characteristics of patients, a spectrum of glycated hemoglobin (HbA1c) levels for selection of drug therapy (Rodbard et al., 2009), and the psycho-socio-economic condition, including the patient's capacity for self-care and home support systems, should all be taken into consideration (Ismail-Beigi et al., 2011; Ismail-Beigi, 2012). For example, for most patients, metformin is recommended as the initial drug therapy, but for patients with chronically high levels of HbA1c, other agents should be prescribed (Ismail-Beigi, 2012b).

As stated before, diabetic patients present extracellular chronic hyperglycemia, which leads to increased oxidative stress due to an elevated generation of ROS (Brownlee, 2001; Sheetz and King, 2002; Niedowicz and Daleke, 2005), which in turn, can cause DNA lesions (Lee and Wei, 2007). On the basis of this information, the present study aimed to investigate the

effects of a seven day-glycemic management (clinical intervention to reach adequate blood glucose values) on the levels of DNA damage presented by T2DM patients compared to the control group (non-diabetic individuals) by performing the alkaline comet assay. In addition, we aimed to analyze the transcript expression levels of genes involved in oxidative stress and antioxidant defense by comparing samples of patients with T2DM before and after hospitalization by the PCR array method.

MATERIAL AND METHODS

Subjects

A total of 10 T2DM subjects participated in the present study, including 3 males and 7 females between the ages of 30 and 61 (mean age = 46.4 years $\pm$ 12.3). The patients, who were diagnosed according to the American Diabetes Association protocol (Bloomgarden, 1997), were recruited in the Endocrinology Outpatient of the Clinical Hospital, Faculty of Medicine, University of São Paulo, Ribeirão Preto, Brazil. The main clinical characteristics of all patients are described in **Table 1**. All patients were submitted to a seven day-hospitalization period at the Clinical Hospital for treatment to achieve a desired glycemic control, with levels close to normal (70-110 mg/dL). During this period, patients received a nutrition intervention and proper control of Diabetic drug treatment, with the ultimate goal to achieve better glycemic levels. Therefore, patients were separated into two groups: before hospitalization (BH) and after hospitalization (AH). Fasting glucose (mg/dL) and HbA1c (%) levels were measured at the two periods (Tables 1 and 2). Patients presenting late diabetic complications (such as proliferative retinopathy, consolidated nephropathy, kidney failure, heart disease, and autonomic neuropathy), which could lead to elevated oxidative stress despite the high levels of glucose, were excluded. The control group consisted of 16 healthy subjects, including 7 males and 9 females between the ages of 36 and 65 (mean age = 52.9 years $\pm$ 6,7). Exclusion criteria for the control group included family history of diabetes or chronic diseases, exposure to radiation, infections, and use of medications. Levels of fasting glucose (mg/dL) and HbA1c (%) of 12 out of the 16 healthy individuals were measured and the mean values are shown in **Table 2**. The study protocol was approved by the Ethics Committee of the Clinical Hospital and informed written consent was obtained from all subjects.

Sample collection, isolation of peripheral blood mononuclear cells, and RNA extraction

Peripheral blood samples (20 mL) were collected from the T2DM patients (n = 10) and healthy individuals (n = 16) via standard venipuncture into tubes containing EDTA (Beckton & Dickinson, USA). For diabetic patients, samples were collected before and seven days after admission to the Clinical Hospital.

Peripheral blood (25 μ L) from the diabetic patients and the healthy individuals was used for single-cell gel electrophoresis (comet assay). Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from the diabetic patients were isolated from the remaining blood volume by density gradient

centrifugation using Histopaque-1077 (Sigma–Aldrich Inc., USA) via centrifugation for 15 minutes at 2000 rpm at room temperature. Total RNA was extracted from the PBMCs using the Trizol reagent (Invitrogen, Rockville, MD, USA), according to the manufacturer's instructions. RNA was quantified by Genequant Spectrophotometer (Amersham, USA) and its quality and integrity were assessed both by agarose gel electrophoresis and by microcapillary electrophoresis on Agilent RNA Nano 6000 chips and Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). RNA samples were used for PCR array only if protein- and phenol-free and with RNA Integrity Number (RIN) values ≥ 8.0 .

Single Cell Gel Electrophoresis (Comet Assay) – Alkaline condition

The alkaline comet assay was conducted according to Singh et al. (1988), with slight modifications. All steps were performed under dim light to minimize further DNA damage occurrence. Peripheral blood (25 μL) from T2DM patients before and after hospitalization as well as control subjects was added to 200 μL of 0.5% low melting agarose (37 $^{\circ}\text{C}$) and gently resuspended. For each blood sample, the cellular suspensions were distributed onto microscope slides that had been pre-coated with a layer of 1.5 % normal melting agarose. The gels on the slides were covered with coverslips (24 x 60 mm), and incubated for 5 minutes at 4 $^{\circ}\text{C}$ to solidify. After removing the coverslips, the slides were immersed in a cold lysis solution (2.5 M NaCl, 100 mM Na₂EDTA, 10 mM Tris, 1% Triton X-100, and 10% DMSO, pH = 10.0) for at least 12 hours at 4 $^{\circ}\text{C}$. Next, the slides containing the nuclei were incubated in electrophoresis solution (0.3 M NaOH and 1mM Na₂EDTA, pH > 13) for 20 minutes at 4 $^{\circ}\text{C}$ to allow the DNA to denature, followed by electrophoresis at 25 V (1 V/cm, 300 mA) for 20 minutes at 4 $^{\circ}\text{C}$. Subsequently, the slides were incubated in neutralization buffer (0.4 M Tris-HCl, pH = 7.5) for 15 minutes, air-dried at room temperature, and fixed in absolute ethanol for 5 minutes at room temperature.

Nuclei were stained with 50 μL of propidium iodide (25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and examined under a Carl Zeiss epifluorescence microscope equipped with an excitation filter of 516-560 nm and a barrier filter of 590 nm, using a 40 X objective. The images were captured using Axiocan camera (Zeiss) and the AxioVision 3.1 program (Zeiss) with live imaging facility.

Hydrogen peroxide was used as a positive control for the comet assay itself (data not shown). Each time electrophoresis was conducted, after the lysis step, 80 μM of hydrogen peroxide were added to the gels containing blood samples from two randomly selected individuals for 15 minutes. The other steps of the assay were carried out as aforementioned.

Modified Comet Assay

To detect 8-oxoG, a modified comet assay using the hOGG1 enzyme was performed for the same groups aforementioned. All the steps previously described for the conventional comet assay were performed, with a few modifications. After lysis, the slides were washed with 1X phosphate buffered saline (PBS) free of Ca²⁺ and Mg²⁺ for 5 minutes at 4 $^{\circ}\text{C}$ and then

immersed in two changes of buffer F (40 mM HEPES, 0.1 M KCl, 0.5 mM EDTA, and 0.2 mg/mL bovine serum albumin, pH = 8.0) for 5 minutes at room temperature. Afterwards, 0.08 U hOGG1 (New England Biolabs) in 50 μ L of buffer F was added to the gels (Smith et al. 2010), which were covered with coverslips and placed in a humidified chamber (Hybrite, Vysis) for 20 minutes at 37°C. After the enzyme treatment, the other steps (electrophoresis, neutralization, and fixation) were performed as aforesaid.

Gene expression profiling - Quantitative Real Time RT-PCR assay

The expression of 84 genes related to oxidative stress and antioxidant defense from six T2DM patients (pre- and post-hospitalization) was analyzed using the RT² Profiler™ PCR Array (SA Biosciences, Qiagen, USA). The PCR array is a sensitive, specific, reliable, and reproducible method that allows the expression analysis of multiple genes simultaneously by real time RT-PCR using a set of validated primers. The plates include 89 primers, with five of them corresponding to housekeeping genes, as well as quality control elements for the detection of genomic DNA contamination and assessment of reverse transcription and PCR reactions. The experiments were performed following the manufacturer's instructions. Briefly, 1 μ g of total RNA was reverse transcribed using the RT² First Strand Kit (SA Biosciences, Qiagen, USA) and the resulting cDNA was mixed with RT² SYBR Green ROX qPCR Mastermix (SA Biosciences, Qiagen, USA). Next, 25 μ L of the resulting mixture was added to each well of the RT² Profiler PCR arrays, which were sealed with Optical Thin-Wall 8-Cap Strips. The PCR reaction was run on an Applied Biosystems model 7000 real-time cycler according to the following cycling program: a pre-warming step of 10 minutes at 95°C to activate the DNA Taq Polymerase, followed by 40 cycles of 15 seconds at 95°C and 1 minute at 60°C.

Data analysis and statistics

Glycemic Levels

To compare the levels of fasting glucose and HbA1c among the three groups (controls, BH, and AH), Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks, followed by all pairwise multiple comparison procedures (Dunn's method) were performed using the SigmaStat program, version 3.5. Results were presented as means $\pm$ standard deviation and significance levels were considered for $p < 0.05$.

Alkaline Comet Assay

DNA damage was analyzed for the two T2DM groups, BH and AH, as well as for the control group. A total of 50 nuclei per slide were randomly scored using the CometScore program, version 1.5 (Tritrek Corp., USA). Only nuclei that did not overlap and had a clear margin around them were examined. As a measurement of DNA damage, the tail intensity (TI),

which is the percentage of DNA migrated from the head of the comet into the tail, was recorded for each nucleus scored. To compare the levels of DNA damage and the effects of hOGG1 among the three groups (control, BH, and AH), Two Way Analysis of Variance, followed by Student-Newman-Keuls Test were applied to the data. In addition, to compare the efficiency of the seven day-hospitalization period on the decrease in DNA damage levels in T2DM patients, paired *t*-test was performed. Results were presented as TI means $\pm$ standard deviation and significance levels were considered for $p < 0.05$.

Gene Expression Profiling - Quantitative Real Time RT-PCR assay

After determining the threshold cycle (Ct) for each well of the array, the data was analyzed using the web-based RT² Profiler PCR Array Data Analysis software, version 3.5 (<http://pcrdataanalysis.sabiosciences.com/pcr/arrayanalysis.php>). The threshold cycle for each well was uploaded into the software, which in turn, performed the fold change calculations based on $\Delta\Delta C_t$ (AH versus BH), with the statistical significance threshold being 0.05.

RESULTS

Glycemic Levels

The period of one-week intervention was sufficient to decrease the glucose levels of all patients, in particular patients 4, 5, 6, 8, and 10. However, seven days of treatment only slightly reduced HbA1c values (**Table 1**). Glucose levels were significantly ($p < 0.05$) lower in the control group compared to the BH group and interestingly, there was a statistical difference ($p < 0.05$) in glucose levels between the AH and the BH group, while a statistical difference was not observed between the AH and the control group (**Table 2**). Furthermore, it was noted that the levels of HbA1c were significantly ($p < 0.05$) higher in the two T2DM groups (BH and AH) relative to the healthy individuals, while there was not a significant difference when comparing AH with BH, only a slight decrease was observed (**Table 2**).

Alkaline Comet Assay

By performing the conventional comet assay, it was possible to observe that both T2DM groups (BH and AH) presented significantly ($p < 0.05$) higher TI mean values (6.69 ± 3.68 and 4.38 ± 3.00 , respectively) than that of the control group (2.57 ± 1.37). Interestingly, the AH group presented significantly ($p < 0.05$) lower TI mean values than the BH group (**Table 3, Figure 1**).

Regarding the results obtained from the modified comet assay, the TI mean values were significantly ($p < 0.05$) greater in both BH (8.51 ± 3.17) and AH (6.06 ± 1.69) groups relative to the healthy subjects (4.33 ± 1.91). Moreover, although the difference in the TI mean values was not significant ($p > 0.05$), a tendency for lower levels of oxidative DNA damage was observed in the AH compared to the BH group (**Table 3, Figure 1**).

Gene Expression Profiling

Expression profiles (PCR array) were analyzed for 84 genes implicated in oxidative stress and antioxidant defense pathways in PBMCs from six T2DM patients pre- and post-glycemic control intervention. The results indicated a lack of significant changes in gene expression levels between the two groups. However, three genes, namely *AOX1*, *CSDE1*, and *SELS*, were highlighted since they presented considerably high fold change (FC) values: -3.29, 6.01, and -3.06, respectively (**Table 4, Figure 2**).

DISCUSSION

In the present study, we investigated whether a seven-day hospitalization period (aiming to improve glycemic control) can affect the levels of DNA damage in peripheral blood cells from T2DM patients, also compared with non-diabetic subjects; in addition, we examined the expression profiles of genes involved in oxidative stress and antioxidant defense in PBMCs from the two T2DM groups (BH and AH) in order to detect changes at the transcriptional level between groups. According to the medical records, the mean values of glucose significantly reduced after the hospitalization period, reaching values that were not statistically different from those of the control group (**Table 2**). Therefore, these results indicate that one week of treatment was sufficient to lower glucose values close to normal range. On the other hand, levels of HbA1c (hemoglobin bound to glucose by a non-enzymatic reaction) (Nathan et al., 2007) presented by T2DM patients only slightly decreased after hospitalization, remaining significantly greater than those of the control subjects (**Table 2**). These findings are expected for such a short period of hospitalization because the concentration of HbA1c usually corresponds to the average glucose values over the preceding eight to twelve weeks (Nathan et al., 2007).

Upon the observation that a short intervention period was capable of enhancing glycemic control to some extent in diabetic patients, the levels of DNA damage in peripheral blood cells from healthy individuals and T2DM patients pre- and post-hospitalization were measured by the alkaline comet assay; this technique allows the detection of DNA damage at a single cell level, as well as the detection of low levels of damage (Tice et al., 2000). In the present study, results from the conventional comet assay demonstrated a significant decline in DNA damage in peripheral blood cells from T2DM patients after the intervention period to improve their glycemic control (**Table 3, Figure 1**); this finding is in agreement with other studies that have suggested increased levels of DNA damage in lymphocytes from poorly-controlled diabetic patients, since they observed a significant positive association between lymphocytic DNA damage and both fasting glucose and HbA1c levels (Tatsch et al., 2012). On the other hand, in accordance with Tatsch et al. (2012), our findings showed that DNA damage levels were still elevated in both T2DM groups relative to the controls (**Table 3, Figure 1**), which suggests an involvement of DNA damage in T2DM. Nevertheless, our results indicate that although normal DNA damage levels were not reached, the seven-day treatment triggered a

significant reduction in damage in T2DM patients, indicating the need to keep the glucose levels near the control values. This aspect is relevant for the patients, since elevated DNA damage levels have been associated with the development of incident metabolic diabetic complications (Choi et al., 2012).

It is well known that hyperglycemia in T2DM patients causes glucose auto-oxidation, non-enzymatic protein glycation, and other metabolic alterations that lead to increased ROS production (Baynes 1991; Lodovici et al 2007). Since all macromolecules can be affected by ROS, including DNA (Adaikalakoteswari et al., 2007), a modified comet assay using the hOGG1 enzyme was performed on peripheral blood cells from T2DM patients (BH and AH) and non-diabetic subjects to detect 8-oxoG, one of the most recurrent and extensively studied oxidative DNA lesions (van Loon et al., 2010). The hOGG1 enzyme is a glycosylase involved in the first steps of the base excision repair (Bohr, 2002), and, in fact, it is the major player in repairing 8-oxoG generated as a consequence of hyperglycemia (Rosenquist et al., 1997; Collins et al., 1998). This enzyme removes the damaged base, giving rise to alkali-labile sites, which are cleaved by hOGG1 itself (Zharkov, Rosenquist et al 2000), resulting in DNA strand breaks that can be further detected by the comet assay. Our results showed that oxidative DNA damage was significantly lower in healthy subjects compared to both T2DM groups; although there was not a statistical difference between the AH and the BH groups, a tendency for lower levels of oxidative damage was observed after the hospitalization period (**Table 3, Figure 1**). Thus, our findings indicate that after the seven-day intervention period to improve glycemic control, although slight, there was a recovery of oxidative DNA damage, reinforcing the association between hyperglycemia, increased levels of ROS, and DNA damage.

Similar to our study, Dincer et al. (2002) analyzed oxidative DNA damage in leukocytes from T2DM patients (by the comet assay) and the authors described significantly elevated levels of oxidative damage in controlled patients (categorized according to their levels of HbA1c) relative to healthy subjects. In addition, consistent with our findings regarding a tendency for decreased levels of oxidative damage, the same authors observed significantly lower levels of oxidative damage in patients with good glycemic control when compared to those with poor glycemic control (Dincer et al., 2002). Moreover, even though Lodovici et al (2008) showed that T2DM patients exhibited significantly higher levels of oxidative DNA damage in leukocytes compared to healthy individuals, as previously reported (Dincer et al., 2002), they found a positive association between antioxidant capacity and glucose or HbA1c levels in poorly controlled T2DM subjects, which is in accordance with the assumption that antioxidant capacity is improved to compensate for an excess of free radical species (Lodovici et al., 2008). This provides a possible explanation for our results because by assuming that uncontrolled patients (pre-treatment group) might present an enhanced antioxidant capacity, the difference in oxidative damage levels could be minimized between patients pre- and post-hospitalization, leading to a lack of significance difference.

Nevertheless, considering our results on gene expression profiling, it is more likely that the intervention was not sufficient to trigger a significant decrease in oxidative damage in

peripheral blood cells from controlled patients. We examined the mRNA levels of genes related to oxidative stress and antioxidant defense, which was accomplished by the PCR array method. We found that none of the 84 genes investigated were significantly expressed in the AH group compared to the BH group. These findings probably indicate that the period of intervention was not sufficient to induce significant changes in the expression levels of genes involved in antioxidant defense and response to oxidative stress. Nonetheless, three genes displayed considerably high fold change values, and therefore deserve to be further discussed: *AOX1*, *CSDE1* and *SELS* (**Table 4, Figure 2**).

The protein encoded by the gene *AOX1* belongs to a family of enzymes that contains the cofactor molybdenum and it is able to catalyze the oxidation of a wide number of substrates, such as many aldehyde compounds as well as nitrogenous heterocyclic xenobiotics (Weigert et al., 2008), with high levels of this enzyme being present in the human liver. Weigert and colleagues (2006) demonstrated that *AOX1* oxidized 3-(2-Deoxy- β -D-erythro-pentofuranosyl)pyrimido[1,2- α]purin-10(3H)-one (M1dG), a mutagenic DNA adduct originated from peroxidation products, more specifically, malondialdehyde and base propenal ([ref. 9-11-](#) (Otteneder et al., 2006), to 6-oxo-m1dG, which in turn, was excreted in the urine. Although involved in the metabolism of a mutagenic adduct, *AOX1* has also been implicated in the production of two reactive oxygen species: superoxide and hydrogen peroxide (Kundu et al., 2007) Moreover, Kundu and colleagues (2007) suggested that the involvement of *AOX1* in the generation of ROS by metabolizing aldehydes could be an explanation for the oxidative liver injury presented by chronic alcoholics, since abnormally elevated levels of acetaldehyde were detected in the blood of a subject after ethanol ingestion (Ando et al., 1993) and higher levels of the same compound was also observed in the saliva of smoking and drinking individuals (Salaspuro e Salaspuro, 2004). Besides elevated levels of the substrate, dysregulated levels of *AOX1* could also increase the levels of ROS. In our study, *AOX1* gene was found down-regulated in the T2DM patients after hospitalization, and even though the enhancement of the hyperglycemic condition played a role in the observed lower levels of oxidative DNA damage in the AH group, lower levels of *AOX1* could also have contributed to decreased DNA damage.

The rat protein Tanis, whose human homologue protein is *SELS* (Walder et al., 2002), has been implicated in the regulation of glucose metabolism: when overexpressed in H4IIE hepatoma cells, Tanis led to a reduction in glucose uptake, glycogen synthesis, glycogen storage, as well as partial inhibition of the insulin-mediated decrease in the mRNA levels of *PEPCK*, an enzyme that catalyzes the rate-limiting step in hepatic gluconeogenesis (Gao et al., 2003) Interestingly, Walder et al. (2002) performed *in vitro* experiments on HepG2 hepatocytes, 3T3-L1 adipocytes, and C2C12 muscle cells and demonstrated that *Tanis* gene expression is regulated by glucose, with elevated levels of the latter triggering significant down-regulation of Tanis mRNA levels, in a dose-dependent manner. The latter contradicts our results that pointed to higher levels of *SELS* displayed by T2DM patients before the seven-day hospitalization period (greater blood glucose levels) compared to the patients after the intervention period (lower blood glucose levels). Furthermore, the study by Gao and colleagues (2004) showed that

SELS was involved in protection against oxidative stress after Min6 pancreatic β cells exposed to hydrogen peroxide and overexpressing *SELS* were protected against cell death mediated by oxidative stress. Hence, this information provides another possible explanation for our findings in the sense that there may be a greater need for elevated levels of *SELS* in patients (BH group) exhibiting higher levels of oxidative damage.

It has been shown that the protein encoded by the gene *CSDE1*, also known as *UNR*, binds to purine-rich sequences (Triqueneaux et al., 1999) and it is one of the five proteins associated with the c-fos major protein-coding-region determinant of instability (mCRD), which mediates mRNA decay coupled to translation. Another study showed the requirement of *CSDE1* for the efficient internal initiation of translation directed by rhinovirus and poliovirus internal ribosomal entry sites (IRES) elements, thus, raising the possibility of *UNR* limiting the replication of these viruses (Boussadia et al., 2003).

Besides its implication in translation processes, it has been reported that *CSDE1* also plays a role in the regulation of cell death. Dormoy-Raclet and colleagues (2007) investigated the association between *CSDE1* and cell proliferation and response to stress. They observed that murine embryonic stem cells deficient for *CSDE1* were resistant to cell death (both apoptosis and necrosis) induced by ionizing radiation (IR) that among others, leads to the production of indirect DNA damage by inducing the formation of free radicals. It was also noted that this resistance is related to decreased expression levels of three pro-apoptotic genes: *p53*, *caspase-3*, and *Gadd45c* (Dormoy-Raclet et al., 2007). On the other hand, the same authors reported that in the human hepatoma cell line HuH7, knockdown of *CSDE1* triggered increased apoptosis and necrosis both before and after IR exposure. Thus, these results indicate that *CSDE1* up-regulates cell death in response to IR in murine embryonic stem cells, but down-regulates cell death in human hepatoma cells. Our findings indicated down-regulation of *CSDE1* in the BH group that presents higher levels of glucose, which in turn is linked to the formation of ROS through many pathways (Baynes 1991; Lodovici et al 2007), with the latter being able to cause DNA damage (Adaikalakoteswari et al., 2007). All together, these results suggest that mRNA turnover itself, as well as cell death pathways may be dysregulated in T2DM patients with poor glycemic control.

In conclusion, this study demonstrated that the seven-day intervention period performed to reach adequate blood glucose levels improved glycemic control and led to a significant decrease in DNA damage in peripheral blood cells from T2DM patients, even though those levels were still higher than those of non-diabetic individuals. We have also observed a tendency for lower levels of oxidative DNA damage after the hospitalization period, although any of the genes related to antioxidant defense and response to oxidative stress were differentially expressed. Hence, since it has been reported an association between the development of metabolic diabetic complications and high levels of DNA damage (Choi et al., 2012), and that in mammalian cells, the oxidative DNA lesion 8-oxoG leads to A:T to C:G transversion following DNA replication, T2DM patients should be aware of the importance of

following a balanced diet and the appropriate drug therapy, as well as being physically active to achieve and maintain an adequate glycemic control.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo — FAPESP, Brazil (Grant numbers 2008/56594-8, 2010/12069-7, and 2010/00932-2), the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brazil), and the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, Brazil).

REFERENCES

- Adaikalakoteswari, A., Rema, M., Mohan, V. e Balasubramanyam, M., 2007. Oxidative DNA damage and augmentation of poly(ADP-ribose) polymerase/nuclear factor-kappa B signaling in patients with type 2 diabetes and microangiopathy. *Int J Biochem Cell Biol* 39, 1673-84.
- Allen, D.A., Yaqoob, M.M. e Harwood, S.M., 2005. Mechanisms of high glucose-induced apoptosis and its relationship to diabetic complications. *J Nutr Biochem* 16, 705-13.
- Ando, H., Abe, H. e Hisanou, R., 1993. Ethanol-induced myocardial ischemia: close relation between blood acetaldehyde level and myocardial ischemia. *Clin Cardiol* 16, 443-6.
- Badaru, A. e Pihoker, C., 2012. Type 2 diabetes in childhood: clinical characteristics and role of beta-cell autoimmunity. *Curr Diab Rep* 12, 75-81.
- Blasiak, J., Arabski, M., Krupa, R., Wozniak, K., Zadrozny, M., Kasznicki, J., Zurawska, M. e Drzewoski, J., 2004. DNA damage and repair in type 2 diabetes mellitus. *Mutat Res* 554, 297-304.
- Bloomgarden, Z.T., 2012. American Diabetes Association Annual Meeting, 1997. Type 2 diabetes. *Diabetes Care* 20, 1791-5.
- Bohr, V.A., 2002. Repair of oxidative DNA damage in nuclear and mitochondrial DNA, and some changes with aging in mammalian cells. *Free Radic Biol Med* 32, 804-12.
- Boussadia, O., Niepmann, M., Creancier, L., Prats, A.C., Dautry, F. e Jacquemin-Sablon, H., 2003. Unr is required in vivo for efficient initiation of translation from the internal ribosome entry sites of both rhinovirus and poliovirus. *J Virol* 77, 3353-9.
- Brownlee, M., 2001. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature* 414, 813-20.
- Catherwood, M.A., Powell, L.A., Anderson, P., McMaster, D., Sharpe, P.C. e Trimble, E.R., 2002. Glucose-induced oxidative stress in mesangial cells. *Kidney Int* 61, 599-608.
- Choi, S.W., Yeung, V.T. e Benzie, I.F., 2012. Heme oxygenase microsatellite polymorphism, oxidative stress, glycemic control, and complication development in type 2 diabetes patients. *Free Radic Biol Med* 53, 60-3.
- Collins, A.R., 2009. Investigating oxidative DNA damage and its repair using the comet assay. *Mutat Res* 681, 24-32.
- Collins, A.R., Raslova, K., Somorovska, M., Petrovska, H., Ondrusova, A., Vohnout, B., Fabry, R. e Dusinska, M., 1998. DNA damage in diabetes: correlation with a clinical marker. *Free Radic Biol Med* 25, 373-7.
- Dandona, P., Thusu, K., Cook, S., Snyder, B., Makowski, J., Armstrong, D. e Nicotera, T., 1996. Oxidative damage to DNA in diabetes mellitus. *Lancet* 347, 444-5.
- Dincer, Y., Akcay, T., Alademir, Z. e Ilkova, H., 2002. Assessment of DNA base oxidation and glutathione level in patients with type 2 diabetes. *Mutat Res* 505, 75-81.
- Dormoy-Raclet, V., Markovits, J., Malato, Y., Huet, S., Lagarde, P., Montaudon, D., Jacquemin-Sablon, A. e Jacquemin-Sablon, H., 2007. Unr, a cytoplasmic RNA-binding protein with cold-shock domains, is involved in control of apoptosis in ES and HuH7 cells. *Oncogene* 26, 2595-605.

- Gao, Y., Feng, H.C., Walder, K., Bolton, K., Sunderland, T., Bishara, N., Quick, M., Kantham, L. e Collier, G.R., 2004. Regulation of the selenoprotein SelS by glucose deprivation and endoplasmic reticulum stress - SelS is a novel glucose-regulated protein. *FEBS Lett* 563, 185-90.
- Gao, Y., Walder, K., Sunderland, T., Kantham, L., Feng, H.C., Quick, M., Bishara, N., de Silva, A., Augert, G., Tenne-Brown, J. e Collier, G.R., 2003. Elevation in Tanis expression alters glucose metabolism and insulin sensitivity in H4IIE cells. *Diabetes* 52, 929-34.
- Giardino, I., Edelstein, D. e Brownlee, M., 1996. BCL-2 expression or antioxidants prevent hyperglycemia-induced formation of intracellular advanced glycation endproducts in bovine endothelial cells. *J Clin Invest* 97, 1422-8.
- Hardoon, S.L., Morris, R.W., Thomas, M.C., Wannamethee, S.G., Lennon, L.T. e Whincup, P.H., 2010. Is the recent rise in type 2 diabetes incidence from 1984 to 2007 explained by the trend in increasing BMI?: evidence from a prospective study of British men. *Diabetes Care* 33, 1494-6.
- Ismail-Beigi, F., 2012a. Clinical practice. Glycemic management of type 2 diabetes mellitus. *N Engl J Med* 366, 1319-27.
- Ismail-Beigi, F., 2012b. Pathogenesis and glycemic management of type 2 diabetes mellitus: a physiological approach. *Arch Iran Med* 15, 239-46.
- Khan, N.I., Naz, L. e Yasmeen, G., 2006. Obesity: an independent risk factor for systemic oxidative stress. *Pak J Pharm Sci* 19, 62-5.
- King, H., Aubert, R.E. e Herman, W.H., 1998. Global burden of diabetes, 1995-2025: prevalence, numerical estimates, and projections. *Diabetes Care* 21, 1414-31.
- Kundu, T.K., Hille, R., Velayutham, M. e Zweier, J.L., 2007. Characterization of superoxide production from aldehyde oxidase: an important source of oxidants in biological tissues. *Arch Biochem Biophys* 460, 113-21.
- Lee, H.C. e Wei, Y.H., 2007. Oxidative stress, mitochondrial DNA mutation, and apoptosis in aging. *Exp Biol Med (Maywood)* 232, 592-606.
- Lodovici, M., Giovannelli, L., Pitozzi, V., Bigagli, E., Bardini, G. e Rotella, C.M., 2008. Oxidative DNA damage and plasma antioxidant capacity in type 2 diabetic patients with good and poor glycaemic control. *Mutat Res* 638, 98-102.
- Low, J.C., Felner, E.I., Muir, A.B., Brown, M., Dorcellet, M., Peng, L. e Umpierrez, G.E., 2012. Do obese children with diabetic ketoacidosis have type 1 or type 2 diabetes? *Prim Care Diabetes* 6, 61-5.
- Marx, J., 2002. Unraveling the causes of diabetes. *Science* 296, 686-9.
- Nathan, D.M., Buse, J.B., Davidson, M.B., Ferrannini, E., Holman, R.R., Sherwin, R. e Zinman, B., 2009. Medical management of hyperglycemia in type 2 diabetes: a consensus algorithm for the initiation and adjustment of therapy: a consensus statement of the American Diabetes Association and the European Association for the Study of Diabetes. *Diabetes Care* 32, 193-203.
- Nathan, D.M., Turgeon, H. e Regan, S., 2007. Relationship between glycated haemoglobin levels and mean glucose levels over time. *Diabetologia* 50, 2239-44.
- Neeley, W.L. e Essigmann, J.M., 2006. Mechanisms of formation, genotoxicity, and mutation of guanine oxidation products. *Chem Res Toxicol* 19, 491-505.
- Niedowicz, D.M. e Daleke, D.L., 2005. The role of oxidative stress in diabetic complications. *Cell Biochem Biophys* 43, 289-330.
- Otteneider, M.B., Knutson, C.G., Daniels, J.S., Hashim, M., Crews, B.C., Remmel, R.P., Wang, H., Rizzo, C. e Marnett, L.J., 2006. In vivo oxidative metabolism of a major peroxidation-derived DNA adduct, M1dG. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 6665-9.
- Pan, H.Z., Chang, D., Feng, L.G., Xu, F.J., Kuang, H.Y. e Lu, M.J., 2007. Oxidative damage to DNA and its relationship with diabetic complications. *Biomed Environ Sci* 20, 160-3.
- Rodbard, H.W., Jellinger, P.S., Davidson, J.A., Einhorn, D., Garber, A.J., Grunberger, G., Handelsman, Y., Horton, E.S., Lebovitz, H., Levy, P., Moghissi, E.S. e Schwartz, S.S., 2009. Statement by an American Association of Clinical Endocrinologists/American College of Endocrinology consensus panel on type 2 diabetes mellitus: an algorithm for glycemic control. *Endocr Pract* 15, 540-59.
- Rosenquist, T.A., Zharkov, D.O. e Grollman, A.P., 1997. Cloning and characterization of a mammalian 8-oxoguanine DNA glycosylase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 7429-34.
- Salaspuro, V. e Salaspuro, M., 2004. Synergistic effect of alcohol drinking and smoking on in vivo acetaldehyde concentration in saliva. *Int J Cancer* 111, 480-3.

- Sharpe, P.C., Yue, K.K., Catherwood, M.A., McMaster, D. e Trimble, E.R., 1998. The effects of glucose-induced oxidative stress on growth and extracellular matrix gene expression of vascular smooth muscle cells. *Diabetologia* 41, 1210-9.
- Singh, N.P., McCoy, M.T., Tice, R.R. e Schneider, E.L., 1988. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res* 175, 184-91.
- Stolar, M.W., Hoogwerf, B.J., Gorshow, S.M., Boyle, P.J. e Wales, D.O., 2008. Managing type 2 diabetes: going beyond glycemic control. *J Manag Care Pharm* 14, s2-19.
- Tatsch, E., Bochi, G.V., Piva, S.J., De Carvalho, J.A., Kober, H., Torbitz, V.D., Duarte, T., Signor, C., Coelho, A.C., Duarte, M.M., Montagner, G.F., Da Cruz, I.B. e Moresco, R.N., 2012. Association between DNA strand breakage and oxidative, inflammatory and endothelial biomarkers in type 2 diabetes. *Mutat Res* 732, 16-20.
- Tice, R.R., Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann, A., Kobayashi, H., Miyamae, Y., Rojas, E., Ryu, J.C. e Sasaki, Y.F., 2000. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ Mol Mutagen* 35, 206-21.
- Triqueneaux, G., Velten, M., Franzon, P., Dautry, F. e Jacquemin-Sablon, H., 1999. RNA binding specificity of Unr, a protein with five cold shock domains. *Nucleic Acids Res* 27, 1926-34.
- Uwaifo, G.I. e Ratner, R.E., 2007. Differential effects of oral hypoglycemic agents on glucose control and cardiovascular risk. *Am J Cardiol* 99, 51B-67B.
- van Loon, B., Markkanen, E. e Hubscher, U., 2010. Oxygen as a friend and enemy: How to combat the mutational potential of 8-oxo-guanine. *DNA Repair (Amst)* 9, 604-16.
- Walder, K., Kantham, L., McMillan, J.S., Trevaskis, J., Kerr, L., De Silva, A., Sunderland, T., Godde, N., Gao, Y., Bishara, N., Windmill, K., Tenne-Brown, J., Augert, G., Zimmet, P.Z. e Collier, G.R., 2002. Tanis: a link between type 2 diabetes and inflammation? *Diabetes* 51, 1859-66.
- Weigert, J., Neumeier, M., Bauer, S., Mages, W., Schnitzbauer, A.A., Obed, A., Groschl, B., Hartmann, A., Schaffler, A., Aslanidis, C., Scholmerich, J. e Buechler, C., 2008. Small-interference RNA-mediated knock-down of aldehyde oxidase 1 in 3T3-L1 cells impairs adipogenesis and adiponectin release. *FEBS Lett* 582, 2965-72.

Table 1. Clinical characteristics of type 2 diabetic patients.

Patient	Age (years)	Gender	BH		AH		HT	DLP	MR	MN
			Fasting Glucose (mg/dL)	HbA1c (%)	Fasting Glucose (mg/dL)	HbA1c (%)				
1	30	M	161	8.6	103	8.4	X	X	-	-
2	38	M	145	8.0	87	7.6	-	-	X	-
3	44	F	221	6.9	195	6.9	-	-	-	-
4	45	F	220	9.8	77	8.3	-	X	-	-
5	37	F	350	13.2	209	12.8	X	-	-	-
6	61	M	240	10.6	123	9.3	X	X	-	X
7	33	F	89	11.8	79	10.3	-	-	-	-
8	64	F	183	12.0	83	12.8	-	X	X	-
9	51	F	162	9.7	94	7.5	X	X	-	-
10	61	F	258	8.5	93	8.0	-	X	-	-

BH: before hospitalization; AH: after hospitalization; HbA1c: glycated hemoglobin; HT: hypertension; DLP: dyslipidemia; MR: mild retinopathy; MN: mild nephropathy. X denotes the presence of the corresponding comorbidity.

Table 2. Levels of fasting glucose and glycated hemoglobin in controls and in T2DM patients pre- and post-hospitalization.

	Control (n = 12)	T2DM/BH (n = 10)	T2DM/AH (n = 10)
Fasting Glucose (mg/dL)	93.42 ± 6.60	202.9 ± 72.13*	114.3 ± 48.20 [#]
HbA1c (%)	5.47 ± 0.20	9.91 ± 1.99*	9.19 ± 2.13*

The values represent the mean ± standard deviation of 10 T2DM patients and 12 healthy subjects. BH: before hospitalization; AH: after hospitalization; HbA1c: glycated hemoglobin. [#] denotes p < 0.05 compared to the corresponding BH value; *denotes p < 0.05 compared to the corresponding control value.

Table 3. DNA damage analyzed by the comet assay in samples from three groups: control, T2DM patients pre- and post-hospitalization.

	Control (n = 16)	T2DM/BH (n = 10)	T2DM/AH (n = 10)
(-) hOGG1	2.57 ± 1.37	6.69 ± 3.68*	4.38 ± 3.00 ^{#*}
(+) hOGG1	4.33 ± 1.91	8.51 ± 3.17*	6.06 ± 1.69*

The values represent the TI (percentage of DNA in the tail) mean ± standard deviation of 10 T2DM patients and 16 healthy individuals. BH: before hospitalization; AH: after hospitalization; (-) hOGG1: conventional comet assay; (+) hOGG1: modified comet assay. [#] denotes p < 0.05 compared to the corresponding BH value. * denotes p < 0.05 compared to the corresponding control value.

Table 4. Genes expressing high Fold Change values in AH compared to BH patients.

Accession Number	Gene Symbol	Gene Description	Fold Change
NM_001159	AOX1	Aldehyde oxidase 1	-3.29
NM_007158	CSDE1	Cold shock domain containing E1, RNA-binding	6.01
NM_203472	SELS	Selenoprotein S	-3.06

AH: after hospitalization; BH: before hospitalization.

Figure 1. DNA damage analysis in the control group and in T2DM patients pre- and post-hospitalization by the Comet Assay. DNA damage levels are expressed as the TI (percentage of DNA in the tail) means of 10 T2DM patients and 16 healthy individuals. Bars represent standard deviation means. BH: before hospitalization; AH: after hospitalization; (-) hOGG1: conventional comet assay; (+) hOGG1: modified comet assay. # denotes $p < 0.05$ compared to the corresponding BH value. * denotes $p < 0.05$ compared to the corresponding control value.

Figure 2. Volcano Plot Representing the Expression Profiles of Genes Involved in Oxidative Stress and Antioxidant Defense Pathways from Six T2DM Patients. Volcano plot analysis reveals the absence of genes with significant expression in AH in relation to BH patients. Each open circle represents one out of the 84 genes analyzed by PCR array. The three genes with high FC values are represented in color; red color indicates up-regulation; green color indicates down-regulation. The X-axis displays the FC values in log2 of T2DM patients post-hospitalization in comparison to T2DM patients pre-hospitalization. The Y-axis displays the t-test p-values in $-\log_{10}$. AH: after hospitalization; BH: before hospitalization; FC: fold change.

Gene expression profiles displayed by peripheral blood mononuclear cells from patients with type 2 diabetes mellitus focusing on biological processes implicated on the pathogenesis of the disease

Fernanda S. Manoel-Caetano ^{a,b,1}, Danilo J. Xavier ^{b,1}, Adriane F. Evangelista ^b, Paula Takahashi ^b, Cristhianna V. Collares ^b, Denis Puthier ^c, Maria C. Foss-Freitas ^d, Milton C. Foss ^d, Eduardo A. Donadi ^d, Geraldo A. Passos ^{b,e}, Elza T. Sakamoto-Hojo ^{a,b,*}

^a Department of Biology, Faculty of Philosophy, Sciences and Letters of Ribeirão Preto, University of São Paulo — USP, Ribeirão Preto, SP, Brazil

^b Department of Genetics, Faculty of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo — USP, Ribeirão Preto, SP, Brazil

^c Inserm U928, TAGC, Aix-Marseille Université IFR137, Marseille, France

^d Department of Medical Clinic, Faculty of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo — USP, Ribeirão Preto, SP, Brazil

^e Department of Morphology, Stomatology, and Physiology, School of Dentistry of Ribeirão Preto, University of São Paulo — USP, Ribeirão Preto, SP, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Accepted 11 September 2012

Available online 2 October 2012

Keywords:

Type 2 diabetes mellitus
Gene expression
Inflammatory response
Oxidative stress
DNA repair
Gene set analysis

ABSTRACT

Patients with type 2 diabetes mellitus (T2DM) exhibit insulin resistance associated with obesity and inflammatory response, besides an increased level of oxidative DNA damage as a consequence of the hyperglycemic condition and the generation of reactive oxygen species (ROS). In order to provide information on the mechanisms involved in the pathophysiology of T2DM, we analyzed the transcriptional expression patterns exhibited by peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from patients with T2DM compared to non-diabetic subjects, by investigating several biological processes: inflammatory and immune responses, responses to oxidative stress and hypoxia, fatty acid processing, and DNA repair. PBMCs were obtained from 20 T2DM patients and eight non-diabetic subjects. Total RNA was hybridized to Agilent whole human genome 4×44K one-color oligo-microarray. Microarray data were analyzed using the GeneSpring GX 11.0 software (Agilent). We used BRB-ArrayTools software (gene set analysis — GSA) to investigate significant gene sets and the Genomica tool to study a possible influence of clinical features on gene expression profiles. We showed that PBMCs from T2DM patients presented significant changes in gene expression, exhibiting 1320 differentially expressed genes compared to the control group. A great number of genes were involved in biological processes implicated in the pathogenesis of T2DM. Among the genes with high fold-change values, the up-regulated ones were associated with fatty acid metabolism and protection against lipid-induced oxidative stress, while the down-regulated ones were implicated in the suppression of pro-inflammatory cytokines production and DNA repair. Moreover, we identified two significant signaling pathways: adipocytokine, related to insulin resistance; and ceramide, related to oxidative stress and induction of apoptosis. In addition, expression profiles were not influenced by patient features, such as age, gender, obesity, pre/post-menopause age, neuropathy, glycemia, and HbA_{1c} percentage. Hence, by studying expression profiles of PBMCs, we provided quantitative and qualitative differences and similarities between T2DM patients and non-diabetic individuals, contributing with new perspectives for a better understanding of the disease.

© 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

Abbreviations: BMI, body mass index; FA, fatty acid; FC, fold-change; FFA, free fatty acid; GO, gene ontology; GSA, gene set analysis; HbA_{1c}, glycated hemoglobin; IGA, individual gene analysis; IKK, I-kappa-B kinase; IL, interleukin; IRS, insulin receptor substrate; JNK, c-jun N-terminal kinase; NF-κB, nuclear factor-kappa B; OGTT, oral glucose tolerance test; OXPHOS, oxidative phosphorylation; PBMC, peripheral blood mononuclear cell; PCNA, proliferating cell nuclear antigen; RIN, RNA integrity number; ROS, reactive oxygen species; SOCs, suppressors of cytokine signaling; T2DM, type 2 diabetes mellitus; TLR, toll-like receptor; TNFα, tumor necrosis factor-alpha.

* Corresponding author at: Department of Biology — Faculty of Philosophy, Sciences and Letters of Ribeirão Preto, University of São Paulo — USP, Ribeirão Preto, SP, Av. Bandeirantes, 3900, Monte Alegre, 14040-901, Ribeirão Preto/SP, Brazil. Tel.: +55 16 3602 3827; fax: +55 16 3602 0222.

E-mail address: etshojo@usp.br (E.T. Sakamoto-Hojo).

¹ These authors contributed equally to this work.

1. Introduction

Type 2 diabetes mellitus (T2DM) is described as a progressive metabolic syndrome characterized by an initial peripheral insulin resistance in adipose tissue, liver, and skeletal muscle, and subsequent pancreatic beta cells dysfunction in an attempt to compensate for insulin resistance (Saltiel, 2001). The development of insulin resistance and the disease progression have both been associated with obesity (Stumvoll et al., 2005; Kahn et al., 2006; Belkina and Denis, 2010). According to the World Health Organization, about 90% of diabetic patients develop T2DM mainly because of excess body weight (WHO, 2011). The world

increase in obesity incidence has been accompanied by a lifestyle consisting of a high-calorie diet and reduced physical activity, especially among populations of developed countries and children (Hossain et al., 2007).

Obesity has become a major risk factor for the metabolic disease due to increased release of fatty acids (FA), which serve as ligands for cell surface toll-like receptors (TLRs), triggering an adipose tissue infiltration by immune system components, particularly macrophages (reviewed in Nikolajczyk et al., 2011), which secrete a number of cytokines including TNF α , interleukin (IL)-6, IL-1 β , and migration inhibitory factor (Olefsky and Glass, 2010). Elevated levels of circulating cytokines (TNF α and IL-6) have been observed in obese people and those with metabolic syndrome and T2DM (Pickup et al., 1997; Mohan et al., 2005). Moreover, increased mRNA levels of these cytokines were found in PBMCs from T2DM and impaired glucose tolerance patients (Tsiotra et al., 2007; Gokulakrishnan et al., 2009). These cytokines can disrupt insulin signaling through induction of cytokine signaling suppressors (SOCs) family proteins that participate in the degradation of insulin receptor substrates (IRS-1 and IRS-2) via the ubiquitin–proteasome pathway (Stumvoll et al., 2005; Lebrun and Van Obberghen, 2008). Moreover, the activation of stress-sensitive serine/threonine kinase *c-jun* N-terminal kinase (JNK) and/or nuclear factor-kappa B (NF- κ B) signaling pathways by cytokines also promotes direct inhibition of insulin action, by interfering with insulin binding to its receptor (Howard and Flier, 2006). In addition, hypoxia occurring in expanding adipose tissue also induces the expression of several pro-angiogenic and pro-inflammatory genes in macrophages that accumulate at hypoxia sites in an attempt to repair damaged tissues (Burke et al., 2003), providing a link between adipose tissue expansion and induction of inflammation (Donath and Shoelson, 2011).

As a consequence of insulin resistance, elevated glucose levels (hyperglycemia) in the bloodstream occur (Stumvoll et al., 2005), leading to an increased production of reactive oxygen species (ROS), which results in a condition known as oxidative stress (Brownlee, 2001). Furthermore, it has been shown that ROS are also capable of activating JNK, which phosphorylates the IRS-1 on serine residues, attenuating the insulin signaling (Hirosumi et al., 2002; Kabe et al., 2005; González et al., 2006). It has been reported that in addition to playing an important role in the pathophysiology of both type 1 and type 2 diabetes (Brownlee, 2001), enhanced oxidative stress is related to the development of complications associated with the disease, such as retinopathy, nephropathy, neuropathy, and cardiovascular disease (Brownlee, 2001; Pan et al., 2007; Henriksen et al., 2011). In order to neutralize the effects of ROS, including DNA oxidation, cells have developed complex repair mechanisms (Sancar et al., 2004). However, DNA damage analysis by comet assay indicated that patients with T2DM exhibit less efficient DNA repair associated with increased levels of oxidative DNA damage (Blasiak et al., 2004; Pan et al., 2007; Pácal et al., 2011), which have been reported as age-dependent events (Pácal et al., 2011).

A significant difference in the expression of genes involved in insulin signaling in skeletal muscle from patients with T2DM and first degree relatives has been identified by microarray analysis (Palsgaard et al., 2009). Marselli et al. (2010) observed (by the same method) a differential expression of genes associated with pancreatic regeneration (REG and MMP7), as well as genes linked to increased risk of developing T2DM (*IGF2BP2*, *TSPAN8*, *HNF1B*, *JAZF1*, and *SLC30A8*) in beta cell-enriched tissue from T2DM patients. Additionally, Takamura et al. (2007) found significant changes in the expression of genes involved in oxidative phosphorylation (OXPHOS) and JNK pathways in PBMCs from T2DM patients, which could reflect hyperglycemia-induced oxidative stress and morbidity, respectively.

It has been suggested that peripheral blood cells express approximately 80% of the genes encoded by the human genome and that these genes respond to body changes occurring in the macro and micro-environment (Liew et al., 2006). Due to continuous interaction

between blood cells and the entire body associated with the fast turnover rate of these cells, it is possible that subtle changes that occur within the cells and tissues in response to injury or disease may trigger specific changes in gene expression (Liew et al., 2006), with blood cells likely reflecting those changes. Because of the readily availability of peripheral blood cells (in comparison to target tissues of insulin action) and the fact that PBMCs have the same transport proteins present in vascular smooth muscle cells, myocardial tissue, and other target cells affected in diabetes mellitus, these cells have been described as a model system to study the pathophysiology of diabetes and its complications (Balasubramanyam et al., 2002).

Considering the hypothesis that circulating blood cells may reflect the health or illness status of a particular tissue, due to changes in the gene expression pattern of their transcriptome (Liew et al., 2006), in addition to some evidence showing that inflammatory process, fatty acids metabolism, response to oxidative stress, and DNA repair might be impaired in diabetic patients, we conducted a microarray study to investigate the transcriptional expression patterns exhibited by PBMCs from T2DM patients compared to PBMCs from non-diabetic subjects. We focused on expression profiles of genes involved in inflammation, immune response, response to oxidative stress, response to hypoxia, fatty acid processing, and DNA repair in a supervised way. Additionally, we performed a prior biological knowledge-based approach for the analysis of genome-wide expression profiles using GSA to identify the gene sets that are differentially expressed in T2DM patients versus non-diabetic subjects in a non-supervised way. Lastly, the possible influence of clinical features on gene expression profiles was also studied in T2DM patients by the use of a hypergeometric analysis approach.

2. Material and methods

2.1. Subjects

The present study comprised 20 type 2 diabetes mellitus patients (7 men and 13 women, mean age = 52 years, ranging from 41 to 72 years), who were diagnosed according to the American Diabetes Association protocol (Bloomgarden, 1997), recruited in the Outpatient Endocrinology of the Clinical Hospital, Faculty of Medicine, University of São Paulo, Ribeirão Preto, Brazil and eight healthy volunteers (04 men and 04 women, mean age = 53 years, ranging from 48 to 65 years). The study protocol was approved by the local Ethics Committee. After obtaining informed written consent, peripheral blood samples were collected from patients and non-diabetic subjects. The main clinical characteristics of diabetic patients and non-diabetic subjects are described in Table 1. Regarding the age of subjects, the average values of both groups were not statistically different ($p=0.816$). However,

Table 1
Clinical characteristics of patients with type 2 diabetes mellitus (T2DM) and non-diabetic subjects (control group).

	T2DM	Control
Subjects (n)	20	8
Age (years)	52.8 $\pm$ 9.1	53.6 $\pm$ 5.8
Gender	7M; 13F	4M; 4F
Blood glucose (mg/dL)	159.5 $\pm$ 84.0	92.5 $\pm$ 5.7
Duration of diabetes (years)	9.4 $\pm$ 5.5	–
Insulin therapy	Regular/NPH (n = 3) NPH (n = 10) No use (n = 7)	–
Metformin 850 mg	1–3 times per day (n = 18) No use (n = 2)	–
Glycated hemoglobin (%)	8.4 $\pm$ 2.1	5.5 $\pm$ 0.1
Mild/incipient neuropathy	n = 6	–
Obesity (29.7 kg/m ² < BMI < 38 kg/m ²)	n = 5	–

M = male; F = female; HbA_{1c} = glycated hemoglobin; NPH = neutral protamine Hagedorn; BMI = body mass index. Duration of diabetes was defined as the period from diabetes onset until the enrollment in the study. Data are expressed as mean $\pm$ standard deviation (SD).

diabetic patients showed significantly higher values of blood glucose levels ($p=0.027$) and percentage of glycated hemoglobin ($p=0.002$) when compared to control subjects (Table 1).

Diabetic patients presented hypertension and hyperlipidemia, and most of them were either overweight or obese grade I (mean BMI = 29.7 kg/m^2 , ranging from 25.1 to 38.0 kg/m^2). The average duration of diabetes was 9.4 ± 5.5 years. Almost all patients (90%) were receiving prior treatment with human insulin (Biohulin®, and Humulin R Biobrás®, Lilly), captopril (Capoten, Bristol-Squibb-M), and metformin (Gluciformin, Glifage®). We excluded patients with late diabetic complications (such as proliferative retinopathy, consolidated nephropathy, kidney failure, heart disease, and autonomic neuropathy), which could influence the results. For the control group, we selected individuals without family history of radiation exposure, infections, medications, and diabetes. Oral glucose tolerance test (OGTT) and glycated hemoglobin (HbA_{1c}) test were performed for all healthy subjects to assure that those values were within normal ranges.

2.2. Isolation of peripheral blood mononuclear cells and RNA extraction

Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated from 20 ml of freshly peripheral venous blood collected from each subject by centrifugation on a Histopaque-1077 (Sigma-Aldrich Inc., USA) density gradient. Total RNA was extracted using the Trizol® reagent (Invitrogen, Rockville, MD, USA) according to manufacturer's instructions. RNA was quantified by Nanodrop ND-1000 Spectrophotometer (Uniscience, São Paulo, Brazil) and its integrity was assessed by microfluidic electrophoresis using Agilent RNA Nano 6000 chips and Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). RNA samples were used for the microarray analysis only if protein- and phenol-free, featuring an RNA Integrity Number (RIN) ≥ 8.0 .

2.3. RNA amplification, labeling, microarray hybridization, and data analysis

Gene expression profiles were evaluated using the Agilent one-color (Cy3 fluorochrome) microarray-based gene expression platform according to manufacturer's instructions. Total RNA (500 ng) was amplified and labeled using the one-color Quick Amp labeling kit (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Complementary RNA (cRNA) samples were hybridized onto whole human genome $4 \times 44\text{K}$ 60-mer oligonucleotide arrays (G4112F, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) for 17 h at 65°C in a rotator oven, followed by washing with Wash Buffers (Agilent Technologies). After the washing step, the slides were scanned using an Agilent Microarray Scanner (Agilent Technologies) and the hybridization signals were extracted using the Agilent Feature Extraction software, version 10.5. Gene expression profiles of PBMCs from T2DM and non-diabetic subjects were compared. For the control group, a collection of total RNA samples (pools) from eight subjects were gathered and three technical replicates were performed. A complete file that provides the entire list of genes present in the microarray used in this study, as well as the experimental conditions, is available online at the MIAME public database ArrayExpress, accession E-MEXP-3286 (control group) and E-MEXP-3287 (T2DM patients).

The microarray numerical values were analyzed using the GeneSpring GX 11.0 software, according to the advanced workflow: quantile normalization, filter by flags (detected), filter by expression on the normalized data (20.0–75.0th percentile), and filter by error (coefficient of variation $< 7.0\%$). Statistical analysis was performed using unpaired *t*-test considering Benjamini–Hochberg corrected *p*-value of 0.01. The pairwise average-linkage cluster analysis was applied to differentially expressed genes using the Cluster 3.0 and Treeview software (Eisen et al., 1998), a method of hierarchical clustering in which relationships among genes are represented by a tree whose branch lengths reflect the degree of similarity between the

genes. Differentially expressed genes with fold-change (FC) greater than or equal to 1.5 (up or down) were considered for the present study. Gene Ontology (included in the GeneSpring GX 11.0 software – Agilent) was used as a categorization tool to select among the differentially expressed genes, those related to processes of interest. SOURCE (source.stanford.edu) public database was also used to seek information regarding specific functions of genes.

2.4. Gene set analysis (GSA)

In the present study, GSA analysis was performed using BRB-ArrayTools (developed by: Richard Simon and BRB-ArrayTools Development Team) to identify differentially expressed gene sets (T2DM patients versus non-diabetic subjects). To accomplish that, 8699 genes (obtained after normalization and filtering in GeneSpring GX 11.0) were considered, resulting in 145 and 201 gene sets for the KEGG and BioCarta pathways, respectively. LS/KS permutation test and Efron–Tibshirani's GSA maxmean test were performed considering 0.05 as the threshold for significant gene sets, with 1000 permutations being used for Efron–Tibshirani's GSA maxmean test.

2.5. Hypergeometric analysis to compare patient features with gene sets

Genomica software (Segal et al., 2004) uses an ensemble of tools which searches for higher-order modules of gene sets and groups of samples. Initially, this algorithm performed filtering by selecting only genes that were induced or repressed. Subsequently, the data were statistically analyzed by FDR-corrected hypergeometric distribution (modified Fisher's test; $p < 0.05$, $\text{FDR} < 0.05$) to compare two categories: modulated genes (filtered) that are part of a gene prior notation (gene set) and data that may characterize these genes (array sets). Thus, it is possible to generate sets of compartmentalized genes arranged in modules (module maps), which discriminates gene patterns of variables in accordance with the pattern of each patient, i.e., gene sets/array sets comparison (statistical hypergeometric).

2.5.1. Variables of array set and gene set construction

The variables used to create the array sets included age, gender (M), gender (F), pre/post-menopause age, obesity, neuropathy, glycemia (blood glucose level), and HbA_{1c} (%). All input variables were transformed into binary data (0 or 1), according to the nature of the variable, i.e., qualitative variables were assigned by the absence (0) or presence (1) of the characteristic and the quantitative variables were assigned by values below (0) or above (1) the mean values (Table 1; Fig. 1). The gene set variables included significant KEGG and BioCarta pathways identified by GSA from both the LS/KS permutation test and the Efron–Tibshirani's GSA maxmean test, to increase the number of available pathways for module map analysis.

3. Results

3.1. Differential mRNA expression in PBMCs from T2DM patients

In the present study, we compared the gene expression profile displayed by PBMCs from T2DM patients receiving insulin plus oral antidiabetic drug (metformin) with that of control subjects by using the GeneSpring GX 11.0 software (Agilent). The volcano plot analysis demonstrated differences in mRNA expression levels between T2DM and control groups considering *p*-value cutoff = 0.01 and fold-change cutoff = 1.5 (up- or down-regulated). We identified 1320 differentially expressed genes: 613 up-regulated and 707 down-regulated (Fig. 2). The majority of differentially expressed genes in PBMCs from T2DM patients exhibited expression levels lower than 4.0-fold change (up or down) when compared to non-diabetic subjects, and a few genes showed $\text{FC} \geq 4.0$.

Fig. 1. Schematic representation of several features of T2DM patients: age, gender (M), gender (F), pre/post-menopause age, obesity, neuropathy, glycemia (blood glucose level), and HbA_{1c} percentage. On the basis of those features, arrays sets were constructed, comprising a part for the hypergeometric analysis. All input variables were transformed into binary data (0 or 1), according to the nature of the variable, i.e., qualitative variables were assigned by the absence (0) or presence (1) of the characteristic, and quantitative variables were assigned by values below or above the mean values. For each characteristic, patients exhibiting values below or above the mean value are indicated in black boxes.

The hierarchical clustering analysis for the list of 1320 differentially expressed genes showed that patients with T2DM presented a distinct transcript expression profile compared to non-diabetic subjects (Supplementary Fig. 1). Based on the degree of similarity between the genes, it was possible to observe that twelve diabetic patients (Patients 01, 03, 09, 11 to 17, 19, and 20) presenting high average levels of blood glucose (172.4 mg/dl) and glycated hemoglobin (8.7%) grouped more distant from the control group, while seven of them (Patients 02, 04, 05, 06, 07, 08, and 18) presenting low average levels of blood glucose (150.5 mg/dl) and glycated hemoglobin (7.9%) grouped closer to the control group. Interestingly, one patient (T2D-10) with low blood glucose (65 mg/dl) was clustered within the control group (average blood glucose = 92.5 mg/dl).

After using Gene Ontology tool to categorize all differentially expressed genes in diabetic patients compared to the control group,

we selected six processes of interest, which included 92 genes (52 up-regulated and 40 down-regulated): immune response (GO: 0006955), response to oxidative stress (GO: 0006979), response to hypoxia (GO: 0001666), inflammatory response, (GO: 0006954), DNA repair (GO: 0006281) and fatty acid metabolic process (GO: 0006631) (Table 2).

In addition, we observed that among the 92 differentially expressed genes distributed into the six biological processes of interest, some genes were shared among two or more biological processes, such as *RELA*, *UCP3*, *STAT5B*, *PLD2*, *PSEN2*, *IL17A*, and *CRCP* (up-regulated genes involved in inflammation, responses to hypoxia and oxidative stress, and fatty acid processing), as well as *ARNT*, *CAT*, and *MSH2* (down-regulated genes implicated in response to oxidative stress, DNA repair, and response to hypoxia). Overall, our findings indicated a great number of genes involved in biological processes implicated in the pathogenesis of T2DM that deserve to be further investigated.

3.2. Differentially expressed gene sets in PBMCs from T2DM patients

The GSA test (BRB-ArrayTools developed by: Richard Simon and BRB-ArrayTools Development Team) was applied to identify differentially expressed gene sets in T2DM patients versus non-diabetic subjects in a non-supervised way. Out of the 201 gene sets determined by BioCarta pathway and 145 gene sets determined by KEGG pathway, 52 and 33 gene sets passed the 0.05 significance threshold, respectively (Supplementary Tables 1 and 2). By the LS/KS permutation test, 49 BioCarta pathway gene sets and 30 KEGG pathway gene sets were identified as significant. After performing Efron–Tibshirani's maxmean test, we obtained 13 significant BioCarta pathway gene sets (Table 3) and 8 significant KEGG pathway gene sets (Table 4). Among the pathways identified as significant by the Efron–Tibshirani's maxmean test, we selected two pathways of interest: ceramide signaling pathway (*h_ceramidePathway* — $p=0.022$) and adipocytokine signaling pathway (*hsa04920* — $p=0.041$) (Fig. 3). Both pathways were up-regulated in T2DM patients.

3.3. Hypergeometric analysis to compare patient features with gene sets

Finally, we evaluated the influence of patient features, such as age, gender, pre/post-menopause age, obesity, neuropathy, glycemia, and HbA_{1c} percentage, on the differential expression profiles of genes participating in each pathway obtained from GSA. In this analysis,

Fig. 2. Volcano plot analysis applied to the microarray data revealed 1320 genes that were significantly expressed [$p<0.01$ with $FC\geq 1.5$ (up or down)] in diabetic patients compared to controls. The plot shows a log₂-fold change in mRNA expression between the two groups on the X-axis and the negative log of *t*-test *p*-values on the y-axis. Each gene was represented by a single point and dark gray areas indicate genes with significant changes in gene expression.

patient features (array sets) and a list of genes obtained for each pathway after GSA analysis (gene sets) were simultaneously compared to identify clinical conditions (array sets) in which each gene set had a prominent expression signature, by testing whether the expression of a statistically significant fraction of the genes in the set changed coordinately in the array (clinical features). According to Segal et al. (2004), the change in the expression of each gene in a given array is relative to the average expression of the gene across all arrays in the relevant data set. For the pathways analyzed by the hypergeometric analysis, we did not find a significant gene expression signature correlating any of the significant pathways identified in PBMCs from T2DM patients with different patient features, thus indicating the lack of influence of those clinical features on gene expression profiles of T2DM patients (data not shown).

4. Discussion

In this study, the microarray method was conducted to investigate gene expression profiles displayed by PBMCs from patients with T2DM receiving insulin plus metformin treatment in comparison to control subjects (non-diabetics). The analysis resulted in a list of 1320 differentially expressed genes (613 up-regulated and 707 down-regulated) in T2DM patients. According to Yang et al. (2009), down-regulated genes might represent candidate genes responsible for at least some of the chronic complications found in T2DM, whereas up-regulated ones might represent candidate genes responsible for the pathogenesis of the disease. Therefore, our list of differentially expressed genes deserves further investigation regarding these approaches. According to the volcano plot analysis (Fig. 2), the majority of the differentially expressed genes exhibited FC values ranging from 1.5 to 4.0 (up or down) in diabetic patients versus the control group; in addition, we observed only a few genes with $FC \geq 4.0$ (up or down). In skeletal muscle and adipose tissue of Chinese patients with T2DM, Yang et al. (2009) reported that most of the differentially expressed genes exhibited $FC = 2.0$ to 3.0 (up or down), and only a few genes presented FC values greater than 4.0 (up or down) compared to the controls, which is consistent with our results. Accordingly, Palsgaard et al. (2009) also evaluated gene expression profiles in skeletal muscle biopsies from T2DM patients and did not report FC values that exceeded 2.0 (up or down). Thus, our findings indicate that PBMCs from patients with T2DM receiving oral treatments (insulin and metformin) during several years exhibited changes in expression levels that did not exceed a 4.0-fold change (apart from a few exceptions) when compared to the expression levels displayed by non-diabetic subjects, which is in agreement with other studies.

Results from hierarchical clustering analysis performed on the list of 1320 differentially expressed genes showed that, as expected, T2DM patients were grouped separately from non-diabetic subjects. By investigating gene expression profiles in beta-cell enriched tissue, Marselli et al. (2010) also observed separation of samples from diabetic and control subjects by the same analysis. Similarly, Grayson et al. (2011) reported that expression profiles obtained in peripheral whole blood were sufficient to distinguish between rheumatoid arthritis and control subjects, as well as the inflammatory metabolic states of a series of comorbidities: metabolic syndrome, coronary artery disease, and T2DM and their corresponding control subjects. As shown in Supplementary Fig. 1, patients with high levels of blood glucose and glycated hemoglobin were grouped farther away from the control group than those patients with low blood glucose levels and glycated hemoglobin. It has been suggested that the harmful effects of exposure to high glucose levels persisting for many years after episodes of altered glycaemic control can lead to a “hyperglycemic memory”, and changes in enzymes involved in histone methylation and demethylation emphasize the potential long-term effects of glucose on gene expression (Brasacchio et al., 2009). Accordingly, some reports using models of transient hyperglycemia indicated that the active transcriptional

state of the *NF- κ B-p65* gene is linked to persisting epigenetic effects (El-Osta et al., 2008; Brasacchio et al., 2009;), with the transient spikes of hyperglycemia being a HbA_{1c} -independent risk factor for diabetic complications (El-Osta et al., 2008). Thus, the influence of hyperglycemia on gene expression, somewhat, can explain the distinct expression profiles displayed by diabetic patients compared to the control group, considering that half of the patients have been exhibiting high average blood glucose (226 mg/dl) for several years. Studies on this approach are currently under way in our group.

By applying the Gene Ontology as an annotation tool, we investigated expression profiles of genes implicated in response to oxidative stress, DNA repair, response to hypoxia, fatty acid metabolic process, and inflammatory and immune responses in PBMCs from patients with T2DM. From these six biological processes, we obtained a list of 92 differentially expressed genes (52 up-regulated and 40 down-regulated) in diabetic patients compared to the control group (Table 2). Interestingly, we observed that highly up-regulated genes were involved in fatty acid metabolic process (*CYP4F2*), and responses to oxidative stress and hypoxia (*OXR1*, *SMG1*, and *UCP3*).

Some lines of evidence had shown that hematopoietic cells act as determinants of inflammation linking obesity to insulin resistance and T2DM (Nikolajczyk et al., 2011). Increased free fatty acid levels seem to be the most critical factor involved in insulin resistance in T2DM patients (Kahn et al., 2006), probably due to elevated levels of circulating TLR ligands (free FA) as a consequence of obesity in diabetic patients (Dasu et al., 2010). In the present study, we observed a significant induction of *CYP4F2* gene, whose protein product catalyzes many reactions involved in drug metabolism and synthesis of cholesterol, steroids, and other lipids (SOURCE). Thus, our findings are in agreement with published data, which showed that in obesity and type 2 diabetes, increased free fatty acid (FFA) levels promote the activation of lymphocytes, which release cytokines locally and systemically, contributing to systemic inflammation in T2DM (Kahn et al., 2006; Dasu et al., 2010; Donath and Shoelson, 2011; Nikolajczyk et al., 2011).

In addition to immune cell-mediated inflammation, oxidative stress has been suggested to play an important role in the pathophysiology of both type 1 and type 2 diabetes mellitus (Nikolajczyk et al., 2011). We found significant changes in the expression levels of three genes that are activated in response to oxidative stress: *OXR1* (involved in protection from oxidative damage); *SMG1* (implicated in genotoxic stress response pathways), and *UCP3* (which showed the highest induction, with $FC = 3.51$). Expression levels of *UCP3* gene increase when FA supplies to mitochondria exceed their oxidation capacity with the protein encoded by this gene enabling the export of FA from mitochondria, protecting this organelle against lipid-induced oxidative stress (SOURCE). Other studies have demonstrated that in patients with T2DM, *UCP-3* levels were at least twice lower than in controls, suggesting a role in glucose homeostasis (Schrauwen et al., 2011; Schrauwen and Hesselink, 2004). In contrast, we observed that the transcript of *UCP-3* was more than three times higher in patients with T2DM compared to the control group. Thus, the up-regulation of this gene may indicate that those patients probably present an increased amount of circulating FFA likely due to obesity, considering that diabetic patients enrolled in our study were overweight (mean BMI = 29.7 kg/m²).

Among the 40 down-regulated genes included in the six selected biological processes (Table 2), we observed that many were involved in DNA repair and inflammatory and immune responses. Considering the immune response genes, the down-regulated ones corresponded to genes involved in immune response control, such as *CD46*, *IL37*, and *CHUK*. The protein encoded by *CD46* gene corresponds to a transmembrane protein that acts as a regulatory component of the complement system. Activation of the complement cascade can cause damage to the diabetic retinal capillaries (Boeri et al., 2001). Zhang et al. (2002) demonstrated decreased levels of complement inhibitors in human and experimental diabetic retinopathy, suggesting that diabetes causes impaired regulation of complement inhibitors. In contrast to Zhang et al.

Table 2

Up-regulated and down-regulated genes classified in six biological processes (inflammatory and immune responses, response to oxidative stress, response to hypoxia, fatty acid metabolic process, and DNA repair) observed in peripheral blood mononuclear cells from T2DM patients compared to controls.

Gene symbol	Gene name	Gene Ontology (biological process)	Fold change	Corrected p-value
<i>Up-regulated genes</i>				
POLR2A	Polymerase (RNA) II (DNA directed) polypeptide A, 220 kDa	DNA repair	1.50	0.006
AGPAT6	1-acylglycerol-3-phosphate O-acyltransferase 6 (lysophosphatidic acid acyltransferase, zeta)	Fatty acid metabolic process	1.50	1.19×10^{-5}
RELA	v-rel reticuloendotheliosis viral oncogene homolog A (avian)	Immune response, inflammatory response, and response to oxidative stress	1.51	2.77×10^{-6}
NLR5	NLR family, CARD domain containing 5	Immune response	1.51	0.003
HDAC5	Histone deacetylase 5	Inflammatory response	1.51	0.008
GNL1	Guanine nucleotide binding protein-like 1	Immune response	1.52	4.62×10^{-4}
AKT1	v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1	Inflammatory response	1.52	8.92×10^{-5}
MMS19	MMS19 nucleotide excision repair homolog (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)	DNA repair	1.53	0.003
ACADS	Acyl-CoA dehydrogenase, C-2 to C-3 short chain	Fatty acid metabolic process	1.54	0.006
TYK2	Tyrosine kinase 2	Immune response	1.54	0.008
PLD2	Phospholipase D2	Responses to hypoxia and oxidative stress	1.54	0.001
BAK1	BCL2-antagonist/killer 1	Response to oxidative stress	1.54	0.001
POLR2F	Polymerase (RNA) II (DNA directed) polypeptide F	DNA repair	1.55	0.006
RAD9A	RAD9 homolog A (<i>Schizosaccharomyces pombe</i>)	DNA repair	1.56	0.008
HERC2	HECT domain and RLD 2	DNA repair	1.57	0.006
HYOU1	Hypoxia up-regulated 1	Response to hypoxia	1.57	1.39×10^{-4}
STAT5B	Signal transducer and activator of transcription 5B	Fatty acid metabolic process, inflammatory response, and response to hypoxia	1.60	5.72×10^{-5}
MDM4	Mdm4 p53 binding protein homolog (mouse)	Response to hypoxia	1.60	0.003
SCD	Stearoyl-CoA desaturase (delta-9-desaturase)	Fatty acid metabolic process	1.63	0.001
STXBP2	Syntaxin binding protein 2	Immune response	1.63	8.99×10^{-4}
SFPQ	Splicing factor proline/glutamine-rich	DNA repair	1.64	1.34×10^{-4}
MAPKAPK2	Mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 2	Fatty acid metabolic process	1.64	1.87×10^{-5}
CIITA	Class II, major histocompatibility complex, transactivator	Immune response	1.65	0.002
MASP2	Mannan-binding lectin serine peptidase 2	Immune response	1.66	0.003
ADORA2A	Adenosine A2a receptor	Inflammatory response	1.66	0.003
TMEM161A	Transmembrane protein 161A	Response to oxidative stress	1.67	5.04×10^{-4}
POLE	Polymerase (DNA directed), epsilon	DNA repair	1.68	0.001
LPIN2	Lipin 2	Fatty acid metabolic process	1.71	0.003
PSEN2	Presenilin 2 (Alzheimer disease 4)	Response to hypoxia and immune response	1.73	0.004
CLDN3	Claudin 3	Response to hypoxia	1.75	0.009
HUWE1	HECT, UBA and WWE domain containing 1	DNA repair	1.77	0.001
IKBKE	Inhibitor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells, kinase epsilon	Immune response	1.77	0.002
SERPINA3	Serpin peptidase inhibitor, clade A (alpha-1 antiproteinase, antitrypsin), member 3	Inflammatory response	1.78	0.002
POLD3	Polymerase (DNA-directed), delta 3, accessory subunit	DNA repair	1.81	0.008
PTPLB	Protein tyrosine phosphatase-like (proline instead of catalytic arginine), member b	Fatty acid metabolic process	1.81	0.006
NFKB1B	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, beta	Immune response	1.85	2.41×10^{-4}
RAD23A	RAD23 homolog A (<i>S. cerevisiae</i>)	DNA repair	1.88	2.44×10^{-6}
HRH2	Histamine receptor H2	Immune response	1.90	0.004
APOA4	Apolipoprotein A-IV	Immune response	1.97	1.12×10^{-4}
SBN02	Strawberry notch homolog 2 (<i>Drosophila</i>)	Immune response	1.98	0.001
CYP4A11	Cytochrome P450, family 4, subfamily A, polypeptide 11	Fatty acid metabolic process	2.20	6.45×10^{-4}
OXR1	Oxidation resistance 1	Response to oxidative stress	2.23	7.72×10^{-4}
IL17A	Interleukin 17A	Immune response and inflammatory response	2.27	0.006
APOBEC3F	Apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like 3 F	Immune response	2.29	0.002
SMG1	smg-1 homolog, phosphatidylinositol 3-kinase-related kinase (<i>Caenorhabditis elegans</i>)	DNA repair/genotoxic stress response pathways	2.43	7.69×10^{-5}
CREBBP	CREB binding protein	Response to hypoxia	2.43	0.004
GPX5	Glutathione peroxidase 5 (epididymal androgen-related protein)	Response to oxidative stress	2.43	0.005
CRCP	CGRP receptor component	Immune response and inflammatory response	2.45	0.002
DRD2	Dopamine receptor D2	Response to hypoxia	2.53	1.30×10^{-4}
BCL2	B-cell CLL/lymphoma 2	Immune response and response to hypoxia	2.58	0.003
CYP4F2	Cytochrome P450, family 4, subfamily F, polypeptide 2	Fatty acid metabolic process	3.16	0.003
UCP3	Uncoupling protein 3 (mitochondrial, proton carrier)	Fatty acid metabolic process, responses to hypoxia and oxidative stress	3.51	1.04×10^{-5}
<i>Down-regulated genes</i>				
AASDH	Aminoacidipate-semialdehyde dehydrogenase	Fatty acid metabolic process	−1.52	0.004
SEMA4D	Sema domain, immunoglobulin domain (Ig), transmembrane domain (TM) and short cytoplasmic domain, (semaphorin) 4D	Immune response	−1.52	0.005
RPS6KA3	Ribosomal protein S6 kinase, 90 kDa, polypeptide 3	Immune response	−1.53	0.003
GCLC	Glutamate–cysteine ligase, catalytic subunit	Response to oxidative stress	−1.55	0.007
ATF2	Activating transcription factor 2	Immune response	−1.59	0.008
PRKDC	Protein kinase, DNA-activated, catalytic polypeptide	DNA repair	−1.60	0.001
PEX13	Peroxisomal biogenesis factor 13	Fatty acid metabolic process	−1.60	1.25×10^{-5}
TTC5	Tetratricopeptide repeat domain 5	DNA repair	−1.62	1.49×10^{-4}
ACAT1	Acetyl-CoA acetyltransferase 1	Fatty acid metabolic process	−1.63	7.06×10^{-4}
SMAD4	SMAD family member 4	Response to hypoxia	−1.64	6.21×10^{-5}
MSH2	mutS homolog 2, colon cancer, nonpolyposis type 1 (<i>Escherichia coli</i>)	DNA repair and immune response	−1.65	0.001
BMI1	BMI1 polycomb ring finger oncogene	Immune response	−1.67	0.002

Table 2 (continued)

Gene symbol	Gene name	Gene Ontology (biological process)	Fold change	Corrected p-value
<i>Down-regulated genes</i>				
SAAL1	Serum amyloid A-like 1	Inflammatory response	−1.67	0.003
MDM2	Mdm2 p53 binding protein homolog (mouse)	Response to hypoxia	−1.67	0.002
CAT	Catalase	Responses to hypoxia and oxidative stress	−1.69	0.002
CAPZA1	Capping protein (actin filament) muscle Z-line, alpha 1	Immune response	−1.70	8.16×10^{-6}
SC4MOL	Sterol-C4-methyl oxidase-like	Fatty acid metabolic process	−1.74	0.003
CRY1	Cryptochrome 1 (photolyase-like)	DNA repair	−1.77	0.006
MAP3K1	Mitogen-activated protein kinase kinase 1	Immune response	−1.79	6.09×10^{-4}
RPS6KA5	Ribosomal protein S6 kinase, 90 kDa, polypeptide 5	Immune response	−1.80	7.34×10^{-4}
FAR1	Fatty acyl CoA reductase 1	Fatty acid metabolic process	−1.82	0.008
QKI	Quaking homolog, KH domain RNA binding (mouse)	Fatty acid metabolic process	−1.82	0.001
IRF8	Interferon regulatory factor 8	Immune response	−1.82	0.009
CREB1	cAMP responsive element binding protein 1	Immune response	−1.82	4.28×10^{-4}
CD164	CD164 molecule, sialomucin	Immune response	−1.85	0.002
STAT3	Signal transducer and activator of transcription 3 (acute-phase response factor)	Inflammatory response	−1.89	2.08×10^{-4}
IGF1R	Insulin-like growth factor 1 receptor	Immune response	−1.92	0.004
GADD45A	Growth arrest and DNA-damage-inducible, alpha	DNA repair	−1.96	0.004
CHUK	Conserved helix-loop-helix ubiquitous kinase	Immune response	−1.99	9.95×10^{-5}
TMED7-TICAM2	TMED7-TICAM2 readthrough	Immune response	−1.99	9.98×10^{-5}
MORF4L2	Mortality factor 4 like 2	DNA repair	−2.01	3.81×10^{-4}
ATF1	Activating transcription factor 1	Immune response	−2.07	7.84×10^{-7}
IL37	Interleukin 37	Immune response	−2.11	0.002
ITPR2	Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor, type 2	Response to hypoxia	−2.17	3.29×10^{-5}
APP	Amyloid beta (A4) precursor protein	Immune response	−2.30	4.12×10^{-5}
ARNT	Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator	Responses to hypoxia and oxidative stress	−2.36	3.37×10^{-5}
ATP1B1	ATPase, Na ⁺ /K ⁺ transporting, beta 1 polypeptide	Response to hypoxia	−2.41	0.001
ATRX	Alpha thalassemia/mental retardation syndrome X-linked	DNA repair	−2.58	9.84×10^{-5}
SUMO1	SMT3 suppressor of mif two 3 homolog 1 (<i>S. cerevisiae</i>)	DNA repair	−3.34	6.96×10^{-9}
CD46	CD46 molecule, complement regulatory protein (variant transcript a)	Immune response	−4.01	5.28×10^{-7}
	CD46 molecule, complement regulatory protein (variant transcript n)		−3.27	1.10×10^{-6}

(2002), who observed reduction in the protein levels of retinal CD55 and CD59 but not in CD46, we observed pronounced down-regulation of CD46 gene. Our results are in accordance with the fact that patients with retinopathy and other late diabetic complications were not included in the present study. The expression of IL37 (IL1F7) in macrophages or epithelial cells was reported to highly suppress the production of pro-inflammatory cytokines, and consistent with that, the levels of these cytokines had increased with the reduction of endogenous IL-1F7 in human blood cells (Nold et al., 2010). Since constitutive IL-1F7 mRNA can be induced in PBMCs and dendritic cells (Pan et al., 2001), the down-regulation of this gene in PBMCs from patients with T2DM is compatible with the higher production of cytokines in diabetic patients.

The down-regulation of CHUK gene can also be associated with inflammatory process in T2DM patients, since this gene encodes a serine kinase component of the I-kappa-B kinase (IKK) complex (Mercurio et al., 1997), which controls the activation of NF-κB, a ubiquitous transcription factor closely related to inflammation (Karin, 1999). Hundal et al. (2002) demonstrated that systemic inhibition of IKK-β improved insulin resistance and glycemia in rodents, and also insulin sensitivity and hyperlipidemia in patients with T2DM. It has been shown that TNF-α-induced IL-6 production, phosphorylation of IKK α/β, and I-kappaB-α degradation can all be inhibited by metformin in human umbilical vein endothelial cells. Metformin improves insulin sensitivity by decreasing endogenous and exogenous insulin requirements

Table 3

Significantly altered BioCarta pathways identified from Efron–Tibshirani's maxmean test in PBMCs from T2DM patients.

	BioCarta pathway (description)	Number of genes	Control vs. T2DM		
			LS permutation p	KS permutation p	Efron–Tibshirani's GSA p
1	h_gsk3Pathway (inactivation of Gsk3 by AKT causes accumulation of b-catenin in alveolar macrophages)	12	0.00073	0.01571	0.035 (+)
2	h_pitx2Pathway (multi-step regulation of transcription by Pitx2)	11	0.00114	0.00149	0.033 (+)
3	h_RacCycDPathway (influence of Ras and Rho proteins on G1 to S transition)	13	0.00118	0.03519	0.009 (+)
4	h_hsp27Pathway (stress induction of HSP regulation)	6	0.00286	0.05917	0.036 (−)
5	h_stressPathway (TNF/stress related signaling)	15	0.00377	0.11274	0.018 (−)
6	h_gleevecPathway (inhibition of cellular proliferation by Gleevec)	15	0.0057	0.03483	0.037 (+)
7	h_il7Pathway (IL-7 signal transduction)	11	0.00613	0.01668	0.013 (+)
8	h_gcrPathway (corticosteroids and cardioprotection)	8	0.00804	0.02649	0.043 (+)
9	h_ceramidePathway (ceramide signaling pathway) ^a	12	0.03868	0.04669	0.022 (+)
10	h_ranklPathway (bone remodeling)	6	0.04423	0.05988	0.031 (+)
11	h_rabPathway (Rab GTPases mark targets in the endocytotic machinery)	8	0.05964	0.48475	0.039 (−)
12	h_akap13Pathway (Rho-selective guanine exchange factor AKAP13 mediates stress fiber formation)	6	0.07716	0.06739	0.008 (+)
13	h_ranbp2Pathway (sumoylation by RanBP2 regulates transcriptional repression)	8	0.09055	0.38893	0.032 (−)

^a Pathway considered for discussion.

Table 4
Significantly altered KEGG pathways identified from Efron–Tibshirani's maxmean test in PBMCs from T2DM patients.

	KEGG pathway (description)	Number of genes	Control vs. T2DM		
			LS permutation <i>p</i>	KS permutation <i>p</i>	Efron–Tibshirani's GSA <i>p</i>
1	hsa00020 (citrate cycle–TCA cycle)	14	0.00308	0.02228	0.012 (–)
2	hsa03022 (basal transcription factors)	16	0.00602	0.01869	0.049 (–)
3	hsa00190 (oxidative phosphorylation)	22	0.00731	0.48705	0.002 (–)
4	hsa03020 (RNA polymerase)	13	0.00954	0.02887	0.019 (+)
5	hsa04920 (adipocytokine signaling pathway) ^a	38	0.04281	0.20791	0.041 (+)
6	hsa04730 (long-term depression)	30	0.08041	0.18395	0.015 (–)
7	hsa04120 (ubiquitin mediated proteolysis)	35	0.08088	0.12501	0.037 (–)
8	hsa00960 (alkaloid biosynthesis II)	7	0.12182	0.37687	0.041 (+)

^a Pathway considered for discussion.

and basal plasma insulin concentrations (Huang et al., 2009). Thus, in the present study, the down-regulation of *CHUK* in PBMCs from patients with T2DM could be due to the anti-inflammatory action of metformin, since 90% of all patients enrolled in the present study were treated with this hypoglycemic agent (Kirpichnikov et al., 2002).

Among the down-regulated DNA repair genes, *SUMO1* was the most repressed. This gene encodes a protein that is a member of the small ubiquitin-like modifier (SUMO) protein family that is responsible for generating proteins resistant to degradation (SOURCE). Moreover, SUMO competes with ubiquitin for the modification of proliferating cell nuclear antigen (PCNA), an essential processivity factor for DNA replication and repair (Stelter and Ulrich, 2003). *ATRX* gene, involved in a wide range of cellular functions, such as DNA recombination and repair and transcription regulation (SOURCE) and *MORF4L2* gene, a transcription factor that either induces the expression of genes necessary to stop division or represses the expression of genes required for cell cycle progression (Bertram et al., 1999), also presented expression levels significantly reduced in PBMCs from patients with T2DM. Hence, in these patients, PBMCs exhibit down-regulation of several DNA repair genes. These results are in agreement with those showing decreased efficiency of DNA repair in patients with T2DM (Blasiak et al., 2004; Pácal et al., 2011).

Additionally, GSA was performed in our study to identify gene sets, based on prior biological knowledge, with 'subtle but coordinated' expression changes that cannot be detected by individual gene analysis (IGA) (Nam and Kim, 2008). GSA has presented many advantages because even weak expression changes in individual genes when gathered into a large gene set can show a significant pattern, considering that functionally related genes often display a coordinated expression to accomplish their roles in the cell (Nam and Kim, 2008). After applying GSA to type 2 diabetes data, Wu and Lin (2009) observed that using prior biological knowledge (gene set enrichment analysis), one can potentially identify pathways of interest, which can minimize some of the problems associated with the analysis of gene expression profiles, allowing for a better understanding of the biological mechanisms underlying phenotypic responses (Wu and Lin, 2009).

GSA results showed that the adipocytokine signaling pathway was up-regulated in PBMCs from T2DM patients (Table 4 and Fig. 3). It is currently known that the adipose tissue secretes a number of factors including FFA and proteins, termed adipocytokines (TNF- α , IL-6, and resistin), that control various metabolic functions (Boden and Shulman, 2002; Pittas et al., 2004). However, the adipocyte dysfunction as a result of obesity is associated with aberrant FFA release, triggering adipose tissue infiltration by macrophages

Fig. 3. Heat maps of the two significant gene sets obtained after performing the gene set analysis included in BrB-ArrayTools (developed by: Richard Simon and BRB-ArrayTools Development Team).

(reviewed in Nikolajczyk et al., 2011) and altered adipocytokines production and signaling (Hummasti and Hotamisligil, 2010). Both adipocytokines secreted by adipocytes and pro-inflammatory cytokines secreted by macrophages residing in adipose tissue have been implicated in the development of insulin resistance. The reason for that is because they can trigger signaling pathways (JNK and NF- κ B) that promote direct inhibition of insulin action by interfering with insulin binding to its receptor (Howard and Flier, 2006; Olefsky and Glass, 2010; reviewed in Nikolajczyk et al., 2011). Thus, the induction of the adipocytokine signaling pathway in T2DM patients enrolled in this study suggests that these patients may still be at risk of maintaining insulin resistance as a result of adipocyte dysfunction, even under treatment with insulin and metformin in order to improve insulin sensitivity. The adipocyte dysfunction is probably due to excess body weight, since most of the patients were overweight or with grade I obesity (mean BMI = 29.7 kg/m²), reinforcing the need for body weight control associated with the treatment.

The excess of FFA release, a marked obesity characteristic, can also be linked to another significant pathway found by GSA in the current work: the ceramide signaling pathway (Table 3 and Fig. 3). Ceramides are a family of lipids previously associated only with structural components of the cell membrane. However, more recently, several studies showed increased ceramide production in response to different stress stimuli: inflammatory mediators, heat, UV radiation, hypoxia, chemotherapeutics, and oxidative stress (Rozenova et al., 2010; Li et al., 2010; Bikman and Summers, 2011). Ceramide levels may also increase in response to high levels of FFA, mostly because adipose tissue is not able to store the FFA excess. As a consequence, FFA are stored in inappropriate tissues, thus increasing bioactive lipids, which ultimately leads to metabolic dysfunction (Holland and Summers, 2008; Summers, 2010). Moreover, ceramide has been associated with induction of apoptosis in different cell types, as a consequence of lipotoxicity. Furthermore, this molecule is related to oxidative stress modulation, probably through the inhibition of the complex III of the electron transport chain in the mitochondria (Gudz et al., 1997; Kolesnick and Kronke, 1998). Although ceramide signaling pathway was up-regulated in T2DM patients, *UCP3* gene was highly up-regulated (fold change = 3.51), probably in an attempt to compensate for the complex III inhibition by other pathways. Matsuoka et al. (2007) performed a large scale proteomic study to identify proteins related to DNA damage responses that were capable of recognizing similar sites to ATM and ATR proteins. More than 700 proteins were found, demonstrating that a specific cellular process can be activated by different pathways. Increased levels of ceramide are also related to insulin resistance, through the inhibition of the Akt/PKB (Samuel and Shulman, 2012; Summers et al., 1998), establishing an important link between obesity and insulin resistance. In our study, most of the patients were overweight, which is compatible with increased FFA profile, indicating that these patients are probably exposed to higher levels of oxidative stress and apoptosis, although we could not find any DNA repair or antioxidant pathway modulated in T2DM patients.

Considering that several patient features may influence gene expression profiles, in the present study, we applied hypergeometric analysis to verify the influence of age, gender (M/F), obesity (BMI), pre/post-menopause age, neuropathy, glycemia, and HbA_{1c} percentage on gene expression profiles (Fig. 1). In this analysis, performed according to Segal et al. (2004), expression data and gene sets (significant pathways by GSA) were compared to find arrays in which gene sub-sets could show significant gene expression changes. A sub-set of genes within a specific set may contribute to its expression signature, and when several gene sets (clusters) show similar signatures, a core module from this cluster is extracted, thus refining the gene composition of each gene set and combining several related gene sets. In this manner, this module more closely comprises genes participating in a specific biological process, and whose expression profiles correspond to a

cluster signature (Segal et al., 2004). Based on this analysis, we did not obtain a module, since it is required at least three patients in the core as the minimum parameter to obtain a module.

Therefore, expression profiles of genes involved in the gene sets (KEGG and BioCarta pathways) investigated in the present study were not affected by patient features (age, gender, obesity, pre/post-menopause age, neuropathy, glycemia, and HbA_{1c} percentage). Unfortunately, it was not possible to evaluate the influence of metformin and/or insulin on gene expression profiles, due to the fact that almost all patients were already subjected to these treatments by occasion of the blood collection, and hence, subgroups (as required for this analysis) could not be obtained.

Some limitations of our study are related to the sample size; only 20 diabetic patients were enrolled due to the difficulty in finding newly diagnosed T2DM and patients without late diabetic complications, which was one of our exclusion criteria. Similarly, it is noteworthy that other studies using microarray technology also have analyzed similar number of samples (Takamura et al., 2007; Palsgaard et al., 2009; Yang et al., 2009; Marselli et al., 2010). Moreover, since the average duration of the disease was 9 years, most of the patients were already receiving treatment with insulin and metformin, and we cannot rule out some effects of these drugs on the expression profiles.

Besides the limitations mentioned above, we showed that PBMCs from T2DM patients presented significant changes in gene expression, exhibiting 1320 differentially expressed genes compared to PBMCs from non-diabetic subjects. Furthermore, our findings showed a great number of genes involved in biological processes implicated in the pathogenesis of T2DM, with genes presenting high fold-change values (up-regulation) associated with fatty acid metabolism and protection against lipid-induced oxidative stress, and genes presenting significant down-regulation being implicated in the suppression of pro-inflammatory cytokines production and DNA repair. Moreover, we identified two significant signaling pathways (adipocytokine and ceramide) possibly up-regulated as a result of obesity, with the former being related to insulin resistance and the latter to oxidative stress and induction of apoptosis. In addition, the expression profiles were not influenced by clinical features of patients. Hence, our study contributed with new perspectives for a better understanding of specific biological processes and signaling pathways that might be involved in T2DM and that might lead to the progression of the disease.

Supplementary data to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.gene.2012.09.090>.

Conflicts of interest

The authors have no conflict of interest.

Acknowledgments

Gene set analysis was performed using BRB-ArrayTools developed by Dr. Richard Simon and BRB-ArrayTools Development Team. This study was supported by the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP, Brazil (Grant numbers 2010/00932-2, 2008/56594-8, 2010/12069-7, and 2010/05622-1), the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brazil), and the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, Brazil).

References

- Balasubramanyam, M., Premanand, C., Mohan, V., 2002. The lymphocyte as a cellular model to study insights into the pathophysiology of diabetes and its complications. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 958, 399–402.
- Belkina, A.C., Denis, G.V., 2010. Obesity genes and insulin resistance. *Curr. Opin. Endocrinol. Diabetes Obes.* 17, 472–477.
- Bertram, M.J., et al., 1999. Identification of a gene that reverses the immortal phenotype of a subset of cells and is a member of a novel family of transcription factor-like genes. *Mol. Cell. Biol.* 19, 1479–1485.

- Bikman, B.T., Summers, S.A., 2011. Ceramides as modulators of cellular and whole-body metabolism. *J. Clin. Invest.* 121, 4222–4230.
- Blasiak, J., et al., 2004. DNA damage and repair in type 2 diabetes mellitus. *Mutat. Res.* 554, 297–304.
- Bloomgarden, Z.T., 1997. American Diabetes Association Annual Meeting, 1997. Type 2 diabetes. *Diabetes Care* 20, 1791–1795.
- Boden, G., Shulman, G.I., 2002. Free fatty acids in obesity and type 2 diabetes: defining their role in the development of insulin resistance and β -cell dysfunction. *Eur. J. Clin. Invest.* 32 (Suppl. 3), 14–23.
- Boeri, D., Maiello, M., Lorenzi, M., 2001. Increased prevalence of microthromboses in retinal capillaries of diabetic individuals. *Diabetes* 50, 1432–1439.
- Brasacchio, D., et al., 2009. Hyperglycemia induces a dynamic cooperativity of histone methylase and demethylase enzymes associated with gene-activating epigenetic marks that coexist on the lysine tail. *Diabetes* 58, 1229–1236.
- Brownlee, M., 2001. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature* 414, 813–820.
- Burke, B., et al., 2003. Hypoxia-induced gene expression in human macrophages: implications for ischemic tissues and hypoxia-regulated gene therapy. *Am. J. Pathol.* 163, 1233–1243.
- Dasu, M.R., Devaraj, S., Park, S., Jialal, I., 2010. Increased toll-like receptor (TLR) activation and TLR ligands in recently diagnosed type 2 diabetic subjects. *Diabetes Care* 33, 861–868.
- Donath, M.Y., Shoelson, S.E., 2011. Type 2 diabetes as an inflammatory disease. *Nat. Rev. Immunol.* 11, 98–107.
- Eisen, M.B., Spellman, P.T., Brown, P.O., Botstein, D., 1998. Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 14863–14868.
- El-Osta, A., et al., 2008. Transient high glucose causes persistent epigenetic changes and altered gene expression during subsequent normoglycemia. *J. Exp. Med.* 205, 2409–2417.
- Gokulakrishnan, K., Mohanavalli, K.T., Monickaraj, F., Mohan, V., Balasubramanyam, M., 2009. Subclinical inflammation/oxidation as revealed by altered gene expression profiles in subjects with impaired glucose tolerance and type 2 diabetes patients. *Mol. Cell. Biochem.* 324, 173–181.
- González, F., Rote, N.S., Minium, J., Kirwan, J.P., 2006. Reactive oxygen species-induced oxidative stress in the development of insulin resistance and hyperandrogenism in polycystic ovary syndrome. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 91, 336–340.
- Grayson, B.L., Wang, L., Aune, T.M., 2011. Peripheral blood gene expression profiles in metabolic syndrome, coronary artery disease and type 2 diabetes. *Genes Immun.* 12, 341–351.
- Gudz, T.I., Tserng, K.Y., Hoppel, C.L., 1997. Direct inhibition of mitochondrial respiratory chain complex III by cell-permeable ceramide. *J. Biol. Chem.* 272, 24154–24158.
- Henriksen, E.J., Diamond-Stanic, M.K., Marchionne, E.M., 2011. Oxidative stress and the etiology of insulin resistance and type 2 diabetes. *Free Radic. Biol. Med.* 51, 993–999.
- Hirosumi, J., et al., 2002. A central role for JNK in obesity and insulin resistance. *Nature* 420, 333–336.
- Holland, W.L., Summers, S.A., 2008. Sphingolipids, insulin resistance, and metabolic disease: new insights from in vivo manipulation of sphingolipid metabolism. *Endocr. Rev.* 29, 381–402.
- Hossain, P., Kavar, B., El Nahas, M., 2007. Obesity and diabetes in the developing world—a growing challenge. *N. Engl. J. Med.* 356, 213–215.
- Howard, J.K., Flier, J.S., 2006. Attenuation of leptin and insulin signaling by SOCS proteins. *Trends Endocrinol. Metab.* 17, 365–371.
- Huang, N.L., Chiang, S.H., Hsueh, C.H., Liang, Y.J., Chen, Y.L., Lai, L.P., 2009. Metformin inhibits TNF- α -induced IkappaB kinase phosphorylation, IkappaB- α degradation and IL-6 production in endothelial cells through PI3K-dependent AMPK phosphorylation. *Int. J. Cardiol.* 134, 169–175.
- Hummasti, S., Hotamisligil, G.S., 2010. Endoplasmic reticulum stress and inflammation in obesity and diabetes. *Circ. Res.* 107, 579–591.
- Hundal, R.S., et al., 2002. Mechanism by which high-dose aspirin improves glucose metabolism in type 2 diabetes. *J. Clin. Invest.* 109, 1321–1326.
- Kabe, Y., Ando, K., Hirao, S., Yoshida, M., Handa, H., 2005. Redox regulation of NF- κ B activation: distinct redox regulation between the cytoplasm and the nucleus. *Antioxid. Redox Signal* 7, 395–403.
- Kahn, S.E., Hull, R.L., Utzschneider, K.M., 2006. Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nature* 444, 840–846.
- Karin, M., 1999. How NF- κ B is activated: the role of the IkappaB kinase (IKK) complex. *Oncogene* 18, 6867–6874.
- Kirpichnikov, D., McFarlane, S.I., Sowers, J.R., 2002. Metformin: an update. *Ann. Intern. Med.* 137, 25–33.
- Kolesnick, R.N., Kronke, M., 1998. Regulation of ceramide production and apoptosis. *Annu. Rev. Physiol.* 60, 643–665.
- Lebrun, P., Van Obberghen, E., 2008. SOCS proteins causing trouble in insulin action. *Acta Physiol. (Oxf)* 192, 29–36.
- Li, X., Becker, K.A., Zhang, Y., 2010. Ceramide in redox signaling and cardiovascular diseases. *Cell. Physiol. Biochem.* 26, 41–48.
- Liew, C.C., Ma, J., Tang, H.C., Zheng, R., Dempsey, A.A., 2006. The peripheral blood transcriptome dynamically reflects system wide biology: a potential diagnostic tool. *J. Lab. Clin. Med.* 147, 126–132.
- Marselli, L., et al., 2010. Gene expression profiles of beta-cell enriched tissue obtained by laser capture microdissection from subjects with type 2 diabetes. *PLoS One* 5, e11499.
- Matsuoka, S., et al., 2007. ATM and ATR substrate analysis reveals extensive protein networks responsive to DNA damage. *Science* 316, 1160–1166.
- Mercurio, F., et al., 1997. IKK-1 and IKK-2: cytokine-activated IkappaB kinases essential for NF- κ B activation. *Science* 278, 860–866.
- Mohan, V., Deepa, R., Velmurugan, K., Premalatha, G., 2005. Association of C-reactive protein with body fat, diabetes and coronary artery disease in Asian Indians: the Chennai Urban Rural Epidemiology Study (CURES-6). *Diabet. Med.* 22, 863–870.
- Nam, D., Kim, S.Y., 2008. Gene-set approach for expression pattern analysis. *Brief Bioinform.* 9, 189–197.
- Nikolajczyk, B.S., Jagannathan-Bogdan, M., Shin, H., Gyrurko, R., 2011. State of the union between metabolism and the immune system in type 2 diabetes. *Genes Immun.* 12, 239–250.
- Nold, M.F., Nold-Petry, C.A., Zepp, J.A., Palmer, B.E., Bufler, P., Dinarello, C.A., 2010. IL-37 is a fundamental inhibitor of innate immunity. *Nat. Immunol.* 11, 1014–1022.
- Olefsky, J.M., Glass, C.K., 2010. Macrophages, inflammation, and insulin resistance. *Annu. Rev. Physiol.* 72, 219–246.
- Pácal, L., et al., 2011. Parameters of oxidative stress, DNA damage and DNA repair in type 1 and type 2 diabetes mellitus. *Arch. Physiol. Biochem.* 117, 222–230.
- Palsgaard, J., et al., 2009. Gene expression in skeletal muscle biopsies from people with type 2 diabetes and relatives: differential regulation of insulin signaling pathways. *PLoS One* 4, e6575.
- Pan, G., et al., 2001. IL-1H, an interleukin 1-related protein that binds IL-18 receptor/IL-1Rrp. *Cytokine* 13, 1–7.
- Pan, H.Z., Chang, D., Feng, L.G., Xu, F.J., Kuang, H.Y., Lu, M.J., 2007. Oxidative damage to DNA and its relationship with diabetic complications. *Biomed. Environ. Sci.* 20, 160–163.
- Pickup, J.C., Mattock, M.B., Chusney, G.D., Burt, D., 1997. NIDDM as a disease of the innate immune system: association of acute-phase reactants and interleukin-6 with metabolic syndrome X. *Diabetologia* 40, 1286–1292.
- Pittas, A.G., Joseph, N.A., Greenberg, A.S., 2004. Adipocytokines and insulin resistance. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 89, 447–452.
- Rozenova, K.A., Deevska, G.M., Karakashian, A.A., Nikolova-Karakashian, M.N., 2010. Studies on the role of acid sphingomyelinase and ceramide in the regulation of tumor necrosis factor α (TNF α)-converting enzyme activity and TNF α secretion in macrophages. *J. Biol. Chem.* 285, 21103–21113.
- Saltiel, A.R., 2001. New perspectives into the molecular pathogenesis and treatment of type 2 diabetes. *Cell* 104, 517–529.
- Samuel, V.T., Shulman, G.I., 2012. Mechanisms for insulin resistance: common threads and missing links. *Cell* 148, 852–871.
- Sancar, A., Lindsey-Boltz, L.A., Unsal-Kacmaz, K., Linn, S., 2004. Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. *Annu. Rev. Biochem.* 73, 39–85.
- Schrauwen, P., Hesselink, M.K., 2004. Oxidative capacity, lipotoxicity, and mitochondrial damage in type 2 diabetes. *Diabetes* 53, 1412–1417.
- Schrauwen, P., et al., 2011. Uncoupling protein 3 content is decreased in skeletal muscle of patients with type 2 diabetes. *Diabetes* 50, 2870–2873.
- Segal, E., Friedman, N., Koller, D., Regev, A., 2004. A module map showing conditional activity of expression modules in cancer. *Nat. Genet.* 36, 1090–1098.
- SOURCE, a. source.stanford.edu/ Access August 25, 2011.
- Stelter, P., Ulrich, H.D., 2003. Control of spontaneous and damage-induced mutagenesis by SUMO and ubiquitin conjugation. *Nature* 425, 188–191.
- Stumvoll, M., Goldstein, B.J., van Haften, T.W., 2005. Type 2 diabetes: principles of pathogenesis and therapy. *Lancet* 365, 1333–1346.
- Summers, S.A., 2010. Sphingolipids and insulin resistance: the five Ws. *Curr. Opin. Lipidol.* 21, 128–135.
- Summers, S.A., Garza, L.A., Zhou, H., Birnbaum, M.J., 1998. Regulation of insulin-stimulated glucose transporter GLUT4 translocation and Akt kinase activity by ceramide. *Mol. Cell. Biol.* 18, 5457–5464.
- Takamura, T., et al., 2007. Gene expression profiles in peripheral blood mononuclear cells reflect the pathophysiology of type 2 diabetes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 361, 379–384.
- Tsiotra, P.C., et al., 2007. Visfatin, TNF- α and IL-6 mRNA expression is increased in mononuclear cells from type 2 diabetic women. *Horm. Metab. Res.* 39, 758–763.
- World Health Organization (WHO), 2011. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/en/> Access July 22, 2011.
- Wu, M.C., Lin, X., 2009. Prior biological knowledge-based approaches for the analysis of genome-wide expression profiles using gene sets and pathways. *Stat. Methods Med. Res.* 18, 577–593.
- Yang, Y.L., et al., 2009. Gene expression profile of human skeletal muscle and adipose tissue of Chinese Han patients with type 2 diabetes mellitus. *Biomed. Environ. Sci.* 22, 359–368.
- Zhang, J., Gerhardinger, C., Lorenzi, M., 2002. Early complement activation and decreased levels of glycosylphosphatidylinositol-anchored complement inhibitors in human and experimental diabetic retinopathy. *Diabetes* 51, 3499–3504.