UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Farmácia
Área de Análises Clínicas

**Caracterização de genes e proteínas plasmáticas relacionadas ao
diabetes melito do tipo 2 em indivíduos tratados com pioglitazona**

Milano Felipe dos Santos Ferreira Marques

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientador:
Prof. Tit. Dr. Mario Hiroyuki Hirata

São Paulo
2008

Milano Felipe dos Santos Ferreira Marques

Caracterização de genes e proteínas plasmáticas relacionadas ao diabetes melito do tipo 2 em indivíduos tratados com pioglitazona

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Prof. Dr. Mario Hiroyuki Hirata
Orientador/Presidente

Prof. Dr. Simão Augusto Lottenberg
1º. examinador

Prof. Dr. Marcelo Chiara Bertolami
2º. examinador

São Paulo, 12 de setembro de 2008.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Relatório de Defesa

Relatório de defesa pública de Dissertação do(a) Senhor(a) Milano Felipe dos Santos Ferreira Marques no Programa: Farmácia (Análises Clínicas), do(a) Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.

Aos 12 dias do mês de setembro de 2008, no(a) Auditório Bloco 13 A realizou-se a Defesa da Dissertação do(a) Senhor(a) Milano Felipe dos Santos Ferreira Marques, apresentada para a obtenção do título de Mestre em Farmácia - Área: Análises Clínicas, intitulada:

"Caracterização de genes e proteínas plasmáticas relacionadas ao diabetes melito do tipo 2 em indivíduos tratados com pioglitazona"

Após declarada aberta a sessão, o(a) Sr(a) Presidente passa a palavra aos examinadores para as devidas arguições que se desenvolvem nos termos regimentais. Em seguida, a Comissão Julgadora proclama o resultado:

Nome dos Participantes da Banca	Vínculo do Docente	Sigla da Unidade	Resultado
Mario Hiroyuki Hirata	Presidente	FCF - USP	<i>aprovado</i>
Marcelo Chiara Bertolami	Titular	Externo	<i>APROVADO</i>
Simão Augusto Lottenberg	Titular	Externo	<i>APROVADO</i>
Resultado Final: <i>APROVADO POR UNANIMIDADE</i>			
Parecer da Comissão Julgadora *			

Comentários da Defesa (opcional)

Eu, Ana Maria Dias Dantas *Ana Maria Dias Dantas*, Secretária, lavrei a presente ata, que assino juntamente com os(as) Senhores(as) São Paulo, aos 12 dias do mês de setembro de 2008.

Marcelo Chiara Bertolami
Marcelo Chiara Bertolami

Simão Augusto Lottenberg
Simão Augusto Lottenberg

Mario Hiroyuki Hirata
Mario Hiroyuki Hirata
Orientador(a)

* Obs: Se o candidato for reprovado por algum dos membros, o preenchimento do parecer é obrigatório.
Nos termos do artigo 110, do RG-USP, encaminhe-se o presente relatório à CPG, para homologação.

Impresso em: 03/09/2008

DEDICATÒRIA

*As pessoas mais importantes para mim,
aos meus pais, Mário e Lúcia, aos meus irmãos, Murillo e Mário Jr., e aos
meus avós, Jonas e Cicera. E a DEUS. Obrigado por tê-los em minha vida.*

MENSAGEM

Há Momentos

Há momentos na vida em que sentimos tanto
a falta de alguém que o que mais queremos
é tirar esta pessoa de nossos sonhos
e abraçá-la.

Sonhe com aquilo que você quiser.
Seja o que você quer ser,
porque você possui apenas uma vida
e nela só se tem uma chance
de fazer aquilo que se quer.

Tenha felicidade bastante para fazê-la doce.
Dificuldades para fazê-la forte.
Tristeza para fazê-la humana.
E esperança suficiente para fazê-la feliz.

As pessoas mais felizes
não têm as melhores coisas.
Elas sabem fazer o melhor
das oportunidades que aparecem
em seus caminhos.

A felicidade aparece para aqueles que choram.
Para aqueles que se machucam.
Para aqueles que buscam e tentam sempre.
E para aqueles que reconhecem
a importância das pessoas que passam por suas vidas.

O futuro mais brilhante
é baseado num passado intensamente vivido.
Você só terá sucesso na vida
quando perdoar os erros
e as decepções do passado.

A vida é curta, mas as emoções que podemos deixar
duram uma eternidade.
A vida não é de se brincar
porque um belo dia se morre.

(Clarice Lispector)

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Titular Mario Hiroyuki Hirata, meu orientador, por ter me aceitado como seu aluno, responsável pelo meu primeiro contato real na pesquisa científica, obrigado pelo voto de confiança, pela oportunidade, paciência, orientação e pela imensa dedicação e segurança dada a mim e ao restante dos alunos. Serei eternamente grato pelo contato científico que tive, pela excelente estrutura do laboratório e as diferentes linhas de pesquisa que convivi no meu estágio e durante o mestrado. Aprendi muito com você, nesses dois anos e meio. Tudo isso será revertido para meu futuro. Nunca lhe disse pessoalmente, mas em palavras eu me manifesto, peço a você, sinceras desculpas por algo que tenha feito ou deixado de fazer. Obrigado professor Mario.

À Profa. Associada Rosario Dominguez Crespo Hirata, que sempre me ajudou em tudo que foi necessário, me ensinando a ser organizado, disciplinado e na resolução dos problemas, obrigado pelo seu olhar crítico e construtivo.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas de São Paulo, em nome da sua Diretora, Profa. Titular Terezinha de Jesus Andreoli Pinto.

Ao Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, em nome do seu chefe, Profa. Titular Ana Campa.

À Fundação de Amparo e Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo auxílio financeiro concedido, que resultou na realização do projeto.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela bolsa de mestrado, concedida no período de setembro de 2006 a agosto de 2008.

Aos professores e aos funcionários do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.

Aos médicos e funcionários do Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia de São Paulo, em especial a Dra. Maria Isabel Del Mônico.

Aos pacientes, que contribuíram de maneira anônima para este estudo.

Aos meus amigos e colegas do Laboratório de Biologia Molecular aplicada ao Diagnóstico do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, de maneira especial a duas pessoas, a Silvia, uma parceria incrível e completa, que sentirei muita falta no futuro, que resultou em um período de pós-graduação mais gratificante e alegre, e a Alice, que tanto me ajudou, obrigado pela enorme paciência, orientação, dedicação e pela excelente didática.

RESUMO

MARQUES, Milano Felipe dos Santos Ferreira. **Caracterização de genes e proteínas plasmáticas relacionadas ao diabetes melito do tipo 2 em indivíduos tratados com pioglitazona.** 2008. 124f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêutica da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

O diabetes melito é um grupo de doenças metabólicas caracterizadas por hiperglicemia, resultado de deficiências na secreção de insulina, em sua ação ou ambos. A pioglitazona é um hipoglicemiante oral, da classe das tiazolidinedionas, que atuam pela ligação aos receptores nucleares *PPAR γ* melhorando o estado de resistência a insulina. Acredita-se que a pioglitazona também restauram a capacidade da célula beta pancreática de secretar insulina, cuja atividade é regulada pelos canais de potássio dependente de ATP (K_{ATP}) e suas subunidades *SUR1* e *KIR6.2*. Este estudo teve como objetivo iniciar um estudo farmacogenômico da pioglitazona em indivíduos diabéticos tipo 2 e na expressão dos genes *PPAR γ* , *PPAR γ 2*, *SUR1* e *KIR6.2* no sangue periférico e no tecido adiposo e associá-los com os polimorfismo Pro12Ala e C161T do gene *PPAR γ* . Foram selecionados 36 pacientes diabéticos do tipo 2 e 16 pacientes normoglicêmicos, no Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia. Os indivíduos diabéticos foram tratados com pioglitazona (15, 30 e 45 mg/ dia/ via oral) por 16 semanas. Foram colhidas amostras de tecido adiposo por biópsia e de sangue, antes e após o tratamento para determinação de exames laboratoriais, extração de DNA genômico e de RNA total. Os polimorfismos foram detectados pela técnica de PCR-RFLP e a expressão de mRNA foi quantificada e avaliada por RT-PCR em tempo real. Após tratamento com pioglitazona, observou-se no sangue periférico aumento de expressão de mRNA do *PPAR γ* , *PPAR γ 2* e *KIR6.2*, e diminuição da expressão de *SUR1*. Dados de análises no sangue periférico, demonstraram que variação da expressão de mRNA do *PPAR γ* foi inversamente correlacionada com as variações de insulina, Homa-IR, Homa-Beta e positivamente com Colesterol Total. Em relação ao gene *PPAR γ 2*, foi inversamente correlacionada com colesterol total. Variação da expressão de *SUR1* foi inversamente correlacionada com Hb1Ac, Homa-IR, Homa-Beta e positivamente com insulina. Não foram detectadas diferenças entre a expressão de mRNA de *KIR6.2* e parâmetros bioquímicos em resposta às variações pioglitazona. Não houve diferença da resposta terapêutica e presença dos polimorfismos Pro12Ala e C161T. Após o tratamento, no tecido adiposo, a expressão de mRNA de *PPAR γ* aumentou. Não foram observadas diferenças na expressão dos genes *PPAR γ 2*, *SUR1* e *KIR6.2*. Em leucócitos totais de sangue periférico, pioglitazona demonstrou regular a expressão dos genes *PPAR γ* e *PPAR γ 2*, e também atuando sobre as subunidades *SUR1* e *KIR6.2*, possivelmente restaurando a função secretora das células beta. No tecido adiposo, o tratamento confirma a atuação da pioglitazona sobre *PPAR γ* , melhorando o estado de resistência a insulina.

Palavras-chave: PPARgamma, Canal de Potássio dependente de ATP. Diabetes Melito, Pioglitazona, Expressão gênica.

ABSTRACT

MARQUES, Milano Felipe dos Santos Ferreira. **Characterization of genes and serum proteins related to type 2 diabetes mellitus in patients treated with pioglitazone.** 2008. 124f. Dissertation (Masters Degree) – Faculdade de Ciências Farmacêutica da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

The diabetes mellitus is a group of metabolic diseases characterized by hyperglycemia, the result from insulin secretion or action deficiency, or both. Pioglitazone is an oral hypoglycemic drug, included in the class of thiazolidinediones, which work by binding to nuclear receptors PPAR γ nuclear what improve the state of resistance to insulin. Pioglitazone may also restore the ability of the pancreatic beta cell to secrete insulin, process which is regulated thought ATP dependent potassium channels (K_{ATP}) and its subunits *SUR1* and *KIR6.2*. The aim of our study was to begin a pharmacogenomic study of pioglitazone in type 2 diabetes patients by the expression of *PPAR γ* , *PPAR γ 2*, *SUR1* and *KIR6.2* genes in peripheral blood leukocytes and fatty tissue and its association with the *PPAR γ* Pro12Ala and C161T polymorphisms. 36 type 2 diabetes and 16 *normoglycemic* patients were selected at the Dante Pazzanese Institute of Cardiology. The diabetic ones were treated with pioglitazone (15, 30 and 45 mg/ daily /orally) for 16 weeks. Samples of adipose – obtained through biopsy - and blood were collected before and after treatment to aim to laboratory experiments, DNA extraction and total RNA extraction. The polymorphisms were detected by the PCR-RFLP technique while the mRNA expression was quantified and evaluated by Real Time RT-PCR. After pioglitazone treatment, the expression of the *PPAR γ* , *PPAR γ 2* and *KIR6.2* genes increased, while *SUR1* decreased, all of them quantified in peripheral blood. Peripheral blood data has demonstrated that the variation of expression of *PPAR γ* mRNA is inversely correlated with insulin concentrations, Homa-IR, Homa-Beta and positively correlated with total cholesterol concentrations. Differently, *PPAR γ 2* gene expression was inversely correlated with total cholesterol blood concentrations. Variations in *SUR1* mRNA expression were inversely correlated with Hb1Ac, Homa-IR, Homa-Beta and positively correlated with insulin. No differences were found between the *KIR6.2* expression and biochemical parameters due to pioglitazone treatment. There was no difference in response to the treatment response and no Pro12Ala and C161T polymorphisms were noticed. After the treatment, the expression of *PPAR γ* gene increased in fatty tissue. No data showed differences in the expression of genes *PPAR γ 2*, *SUR1* and *KIR6.2*. Pioglitazone regulates the expression of genes *PPAR γ* and *PPAR γ 2*, and also acts on the *SUR1* and *KIR6.2* subunits in total peripheral blood leukocyte likely restoring the function of secreting beta pancreatic cells. In adipose, the treatment reassures the functions of pioglitazone on *PPAR γ* , improving the state of insulin resistance.

Keywords: PPARgamma, ATP dependent potassium channels, diabetes mellitus, Pioglitazone, Gene expression.

LISTA DE ABREVIATURAS

AGL	Ácido Graxo Livre
ATP	Adenosina Trifosfato
cDNA	Ácido Desoxi-ribonucléico Complementar
CT	Colesterol Total
Ct	Cycle Treshold
CTX	Serum C - Terminal Telo peptide
DM1	Diabete melito tipo 1
DM2	Diabete melito tipo 2
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
DP	Desvio Padrão
EDTA	Ácido Etilenodiaminotetracético
FDA	Food and Drug Administration
GAPD	Gliceraldeído Desidrogenase
HbA1c	Hemoglobina Glicada
HDL	Lipoproteína de Alta Densidade
HDL-c	Colesterol da HDL
HOMA-beta	Homeostasis Model Assessment – função secretora da célula beta
HOMA-IR	Homeostasis Model Assessement – resistência à insulina
HWE	Equilíbrio de Hardy-Weinberg
IMC	Índice de Massa Corpórea
K _{ATP}	Canais de Potássio Dependentes de ATP
KIR6.2	Potassium inwardly-rectifying channel
LDL	Lipoproteína de Baixa Densidade
LDL-c	Colesterol de LDL
LPL	Lípase Lipoprotéica
LTSP	Leucócitos Totais do Sangue Periférico
MODY	Maturity Onset Diabetes of the Young
mRNA	RNA Mensageiro
PCR	Reação em Cadeia pela Polimerase
PPAR γ	Receptor Ativado por Proliferadores de Peroxissoma Gama
PPREs	Elementos Responsivos Proliferadores de Peroxisoma
RFLP	Polimorfismo de Tamanho de Fragmentos de Restrição
RNA	Ácido Ribonucléico
RT-PCR	Transcrição Reversa Seguida de PCR
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio

SUR1	Receptor de Sulfoniluréia 1
T4L	Tetraiodotironina Livre
TBE	Tampão Tris Borato EDTA
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral Alfa
TSH	Hormônio Tireoestimulante
TZDs	Tiazolidinedionas
UNG	Uracil - N – Glicosilase
VLDL	Lipoproteína de Muito Baixa Densidade
VLDL-c	Colesterol da VLDL
Δ Ct	Delta Ct
$\Delta\Delta$ Ct	Delta Delta Ct

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. OBJETIVOS	25
2.1 Geral	25
2.2 Específicos	25
3. CASUISTICA, MATERIAL E MÉTODOS	26
3.1 Casuística e Protocolo Terapêutico	26
3.2 Amostras Biológicas	27
3.3 Determinação dos Parâmetros Bioquímicos	28
3.3.1 Cálculo dos Índices Homa-IR e Homa-Beta	29
3.4 Extração e Análise do DNA Genômico	29
3.5 Genotipagem do <i>PPARγ</i> pela PCR-RFLP.....	30
3.5.1 Ensaio de RFLP	32
3.6 Extração e Análise do RNA Total.....	33
3.6.1 Extração de RNA Total de Leucócitos Totais de Sangue Periférico	33
3.6.2 Extração de RNA Total de Tecido Adiposo	34
3.6.3 Análise do RNA Total	34
3.7 Análise da Expressão de mRNA pela RT-PCR em Tempo Real	35
3.8 Análise Estatística	39
4. RESULTADOS	40
4.1 Resultados dos grupos DM2 e controle.....	40
4.1.1 Dados dos Pacientes	40
4.1.2 Análise dos polimorfismos Pro12Ala e C161T	44
4.2 Resultados de Expressão Gênica em LTSP.....	52
4.3.1 Resultados de efeitos do polimorfismo Pro12Ala 34C>G sobre expressão gênica do <i>PPARγ</i> e <i>PPARγ2</i> em LTSP	74
4.3.2 Resultados de efeitos do polimorfismo C161T sobre expressão gênica do <i>PPARγ</i> e <i>PPARγ2</i> em LTSP.....	75
4.4 Resultados da expressão gênica em Tecido Adiposo	77
4.5.1 Resultados de efeitos do polimorfismo Pro12Ala 34C>G sobre expressão gênica do <i>PPARγ</i> e <i>PPARγ2</i> em Tecido Adiposo	88
4.5.2 Resultados de efeitos do polimorfismo C161T sobre expressão gênica do <i>PPARγ</i> e <i>PPARγ2</i> em Tecido Adiposo	90
5. DISCUSSÃO	92
6. CONCLUSÕES	102
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	103
8. ANEXOS	110

1 INTRODUÇÃO

O diabetes melito (DM) é a mais comum das doenças metabólicas, sua prevalência aumenta em ritmo alarmante, projeções indicam que 366 milhões de indivíduos serão afetados pela doença em 2030 (WILDING, 2007). Por isso essa enfermidade vem se tornando um dos maiores problemas de saúde pública do século 21. De acordo com a Organização Mundial da Saúde (WHO, 2006), o crescimento dos casos de diabetes está relacionado com alterações no estilo de vida e no perfil sócio-econômico destes indivíduos, diminuindo a expectativa de vida desses pacientes em 15 anos.

Cerca de dois terços dos indivíduos com diabetes vivem nos países em desenvolvimento, onde a epidemia tem maior intensidade, com crescente proporção de pessoas afetadas em grupos etários mais jovens (WILD *et al.*, 2004; MEETOO *et al.*, 2007).

Na população brasileira entre 30 e 69 anos, a prevalência de DM acomete cerca de 7% e chega a atingir cifras próximas a 20% na população acima dos 70 anos. Estima-se que 50% dessas pessoas ainda não foram diagnosticadas e 25% da população diabética não fazem nenhum tipo de tratamento (PAIVA *et al.*, 2006). O DM não é uma única doença, mas um grupo heterogêneo de distúrbios metabólicos que apresentam em comum a hiperglicemia. Essa hiperglicemia é o resultado de defeitos na ação da insulina, em sua secreção ou em ambos (SPELLMAN, 2008).

A classificação atual do DM é baseada na etiologia e não no tipo de tratamento. A classificação proposta pela Organização Mundial da Saúde (OMS) e pela Associação Americana de Diabetes (ADA) inclui quatro classes clínicas: DM

tipo 1 (DM1), DM tipo 2 (DM2), outros tipos específicos de DM (doenças do pâncreas exócrinos, *Maturity Onset Diabetes of the Young* MODY e endocrinopatias) e diabetes gestacional (SKELLY, 2006).

A obesidade e o ganho de peso estão entre os principais fatores de risco para o DM2, estimando-se que cada quilograma de aumento de peso associa-se a uma elevação de 9% na prevalência de DM. Mais de 80% dos pacientes diabéticos do tipo 2 apresentam obesidade ou excesso de peso, agravando a sua situação metabólica, predispondo a dislipidemias e hipertensão arterial (PILZ & MÄRZ, 2008).

O DM2 caracteriza-se por hiperglicemia crônica, freqüentemente acompanhada de dislipidemia, hipertensão arterial e disfunção endotelial. Os sintomas decorrentes de hiperglicemia acentuada incluem perda de peso, poliúria, polidipsia e infecções. Mesmo em indivíduos assintomáticos pode haver hiperglicemia discreta, porém em grau suficiente para causar alterações funcionais ou morfológicas por um longo período antes que o diagnóstico seja estabelecido (SKELLY, 2006; TIBALDI, 2008).

O DM2 é uma desordem metabólica complexa, multifatorial e poligênica, apesar de pouco se conhecer sobre os genes envolvidos. A síndrome envolvida no DM2, no entanto, é bem estabelecida; há um característico desarranjo metabólico em três tecidos alvos: tecidos periféricos, ilhotas pancreáticas e o tecido hepático. No DM2 os tecidos periféricos, como o músculo esquelético e o tecido adiposo são resistentes à ação da insulina, porém nas ilhotas pancreáticas, a secreção de insulina pelas células beta é insuficiente para compensar o estado de resistência, gerando um estado relativo e/ou absoluto de insuficiência de insulina (HICKMAN &

MACDONALD, 2007). No tecido hepático ocorre aumento da produção de glicose, cuja liberação para a circulação é causa significativa de hiperglicemia de jejum.

A resistência à ação da insulina aparece primariamente associada a uma série de fatores de risco metabólicos reconhecidos como Síndrome Metabólica (aumento de triacilglicerol, aumento de glicemia e diminuição de HDL colesterol) (BATSIS *et al.*, 2007). Na resistência insulínica evidenciam-se três fases: as taxas de produção hepática de glicose aumentam, gerando hiperglicemia de jejum; a resistência insulínica torna-se mais intensa, o que pode ser associada a carga genética e/ou condições adquiridas como obesidade, sedentarismo e envelhecimento; e por último, diminuição da função das células β pancreáticas e o declínio da habilidade secretora de insulina (SPELLMAN, 2007).

Estudos recentes comprovam que uma das vias de deterioração da função das células beta ocorre por exposição crônica a elevados níveis de ácidos graxos livres (AGL), associados à obesidade e aos estados de resistência insulínica (PRATO *et al.*, 2007). Análogo ao conceito de glicotoxicidade, a lipotoxicidade está associada ao acúmulo de gordura causando disfunção da secreção pancreática de insulina e a diminuição da função das células beta. De acordo com esta hipótese, a exposição crônica aos AGL em estados em que há deficiência de ação de leptina (responsável por regular a oxidação no tecido gorduroso), levaria a ativação de vias mais tóxicas, causando aumento do estresse oxidativo e ativação de vias inflamatórias ocasionando apoptose das células β pancreáticas (MARCHETTI *et al.*, 2008).

A resistência insulínica relacionada à função das células beta também pode ser devida a anormalidades genéticas pré-programadas na função das células beta pancreáticas (MARCHETTI *et al.*, 2008). Em sua função normal a célula beta

pancreática secreta insulina em resposta à glicose; os mecanismos envolvidos incluem: 1) transporte da glicose para o interior as células pelo transportador GLUT2; 2) metabolização intracelular da glicose via glicólise e/ou ciclo de Krebs gerando ATP; 3) aumento intracelular da razão ATP/ADP; 4) fechamento dos canais de potássio dependentes de ATP (K_{ATP}); 5) aumento de K^+ intracelular; 6) despolarização de membrana da célula beta; 7) abertura do canal de Ca^{2+} voltagem dependente; 8) influxo de Ca^{2+} e aumento de sua concentração citoplasmática e 9) exocitose dos grânulos secretores contendo insulina. Demonstrando que o K_{ATP} é fundamental na liberação de insulina (ASHCROFT, 2006; SMITH, 2007). (**Figura 1**).

Figura 1. Esquema representativo do estímulo da secreção de insulina, pelas células beta pancreática (adaptado de SMITH *et al.*, 2007).

Os canais de potássio são proteínas de membrana com permeabilidade seletiva ao potássio. Eles representam os maiores e mais diversos grupos de qualquer família de canais iônicos identificados. São formados por combinações tetraméricas de subunidades individuais, cada uma delas com dois domínios transmembrânicos com segmentos citoplasmáticos, entre os quais se encontra uma região formadora de poros e uma região regulatória. O receptor de sulfoniluréia 1 (SUR1), membro da super família *ATP-binding cassette* (ABC) encontra-se na região regulatória e foi assim denominado por ser o sítio de ligação das sulfoniluréias, classe de fármacos utilizada no tratamento de DM2. O canal iônico KIR6.2, denominado de *Potassium inwardly-rectifying channel* está localizado na região formadora de poros (BRYAN *et al.*, 2004; GRAIG, 2008).

Acredita-se que o SUR1 seja o sensor da relação ATP/ADP. O K_{ATP} (canal de potássio dependente de ATP) está presente em vários outros tecidos; incluindo tecido cardíaco, adiposo, vascular, cerebral e músculo liso. Existem várias combinações KIR 6.X / SUR com diferenças bioquímicas e farmacológicas em vários tecidos. Nas células β , a combinação é Kir6.2 / SUR 1 (SMITH *et al.*, 2007).

Os genes *KIR 6.2* e *SUR1* estão localizados conjuntamente no cromossomo 11 (11p 15.1) e estão sob regulação de um promotor comum, regulado por um único fator de transcrição, isso permite que as expressões de ambos os genes estejam intrinsecamente associadas. Tem sido demonstrado que a regulação da expressão de K_{ATP} pode estar associada à variação da concentração plasmática de glicose (SMITH *et al.*, 2007). Uma redução aguda de glicemia conduz a um rápido aumento na expressão de *KIR 6.2* e *SUR1*, por meio do aumento da taxa de tradução. Nas células beta pancreáticas, em contrapartida, a exposição ao longo prazo a elevadas

concentrações de glicemia está relacionada a uma diminuição da atividade transcricional. Estas alterações em sua expressão favorecem uma perda parcial da função das células β pancreáticas, associados à paciente diabético tipo 2 (SMITH *et al.*, 2007).

Shi e colaboradores (1999) demonstraram expressão de *SUR1* no tecido adiposo humano, sugerindo que este contribui para a susceptibilidade genética à obesidade, modulando o armazenamento de energia.

A tradicional concepção que o tecido adiposo é somente um local de armazenamento de energia, não é mais válido, pois Sitieri (1987) identificou em seu estudo regiões de síntese de hormônios esteróides e de adipocinas (adiponectina e resistina), que são fatores endócrinos da obesidade. Subseqüentemente identificou e caracterizou a leptina, no mesmo ano. Assim, constatou-se que o tecido adiposo é na verdade uma glândula endócrina, expressando e secretando uma variedade de peptídeos bioativos, entre eles o fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α), responsável pela regulação da adiponectina (KERSHAW & FLIER, 2004).

Estas adipocinas, em sua grande maioria, estão relacionadas, diretamente aos processos que contribuem para o DM2, tais como: resistência à insulina, aterosclerose, hipertensão arterial e dislipidemias, representando uma associação entre adiposidade, síndrome metabólica e doenças cardiovasculares (DYCK *et al.*, 2006).

A adiponectina, conhecida como Acrp30 (*adipocyte complement related protein*), ou adipQ que é uma proteína expressa exclusivamente nos adipócitos diferenciados. Ao contrário dos outros fatores secretados pelo tecido adiposo, ela age como fator protetor para doenças cardiovasculares e aumenta a sensibilidade à insulina (STEFFENS & MARCH, 2008). Suas ações antiinflamatórias e

antiaterogênicas são causadas pela diminuição da expressão da molécula de adesão-1 (via redução da expressão de $\text{TNF-}\alpha$ e atividade da resistina), diminuição da quimiotaxia ao macrófago para formação de células gordurosas e inibição da sinalização inflamatória no tecido endotelial. O gene da adiponectina é localizado no cromossomo 3q27, composto por três exons, sendo que essa região foi recentemente mapeada e considerada susceptível a DM2 (ZACHAROVA *et al.*, 2006; BEHRE, 2007).

A resistina pertence a uma família de proteínas ricas em cisteínas, a qual tem sido associada a processos inflamatórios. Estudos demonstraram a participação da resistina, na piora do quadro de resistência à insulina e DM2 em roedores, mas em seres humanos ainda é discutível. Portanto, essa adipocina, em seres humanos, tem sido associada a características de uma citocina pró-inflamatória e poderia desencadear doenças inflamatórias, associadas ou não a resistência à insulina, podendo estar envolvidas na aterosclerose, portanto relevante em humanos. Esses efeitos pró-inflamatórios, no entanto, são baseados em um pequeno número de estudos, assim, mais pesquisas são necessárias para caracterizar plenamente a função da resistina em roedores e seres humanos (AHIMA & LAZAR, 2008; TILG & MOSCHEN, 2006).

A leptina atua como um adipostato, atuando sobre o hipotálamo regulando a saciedade, considerada uma molécula não glicosilada de 16 KDa, que foi considerada hormônio antiobesidade por sua função fisiológica primária: prevenir a obesidade e regular a ingestão de alimentos e o balanço energético (YANG & BAROUCH, 2007). Acúmulo excessivo de energia leva a resistência à insulina e estudos indicam que a leptina, cuja concentração sérica normalmente aparece

elevada em obesos, é um agente inibidor do efeito lipogênico da insulina (MATARESE & LA CAVA, 2007).

O tecido adiposo é um órgão heterogêneo que inclui gordura subcutânea, intra-abdominal e depósitos intratorácicos. A função endócrina e armazenamento lipídico dependem do tipo de gordura e a morfologia do adipócito, sendo os de origem omental e mesentérica os principais componentes da gordura visceral, possuem maior ação endócrina, em relação aos adipócitos subcutâneos (SHARMA & STAELS, 2007).

Reduzir o impacto do DM2 significa antes de tudo, minimizar a incidência da doença, antecipando-se ao seu aparecimento com medidas preventivas, sobretudo em indivíduos de alto risco (ROGLIC *et al.*, 2005). Assim, o tratamento do DM2 deve ser abrangente e incluir mudanças no estilo de vida que se caracterizam pela suspensão do fumo, prática de atividade física, mudança de hábitos alimentares e caso necessário, o uso de medicamentos (ZAGURY & TAMBASCIA, 2006). Dentre os medicamentos orais disponíveis estão a metformina, as tiazolidinedionas, sulfoniluréias, acarbose e derivados do ácido benzóico.

A tiazolidinediona (TZD) representa uma nova classe de agentes sensibilizadores de insulina, que provou ser eficaz no tratamento de pacientes com DM2, agindo na diminuição da resistência à insulina periférica e hepática, resultando em aumento da disponibilidade de glicose dependente de insulina e diminuição da produção de glicose hepática. Os medicamentos mais usados desta classe são rosiglitazona e pioglitazona (KENDALL, 2006).

Diferentemente das sulfoniluréias, a TZD não é um secretagogo de insulina, e sim um ligante potente e altamente seletivo dos receptores nucleares *PPAR γ* (Receptor ativado por proliferadores de peroxissoma gama), que são encontrados

em tecidos importantes para a ação da insulina, como o tecido adiposo, músculo esquelético e tecido hepático (HANEFELD, 2007). Este receptor quando estimulado modula a transcrição de vários genes, associados à sensibilidade à insulina, que possuem a propriedade de regular o metabolismo de lipídeos e glicose. Para eficácia da resposta ao tratamento, é necessária a presença de insulina, pois a TZD, aumenta a resposta celular à insulina no tecido muscular, hepático e adiposo, inibindo a gliconeogênese hepática, aumentando a eliminação insulino-dependente de glicose e reduzindo as concentrações plasmáticas de insulina e de hemoglobina glicada (CHOU *et al.*, 2007; TACK & SMITS, 2006).

PPARs são fatores de transcrição da família de receptores nucleares, que regulam a expressão de genes alvos pela ligação a elementos responsivos proliferadores de peroxisoma (PPREs) específicos em genes reguladores caracterizados por seu padrão de distribuição nos tecidos e por sua função metabólica (GROSS, 2007).

Três proteínas, codificadas por genes distintos, foram identificadas: PPAR α , PPAR β e PPAR γ . Os PPARs são fatores de transcrição ligantes dependentes, que possuem a função de regular a expressão do gene-alvo pela ligação a específicos PPREs situados em sítios regulatórios de cada gene (GUO & TABRIZCHI, 2006). O receptor liga-se ao PPRE como um heterodímero, juntamente com um fator protéico adicional, o receptor do ácido 9-*cis* retinóico (RXR). Sob atuação de agonistas, a conformação do PPAR é alterada e estabilizada, criando um sítio de ligação, com posterior recrutamento de coativadores transcrpcionais, resultando em aumento na transcrição gênica (TAVARES *et al.*, 2007).

Foram identificadas sete isoformas de PPAR γ , todos codificados pelo mesmo gene, devido a diversos iniciadores, *splicing* alternativos de 5 exons da região 5-

terminal. *PPAR γ 1* e 2 são mais expressos no tecido adiposo, intestino, fígado e rim. *PPAR γ 3* possui expressão restrita no tecido adiposo e intestino grosso. Os *PPAR γ 4* e 5 são expressos apenas em macrófagos e os *PPAR γ 6* e 7, recentemente descritos, foram detectados até o momento somente no tecido adiposo (GUO & TABRIZCHI, 2006).

Nos adipócitos, o *PPAR γ* regula a expressão de numerosos genes envolvidos no metabolismo de lipídeos, incluindo acil-CoA sintetase e lipase lipoprotéica (LPL). Também controla a expressão da proteína transportadora de ácidos graxos 1 (FATP-1) e CD36, ambos envolvidos na captação de lipídeos pelos adipócitos. Esses genes também apresentam elementos responsivos (PPREs) em sua região regulatória (TANG & MAROO, 2007).

Embora a participação do *PPAR γ* no desenvolvimento do tecido adiposo esteja bem estabelecida, sua expressão reduzida nos tecidos metabolicamente importantes na homeostase da glicose, por exemplo, músculo esquelético, fígado e células beta-pancreática aumentam a questão de sua possível importância fisiológica e farmacológica nesses sítios. De qualquer forma, a importância da fisiopatologia do *PPAR γ* nos tecidos e células não adiposas ainda não está clara (LEHRKE & LAZAR, 2005; SEMPLÉ, 2006).

Evidências da ligação do *PPAR γ* com a ação da insulina, em humanos, também tem sido observada pelo estudo de alterações genéticas, de ocorrência natural, no receptor *PPAR γ* . Foram identificadas, até o momento, sete mutações pontuais. Um polimorfismo incomum, localizado na porção amino-terminal da isoforma *PPAR γ 2*, substituindo a prolina por alanina no códon 12 (Pro12Ala), tem sugerido apresentar efeito protetor contra o risco de desenvolver resistência à insulina e DM2, associado com redução em 25% do risco para DM2 (GELMAN *et al.*,

2007). Esse efeito provavelmente é mediado por aumento na sensibilidade à insulina, por alteração do estado de fosforilação do *PPAR γ* , ampliando sua atividade, e por maior eficiência na supressão na liberação de AGL do tecido adiposo, associado com baixo índice de massa corpórea (IMC) (LEHRKE & LAZAR, 2005; GUO & TABRIZCHI, 2006).

Outro polimorfismo, no exon 6 do gene *PPAR γ* , resultando de uma substituição de C para T (C161T), descrito por Meirhaeghe e colaboradores (1998), foi encontrado em associação com valores circulantes de leptina em sujeitos obesos franceses, mas não em indivíduos com IMC normal. Rhee e colaboradores (2006), não observaram diferenças significativas de IMC e glicemia em jejum, entre os diferentes genótipos. Um achado interessante, mas não significativo, é que indivíduos DM2 portadores de alelo T possuíam maior concentração de colesterol HDL evidenciando assim, um efeito protetor cardiovascular. Além disso, esse polimorfismo tem sido alvo de estudos com relação ao metabolismo ósseo, obesidade e intolerância a glicose.

Estudo realizado por Rhee e colaboradores (2006) propôs uma interação entre os polimorfismos Pro12Ala e o C161T. Ao dividir os indivíduos em quatro grupos, de acordo com as combinações dos dois genótipos e analisados as diferenças de risco dos fatores cardiovasculares, o subgrupo Pro12Ala e alelo T, possuíam IMC maior, sugerindo a possibilidade de interação entre os polimorfismos, embora o mecanismo preciso necessite de maior investigação.

O efeito das TZDs no remodelamento do tecido adiposo resulta em melhora da sensibilidade à insulina, pois interfere na liberação de sinais que agem no tecido muscular e no fígado, dos quais os mais estudados são os AGL, o TNF α e a adiponectina (YANG & SMITH, 2007). As TZDs diminuem os AGL em 25%,

diminuem a secreção de TNF α e aumentam a concentração sérica de adiponectina, como recentemente observado por diferentes estudos duplo cegos e controlados com placebo e pioglitazona e/ou rosiglitazona em pacientes submetidos ao *clamp* insulínico euglicêmico (PATEL *et al.*, 2006).

As TZDs estimulam a diferenciação de adipócitos pequenos, que apresentam como característica maior sensibilidade à insulina e a apoptose dos adipócitos maiores, que são os principais responsáveis pela liberação de AGL, secreção de TNF α e Interleucina 6 (IL-6). A diminuição da liberação de AGL tem efeitos benéficos na secreção e na sensibilidade à insulina (YANG & SMITH, 2007).

As TZDs direcionam a captação dos AGL para o tecido adiposo porque há estímulo de proteínas adaptadoras de transporte vesicular (aP2), que se ligam aos AGL e FATP/CD36 que transportam AGL e colesterol para o adipócito. No adipócito, o aumento de AGL e a maior atividade da glicerol-quinase também induzida pelas TZDs resultará em maior formação de triglicerídeos (PATEL *et al.*, 2006). Desta forma, ocorre uma redistribuição do depósito corporal de triglicerídeos, que passa a ser direcionado para o tecido adiposo, com diminuição da gordura visceral e aumento da gordura celular subcutânea (YANG & SMITH, 2007).

Além de diminuir a resistência à insulina em adipócitos e/ou miócitos, acredita-se que as TZDs também restauram a capacidade da célula β pancreática de produzir insulina, o que explicaria o mais prolongado controle glicêmico obtido pelo uso desses medicamentos. Esta hipótese é sustentada por estudos *in vitro* e com animais, os quais demonstram que os agonistas de *PPAR* γ levam à diminuição dos triacilglicerois contidos nas células β pancreáticas, restauração dos grânulos citoplasmáticos e aumentam sua habilidade de produzir insulina (CAMPBELL & MARIZ, 2007).

O sítio primário de ação das tiazolidinedionas, bem como a função fisiológica dos receptores nucleares *PPAR* γ nos tecidos sensíveis à insulina são desconhecidos. Foi relatado que a pioglitazona melhore a função das células beta pancreática, portanto seria possível que esse mecanismo ocorra via estímulo dos canais K_{ATP} , o qual pode ser mediado pela redução da leptina e de ácidos graxos livres plasmáticos. O presente estudo tem como objetivo avaliar a expressão dos genes *SUR1*, *KIR6.2*, *PPAR* γ e *PPAR* γ 2, relacionar a expressão de *PPAR* γ e *PPAR* γ 2 com os polimorfismos Pro12ala e C161T, bem como mensurar a concentração das adipoquinas e ácidos graxos livres séricas em indivíduos diabéticos tratados com pioglitazona. Esse estudo poderá contribuir no entendimento do mecanismo de ação das tiazolidinedionas, bem como a participação das adipoquinas no estado de diabetes.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Estudar a expressão gênica de *PPAR γ* , *PPAR γ 2*, *SUR1* e *KIR 6.2* em leucócitos totais do sangue periférico e em células do tecido adiposo e a associação de polimorfismos genéticos do gene *PPAR γ* em pacientes diabéticos do tipo 2, sob terapia hipoglicemiante.

2.2 Específicos

2.2.1 Avaliar a função secretora das células β pelo índice HOMA-Beta e a sensibilidade à insulina, pelo índice HOMA-IR.

2.2.2 Avaliar a expressão do mRNA dos genes *PPAR γ* , *PPAR γ 2*, *SUR1* e *KIR 6.2* em leucócitos totais do sangue periférico e em células do tecido adiposo de pacientes diabéticos do tipo 2, antes e após tratamento com pioglitazona.

2.2.3 Avaliar uma possível ação da pioglitazona na regulação do canal de potássio, por meio do estudo da expressão do mRNA dos genes *SUR1* e *KIR6.2*, em leucócitos totais do sangue periférico e em células do tecido adiposo.

2.2.4 Avaliar a associação entre as concentrações sérica das adipocinas com a expressão dos genes *PPAR γ* , *PPAR γ 2*, *SUR1* e *KIR6.2* em leucócitos totais do sangue periférico e células do tecido adiposo.

2.2.5 Determinar as freqüências gênicas e genotípicas dos polimorfismos pro12ala e C161T do gene *PPAR γ* e relacioná-las com a expressão de mRNA de *PPAR γ* e *PPAR γ 2*, após tratamento com pioglitazona.

3. CASUISTICA, MATERIAL E MÉTODOS.

3.1 Casuística e Protocolo Terapêutico

Foram selecionados 52 pacientes na seção de Coronárias do Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia (IDPC). Desses indivíduos, 36 são diabéticos e 16 são controles (normoglicêmicos), diagnosticados de acordo com os critérios do Consenso Brasileiro sobre Diabetes do tipo 2 (Sociedade Brasileira de Diabetes, 2002).

Os pacientes selecionados foram informados sobre o protocolo do estudo que foi previamente aprovado pelo comitê de ética do Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia e somente participaram os que assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo C). Os critérios de inclusão foram: indivíduos de ambos os sexos, com idade entre 30 e 70 anos; duas glicemias em jejum com valores entre 126 mg/dL e 270 mg/dL, ou superiores 200 mg/dL em medida casual (com sintomas clínicos) ou 2h após 75 g de glicose. Os dados dos pacientes foram obtidos e registrados por meio de um questionário (Anexo D).

Foram excluídos pacientes em uso de bloqueadores β -adrenérgicos, inibidores da enzima conversora de angiotensina, diuréticos tiazídicos, corticosteróides, fibratos e agentes hipoglicemiantes orais tais como: metformina, repaglinida, acarbose; pacientes com glicemia demasiadamente alta, que necessitem de terapia insulínica, logo após o diagnóstico ou durante o tratamento; pacientes que necessitavam de terapia combinada com hipoglicemiantes orais e mulheres grávidas.

Os pacientes DM2 selecionados no estudo foram orientados a seguir uma dieta hipocalórica, sem o uso de hipoglicemiante oral, por de 30 dias, conforme indicação médica. Após esse período, os pacientes que apresentaram valores de glicemia dentro dos critérios de inclusão, receberam como medicação pioglitazona 15, 30, 45 e 45 mg /dia/ via oral. No primeiro mês foi administrado no paciente 15 mg, no segundo mês 30 mg, no terceiro mês 45 mg e no último mês 45 mg novamente. Este protocolo de administração foi fixo para todos os pacientes DM2. Durante as 16 semanas do tratamento com pioglitazona, a cada 4 semanas foi avaliada a glicemia através do método capilar com do glicosímetro digital (Accu-Check Advantage; Roche Diagnostics) para acompanhamento do tratamento, também foram avaliados pressão arterial, peso, medida da cintura e medida do quadril.

3.2 Amostras Biológicas

Antes e após o tratamento com pioglitazona foram coletadas amostras de sangue periférico (40 mL), após jejum de no mínimo 12 horas, utilizando o sistema de coleta a vácuo e amostra de tecido adiposo subcutâneo (50 mg), por meio de biópsia por uma agulha, denominada de *Punch* dermatológico (Koplast, Brasil), descartável e estéril de 5 mm de diâmetro, após anestesia local com lidocaína 2% (Xylestesin Cristália, Brasil), o tecido adiposo foi coletado da região lombar direita. A biópsia foi realizada por um médico cirurgião do Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia. Após coleta, o tecido adiposo foi lavado com tampão fosfato salino (PBS) e imerso em 1mL de reagente estabilizante RNAlater® (Qiagen, Alemanha),

mantido em temperatura ambiente por 24 horas e após isso o reagente foi retirado e o tecido armazenado no freezer - 80°C até a sua análise.

Para a extração do DNA genômico, extração de RNA total, dosagem da hemoglobina glicada (Hb1Ac) e hemograma foram utilizados tubos com o anticoagulante EDTA. As amostras colhidas sem anticoagulante foram utilizadas para a obtenção do soro, no qual foram determinadas as glicoses, insulina, perfil renal, lipídico, TSH e T4L. Os exames de hemograma, TSH e T4L foram utilizados apenas como critérios de inclusão no estudo.

3.3 Determinações dos Parâmetros Bioquímicos

A glicemia foi determinada através de método enzimático colorimétrico (TRINDER, 1969) e a Hb1Ac, por imunoturbidimetria. As concentrações séricas de colesterol total, HDL-C e triacilglicerol foram determinadas por método enzimático-colorimétrico (SIEDEL *et al.*, 1983; SIEDEL *et al.*, 1993; SUGIUCHI, *et al.*, 1995) e as de VLDL-C e LDL-C foram calculadas segundo a fórmula de Friedwald (FRIEDWALD, 1972). As concentrações séricas de uréia foram determinadas através do método enzimático (TALKE & SCHUBERT, 1965) e as de creatinina foram determinadas pelo método colorimétrico (JAFJE, 1866).

As determinações bioquímicas foram realizadas utilizando kits comerciais em um analisador automático (Dimension RXL, Dade Behring, Alemanha). A monitorização da precisão, exatidão e controle de qualidade das determinações séricas foi realizada pela determinação concomitante de soros controle normal e patológico comerciais (Dade Behring, Alemanha).

As concentrações séricas de T4L foram determinadas pelo método de imunoensaio competitivo (WENZEL, 1981) e as concentrações séricas de TSH (WENZEL, 1981) e insulina (BABSON, 1991) pelo método imunométrico utilizando analisador automático Immulite com sistema de detecção por quimiluminescência (DPC Medlab, Los Angeles, EUA).

O hemograma foi realizado através de contagem global dos eritrocitos, leucocitos e plaquetas por métodos de impedânciometria e a contagem diferencial da série branca foi realizada por citometria de fluxo, num sistema automatizado (Pentra 80, ABX, Horiba, Japão).

Para determinação das concentrações de adiponectina, resistina e leptina foram utilizados testes de imunoensaios enzimáticos do tipo multiplex, utilizando o Kit HUMAN ADIPCYTE LINCOplex (Linco Research, MO, EUA).

3.3.1 Cálculo dos Índices Homa-IR e Homa-Beta

O índice Homa-IR, que avalia a resistência insulínica, foi calculado utilizando a fórmula: $\text{Insulina (mU/mL)} \times (\text{glicemia mg/dL} \times 0.05551) / 22,5$. Para o cálculo do índice beta, que avalia a função secretora da célula beta, foi utilizado a fórmula: $20 \times \text{insulinemia (mU/mL)} / (\text{glicemia mg/mL} \times 0.05551) - 3,5$ (MATTHEWS *et al.*, 1985).

3.4 Extração e Análise de DNA Genômico

O DNA genômico foi extraído dos leucócitos totais do sangue periférico (LTSP), após lise dos eritrócitos, utilizando o método de precipitação salina

desenvolvido em nosso laboratório (SALAZAR et al., 1998). As amostras de DNA foram armazenadas a -20° C.

A integridade das amostras de DNA foi avaliada por eletroforese em gel de agarose a 0,8% utilizando tampão TBE 0,5X [Tris-HCl a 45 mM, ácido bórico a 45 mM e EDTA a 1mM (pH 8,0)] (SAMBROOK & RUSSEL, 2001). A separação eletroforética foi realizada a 100 v, 60 mA, por 30 min utilizando fonte modelo EPS 200 (GE Healthcare, Amersham Biosciences do Brasil, São Paulo, SP), em cuba horizontal (Gibco BRL, Life Technologies Inc. Gaithersburg, MD, EUA). Como referência foi utilizado um marcador de DNA de 100 bp (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, EUA). Os DNAs foram visualizadas sob luz UV, após coloração do gel com brometo de etídio (0,5 mg/mL) (SAMBROOK; RUSSEL, 2001) e fotodocumentadas em sistema de captura de imagem Chemilmager™ 4400 (v5.5) (Alpha Innotech Corporation, San Leandro, CA, EUA). A quantificação de DNA foi realizada por espectrofotometria, utilizando o Nanodrop ND-100 (NanoDrop Technologies, Wilmington, Delaware, USA) a 260nm, e a pureza do DNA determinada pela relação A260nm/A280nm (SAMBROOK; RUSSEL, 2001).

3.5 Genotipagem do *PPAR γ* pela PCR-RFLP

Foram genotipados os polimorfismos Pro12Ala 34C>G da isoforma 2 e C161T (exon 6), empregando-se a reação em cadeia pela polimerase (PCR).

Para análise dos polimorfismos foram selecionados iniciadores com auxílio do programa Primer Premier® v. 5.0 (Premier Biosoft International, EUA), de acordo a sequência disponível [número de acesso NM 005037.5 (*PPAR γ*) e NM 015869.4 (*PPAR γ 2*)] no Banco de genes (*GenBank*) do *National Institute of Health* (NIH)

(www.ncbi.nlm.nih.gov) (TAVARES, 2004). No **Quadro 1**, estão descritos os iniciadores utilizados na PCR para os polimorfismos estudados

Quadro 1 – Iniciadores utilizados na PCR

Polimorfismo	Métodos	Seqüências dos Iniciadores	Tamanho do Produto de PCR
Pro12Ala 34C>G	PCR-RFLP	5' CCAATTCAAGCCCAGTCCTTTC 3' 5' CAGTGAAGGAATCGCTTTCCG 3'	244 bp
C161T	PCR-RFLP	5'CCCAGGTTTGCTGAATGTGAAG 3' 5'TCCCTCAGAATAGTGCAACTGGA3'	303 bp

Nas PCRs foram utilizados de 5 a 20 pmol dos iniciadores (Invitrogen, São Paulo, SP, Brasil), 0,2 mmol/L de dNTPs (Amersham Biosciences, NJ, EUA), e 1 U de DNA polimerase (Biotools, Madri, Espanha) e tampão de PCR (composição: Tris-HCl a 75mM pH 9.0, MgCl₂ a 2mM, KCl a 50 mM, (NH₄)₂SO₄ a 20mM (Biotools, Madri, Espanha), e 50ng de DNA genômico em um volume total de 25 µL.

A PCR para o polimorfismo *PPAR* γ 2 Pro12Ala foi programada para uma etapa de desnaturação inicial à 98°C por 3 min; seguida da etapa de amplificação com 30 ciclos de desnaturação de 94°C por 1 min, hibridação a 62,5°C por 90s, e etapa de extensão à 72°C por 90s; e etapa de extensão final à 72°C por 10 min. O tamanho do produto gerado foi de 244 bp.

A PCR para o polimorfismo *PPAR* γ C161T mostrou melhor eficiência com 30 ciclos de amplificação com a etapa de desnaturação a 94°C por 45s, hibridização a 61,8°C por 90s e etapa de extensão a 72°C por 90s; e etapa de extensão final à

72°C por 10 min no aparelho PTC-200 (MJ Research Inc. Waltham, MA, EUA). O produto foi de 303 bp.

Os produtos da PCR foram separados por eletroforese em gel de agarose 1% em TBE 0,5X, visualizadas sob luz UV, após coloração do gel com brometo de etídio (0,5 mg/mL) (SAMBROOK; RUSSEL, 2001) e foto documentadas em sistema de captura de imagem Chemilmager™ 4400 (v5.5) (Alpha Innotech Corporation, San Leandro, CA, EUA). Como referência foi utilizado um marcador de tamanho de pares de base de DNA 100 bp (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, EUA).

3.5.1 Ensaios de RFLP

Os genótipos dos SNPs *PPAR* γ 2 Pro12Ala e *PPAR* γ C161T foram identificados por RFLP. Os produtos da PCR foram digeridos com enzimas de restrição, específicas. A digestão dos produtos da PCR dos SNPs Pro12Ala e C161T foram realizadas com 10 U da enzima de restrição *BsTUI* e *Nla III* (New England Biolabs Inc., Ipswich, MA), respectivamente, a 60°C por 2 horas para o SNP Pro12Ala e a 37°C por 1 hora, para o SNP C161T. No **Quadro 2** são apresentados os tamanhos dos fragmentos gerados pela restrição para os SNPs descritos.

Os produtos de digestão enzimática para o polimorfismo *PPAR* γ 2 Pro12Ala foram analisados por eletroforese em gel de poliacrilamida a 8%, em TBE 1X [(Tris-HCl 90 mM, ácido bórico 90 mM e EDTA 2 mM (pH 8,0))] (SAMBROOK; RUSSEL, 2001), utilizando o sistema de eletroforese vertical Mini v16-2 (Biometra, Göttingen, Alemanha), posteriormente, corado com nitrato de prata (Merck S.A., Rio de Janeiro, RJ, Brasil). Para os produtos de digestão enzimática do polimorfismo C161T do

PPAR γ foram analisados por eletroforese em gel de agarose 2% em TBE, corados com brometo de etídeo e visualizados sob luz UV com um transluminador.

As eletroforeses foram realizadas com a fonte modelo EPS 200 (GE Healthcare, Amersham Biosciences do Brasil, São Paulo, SP) a 120 v, 15mA durante 3 horas e 30 minutos, para o SNP Pro12Ala e a 100v, 60mA por 30 minutos para o SNP C161T, utilizando-se como referência um marcador de pares de base de DNA de 100bp (SAMBROOK & RUSSEL, 2001).

Quadro 2 – Fragmentos dos produtos de restrição.

Polimorfismo	Homozigoto comum	Heterozigoto	Homozigoto polimórfico	Produto da PCR íntegro
Pro12Ala	244bp	224bp/ 223bp/ 21bp*	223bp/21bp*	244bp
C161T	104bp/199bp	41bp*/104bp**/ 158bp/199bp**	41bp*/104bp**/ 158bp	303bp

* fragmento não visualizado

** sítio constitutivo da enzima

3.6 Extração e Análise do RNA Total

3.6.1 Extração de RNA Total de Leucócitos Totais de Sangue Periférico

O RNA total foi obtido a partir de sangue total periférico, colhido com EDTA utilizando, o kit de extração *QiAamp RNA Blood Mini®* (Qiagen, Alemanha) imediatamente após a colheita do sangue. Este método que utiliza o sistema de colunas associadas às propriedades de ligação seletiva da membrana sílica gel com propriedades de centrifugação. O procedimento para extração seguiu-se o protocolo

fornecido pelo fabricante (*QIAamp RNA Blood Mini Handbook*). O material obtido foi armazenado no freezer - 80°C até a sua análise.

3.6.2 Extração de RNA Total de Tecido Adiposo

O tecido adiposo foi homogeneizado com 1 mL de TRIZOL® (Invitrogen-Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA), por 10s, a uma velocidade de 20.00 rpm, utilizando o homogeneizador de tecido Homomix D-130 (Biosystems, PR, Brasil), com probe de 5mm, a amostra foi mantida em gelo durante a homogeneização. Após a lise e homogeneização do tecido adiposo seguiu-se a extração, de acordo com procedimento previamente padronizado em nosso laboratório (SALAZAR *et al.*, 2000; MASSIRER *et al.*, 2004). Resumidamente, 200 µL de clorofórmio foram adicionados aos lisados e os extratos foram centrifugados 12.000 x *g* por 15 min, a 4°C. O RNA total presente na fase aquosa foi precipitado com isopropanol gelado, centrifugado a 10.000 x *g*, por 10 min, a 4°C e lavado com etanol a 75% (v/v). A seguir, o RNA foi seco a temperatura ambiente e ressuspendido em 50 µL água esterilizada tratada com (DEPC) (Sigma Aldrich, MO, USA).

3.6.3 Análise do RNA Total

O RNA total extraído foi quantificado por espectrofotometria no ultravioleta (UV) (SAMBROOK; RUSSEL, 2001). O grau de pureza do RNA foi determinado pela relação A_{260nm}/A_{280nm} (SAMBROOK; RUSSEL, 2001).

A integridade do RNA foi avaliada por eletroforese em gel de agarose a 1,0% em tampão MOPS [MOPS 20 mM (pH 7,0), acetato de sódio 8 mM e

EDTA 1mM (pH 8,0)] contendo formaldeído a 2,2 M (SAMBROOK; RUSSEL, 2001). Como referência, foi utilizada um marcador de tamanho de pares de base de RNA (GE Healthcare, Amersham Biosciences do Brasil, São Paulo, SP). A eletroforese foi realizada a 32 V por 40 min utilizando cuba horizontal (Gibco BRL, Life Technologies Inc. Gaithersburg, MD, EUA) (Gibco BRL, Life Technologies Inc. Gaithersburg, MD, EUA) e fonte modelo EPS 200 (GE Healthcare, Amersham Biosciences do Brasil, São Paulo, SP). As bandas eletroforéticas foram visualizadas sob luz UV.

3.7 Análise da Expressão de mRNA pela RT-PCR em Tempo Real

A quantificação da expressão de mRNA dos genes *PPAR γ* , *PPAR γ 2*, *SUR1* e *KIR6.2* em LTSP, foi realizada por transcrição reversa do mRNA seguida de PCR (RT-PCR) em tempo real, utilizando o sistema de amplificação *TaqMan Two Step RT-PCR* (Applied Biosystems, Foster City, CA).

A primeira etapa consistiu da síntese de cDNA a partir de 200 ng de RNA total, na presença de 200 ng de iniciadores aleatórios (*random primers*) (Invitrogen, MD, EUA), DTT 20 mM (Invitrogen, MD, EUA), 200 μ M dNTP 10 mM (GE Healthcare, Amersham Biosciences do Brasil, São Paulo, SP I), 200 U de transcriptase reversa (SuperScript^{TM} II RT RNase H⁻) e tampão de RT (Tris-HCl 250mM pH 8,3, KCl 375 mM, MgCl₂ 15mM) (Invitrogen-Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA). A mistura foi incubada por 10 min a 25°C, seguida de 50 min a 42°C e 15 min a 70°C. O cDNA obtido foi armazenado a -20°C até a realização da PCR.

O cDNA proveniente de RNA total de LTSP e Tecido Adiposo de cada gene foi amplificado pela PCR em tempo real, foram selecionados iniciadores e

sondas marcadas com fluoróforo *FAM* para os genes *PPAR γ* , *PPAR γ 2*, *SUR1*, *KIR6.2* e fluoróforo *VIC* para *GAPD* (**Quadro 3**). A escolha foi possível com o auxílio do programa Primer Express® (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). Iniciadores e sondas foram selecionados de acordo com a sequência disponível [número de acesso NM 138712 (*PPAR γ*), NM 015869 (*PPAR γ 2*), NM 000352 (*SUR1*), NM 000525 (*KIR6.2*) e NM 002046 (*GAPD*)] no Banco de genes (*GenBank*) do *National Institute of Health* (NIH) (www.ncbi.nlm.nih.gov).

Quadro 3. Iniciadores e sondas utilizados nas PCR em Tempo Real.

Genes	RT-PCR	Iniciadores	Fragmento
<i>PPARγ</i>	Tempo Real	5' GCAAAGGCGAGGGCG 3' 5' CCCATCATTAAGGAATTCATGTCAT 3' 5' FAM CAGACAAATCACCATTTCG MGB3'	82 bp
<i>PPARγ2</i>	Tempo Real	5' TGTTATGGGTGA AACTCTGGGA 3' 5' TTTCTTGTGATATGTTTGCAGACAGT 3' 5' FAM AAAGCGATTTCCTTCACTGAT MGB3'	88 bp
<i>SUR1</i>	Tempo Real	5' TCAACGCCAGCGAATCAG 3' 5' GGGTCATCCAAGAAGACAACG 3' 5' FAM CCCTCTACCAGCACGC MGB3'	68 bp
<i>KIR6.2</i>	Tempo Real	5' CTTCTCGTCTGCCTTCCTTTTC 3' 5' AGCCCCACGATGTTCTGC 3' 5' FAM TCCAAGTGACTATTGGCTT MGB3'	122 bp
<i>GAPD</i>	Tempo Real	5' GGAAGGTGAAGGTCGGAGTCA 3' 5' CTGGAAGATGGTGATGGGATTTC 3' 5' VIC TCAGCCTTGAGGGTGC MGB 3'	229 bp

O programa de PCR em tempo real foi constituído de: (1) um ciclo 2 min a 50°C, (ativação da UNG); (2) um ciclo de 10 min a 95°C, (inativação da UNG); (3) 40 ciclos de 15 s a 95°C (desnaturação) e 1 min a 60°C (hibridização e extensão).

Os sinais de fluorescência emitidos pelos fluoróforos das sondas TaqMan foram detectados pelo equipamento ABI Prism 7500 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). Os dados foram analisados utilizando-se o programa 7500 System SDS Software (Applied Biosystems, Foster City, CA EUA) que geram curvas semi-logarítmicas dos sinais de amplificação. Esse programa fornece o parâmetro ciclo em que o sinal de fluorescência é significativo, denominado ciclo *threshold* (C_t) (BUSTIN, 2000; LIVAK & SCHMITTGEN, 2001). Para cada amostra cDNA, o C_t de cada gene é registrado e comparado com o do gene da gliceraldeído desidrogenase (*GAPD*) que é utilizado como controle endógeno.

A quantidade de cDNA utilizada nos ensaios foi otimizada a partir de curva-padrão que permite avaliar a linearidade da amplificação bem como a eficiência da mesma. Para essa finalidade, foram utilizadas diluições seriadas (1:2, 1:4, 1:8 e 1:16) de cDNA de amostras usadas apenas para teste nos ensaios de PCR em tempo real. As diluições de cDNA e os respectivos valores de C_t foram colocados em gráfico que permite verificar a relação entre essas duas variáveis (C_t x log da diluição de cDNA). Após otimização, as concentrações de sondas escolhidas foram de 200 nM e dos iniciadores de 200 nM, para ambos os genes.

A eficiência da reação foi calculada de acordo com a inclinação da curva gerada pela seguinte fórmula: $E = 10^{-1/\alpha} - 1 \times 100$, onde α é a inclinação da curva (PFAFFL, 2001). Segundo LIVAK e SCHMITTGEN, 2001, para um ensaio de PCR em tempo real ter alta eficiência (90% a 110%), a inclinação (*slope*) da curva-padrão deve ser próximo de -3,3. Na **Tabela 1** são apresentados os resultados de inclinações (*slopes*) das curvas e as respectivas eficiências dos ensaios, para os genes *PPAR γ* , *PPAR γ 2*, *SUR1*, *KIR6.2* e *GAPD*.

Tabela 1. Valores de inclinação da curva e eficiência das RT-PCR em tempo real.

Gene	Inclinação da curva	Eficiência
<i>PPARγ</i>	- 3,32	101 %
<i>PPARγ2</i>	- 3,29	100 %
<i>SUR1</i>	- 3,18	103 %
<i>KIR6.2</i>	- 3,03	108 %
<i>GAPD</i>	- 3,43	96 %

Os valores de Ct obtidos nesses ensaios foram utilizados para o cálculo da expressão relativa de mRNA de cada gene alvo em relação à do *GAPD* (controle endógeno). Essa relação é denominada Delta Ct (Δ Ct) e é calculada pela fórmula:

$$\Delta Ct = (Ct_{\text{gene alvo}} - Ct_{\text{controle endógeno}})$$

Com objetivo de avaliar a variação de expressão após o tratamento com pioglitazona, foi utilizado o parâmetro Delta Delta Ct ($\Delta\Delta$ Ct) que é calculado pela fórmula:

$$\Delta\Delta Ct = (\Delta Ct_{\text{basal}} - \Delta Ct_{\text{pioglitazona}})$$

Os dados de $\Delta\Delta$ Ct foram transformados em escala logarítmica ($2^{\Delta\Delta Ct}$) para comparar dados de expressão entre as fases de tratamento farmacológico. A expressão é interpretada pelo seu aumento ou diminuição após o tratamento.

3.8. Análise Estatística

Os resultados foram analisados através do software Sigma Stat versão 2.0 (SPSS Inc., Chicago, EUA). O nível de significância considerado foi $p < 0,05$. Para avaliar as diferenças de frequências das variáveis qualitativas como obesidade e sexo foram realizados o teste de qui-quadrado.

Para comparar os valores de parâmetros bioquímicos entre os grupos estudados e para avaliar diferenças causadas pelo tratamento com pioglitazona foram utilizados o teste-t de Student e Teste de Mann-Whitney Sun para as distribuições normal e não normal respectivamente.

As frequências alélicas e genótípicas foram comparadas por χ^2 (Qui-Quadrado) ou Teste Exato de Fisher. A relação entre os genótipos e exames bioquímicos foi comparada por teste t de Student. A avaliação do Equilíbrio de Hardy-Weinberg foi realizada usando o programa MS-DOS QBasic V. 1.1 (Microsoft Informática Ltda., São Paulo, Brasil).

Os valores de expressão foram transformados em log para fazer os testes paramétricos. Para comparar os valores de expressão gênica nas diferentes fases de medicação foram utilizados Wilcoxon Signed Rank Test, Mann-Whitney Rank Sun Test e One-Way ANOVA. Para comparar os valores de expressão gênica entre os grupos estudados foi utilizado teste-t de Student e Mann-Whitney Rank Sun Test. Para a análise de correlação entre a variação de expressão dos genes e a variação dos parâmetros bioquímicos antes e após o tratamento foi utilizado teste de coeficiente de correlação de Pearson para valores com distribuição normal e Sperman para valores com distribuição não normal.

Para avaliar a influência dos polimorfismos Pro12Ala 34C>G e C161T na expressão gênica do *PPAR γ* e *PPAR γ 2* respectivamente, foram utilizados o teste *t* de Student.

4. RESULTADOS

Foram analisados os dados de 36 indivíduos diabéticos melito tipo 2 (DM2), após completaram as 16 semanas de tratamento com pioglitazona e 16 controles (normoglicêmicos).

4.1 Resultados dos grupos DM2 e controle

4.1.1 Dados dos Pacientes

As características clínicas e os valores médios dos parâmetros bioquímicos (pré-tratamento) dos indivíduos DM2 (n=36) e controle (n=16) incluídos no estudo estão apresentados na **Tabela 2**. Observou-se maior freqüência de homens no grupo DM2 (66,7%), entretanto, no grupo controle houve maior freqüência de mulheres (81,3%). Demonstrando que a distribuição entre homens e mulheres entre os grupos é desigual ($p=0,004$).

Como esperado no grupo DM2 houve aumento nas concentrações séricas basais de glicemia, glicemia 120 min após 75g de sobrecarga de glicose, Hb1Ac e índice HOMA-IR em relação ao grupo controle ($p<0,05$). Não houve diferenças estatisticamente significativas para os valores de insulina e o índice HOMA-beta entre os grupos ($p>0,05$). As concentrações de Colesterol HDL e adiponectina no grupo controle foram maiores em relação ao grupo DM2. Concentração sérica de creatinina foi menor no grupo controle em relação ao grupo DM2. Os demais parâmetros não apresentaram diferenças estatisticamente significativas ($p>0,05$).

Tabela 2. Características biodemográficas e valores de exames bioquímicos basais dos indivíduos diabéticos tipo 2 (DM2) e controles.

Parâmetros	DM2 (36)	Controle (16)	p
Sexo Masculino (%)	66,7% (24)	18,7 % (3)	p=0,004 ^a
Sexo Feminino (%)	33,3% (12)	81,3% (13)	
Obesidade (%)*	44,4% (16)	43,7%(7)	p=0,798 ^a
IMC (kg/m ²)	31 ± 5	31 ± 7	p=0,932 ^b
Idade (anos)	60,2 ± 7,9	52,2 ± 10,4	p=0,062 ^b
Hipertensão (%)	19,4% (7)	3,2% (5)	p=0,478 ^d
Glicemia (mg/dL)	121 ± 19,5	98 ± 14,5	p<0,001 ^b
Glicemia, 120 min após 75g de glicose (mg/dL)	185 ± 60	106 ± 30	p<0,001 ^b
Hb1Ac (%)	6,6 ± 1,1	5,7 ± 0,6	p=0,011 ^c
Insulina (uUI/mL)	13,9 ± 10,3	9,9 ± 6,8	p=0,174 ^c
Índice HOMA-IR (%)	4,1 ± 3,0	2,5 ± 1,8	p=0,015 ^c
Índice HOMA-beta (%)	39 ± 33	37 ± 23,5	p=0,945 ^c
Uréia (mg/dL)	34 ± 13	31 ± 8	p=0,461 ^b
Creatinina (mg/dL)	1,12 ± 0,72	0,9 ± 0,1	p=0,029 ^c
Perfil lipídico (mg/dL)			
Colesterol total	193 ± 35	199 ± 32	p=0,548 ^b
Triglicérides	143 ± 64	125 ± 46	p=0,399 ^c
HDL-C	36 ± 6,5	50 ± 12,5	p<0,001 ^c
LDL-C	123 ± 36	116 ± 27	p=0,513 ^b
VLDL-C	29 ± 13	24 ± 9,8	p=0,226 ^c
Adiponectina (ug/mL)	19 ± 37	22 ± 8	p=0,009 ^c
Resistina (ng/mL)	2,1 ± 1,1	2,5 ± 1,2	p=0,322 ^c
Leptina (ng/mL)	20 ± 17	25 ± 17	p=0,304 ^c

Nota: Número de indivíduos em parêntesis. DM2: diabéticos tipo 2; IMC: Índice de massa corpórea; Hb1Ac: hemoglobina glicada; HOMA-IR: *Homeostasis model assessment* (resistência à insulina); HOMA-beta: (função secretora da célula beta); HDL-C: colesterol da lipoproteína de alta densidade; LDL-C: colesterol da lipoproteína de baixa densidade; VLDL-C: colesterol da lipoproteína de muito baixa densidade. Os resultados apresentados como média ± desvio-padrão e comparados por: Qui quadrado ^(a), Teste-t de student ^(b), Mann-Whitney ^(c), teste exato de Fischer ^(d), *Obesidade considerada quando IMC>30 kg/m²

Os resultados dos exames bioquímicos foram analisados em 36 indivíduos que concluíram o tratamento durante as 16 semanas de estudo os valores dos exames bioquímicos estão apresentados na **Tabela 3**.

Os valores séricos de glicemia de jejum, glicemia de 120 min após 75g de glicose, HbA1c e insulina foram significativamente menores nos indivíduos tratados com pioglitazona ($p < 0,05$) comparados com os controles. Também se observou uma diminuição significativa nos índices HOMA-IR e HOMA-beta após o tratamento ($p < 0,05$).

Houve um aumento significativo nos valores séricos de uréia, colesterol HDL e adiponectina após o tratamento com pioglitazona ($p < 0,05$). Nos demais parâmetros não houveram diferenças estatisticamente significativas ($p > 0,05$) após o tratamento.

Tabela 3. Valores médios e desvio padrão dos parâmetros bioquímicos dos indivíduos diabéticos tipo 2 (DM2) antes a após o tratamento com pioglitazona.

Parâmetros	Basal (36)	Pioglitazona (36)	p
IMC (kg/m ²)	31 ± 5	30 ± 7	p=0,171 ^b
Glicemia (mg/dL)	121 ± 19,5	109 ± 17	p=0,003 ^a
Glicemia, 120 min após 75g de glicose	185 ± 60	157 ± 49	p=0,009 ^a
Hb1Ac (%)	6,6 ± 1,1	6,1 ± 0,4	p=0,013 ^b
Insulina (uU/L)	13,9 ± 10,3	10,4 ± 7,3	p<0,001 ^b
Índice HOMA-IR (%)	4,1 ± 3,0	2,8 ± 2,0	p<0,001 ^b
Índice HOMA-beta (%)	39 ± 33	32 ± 25	p=0,011 ^b
Uréia (mg/dL)	34 ± 13	40 ± 12	p<0,001 ^a
Creatinina (mg/dL)	1,12 ± 0,72	1,0 ± 0,2	p=0,943 ^b
Perfil lipídico (mg/dL)			
Colesterol total	193 ± 35	201 ± 36	p=0,136 ^a
Triglicérides	143 ± 64	133 ± 89	p=0,058 ^b
HDL-C	36 ± 6,5	43 ± 9,5	p<0,001 ^a
LDL-C	123 ± 36	132 ± 30	p=0,132 ^a
VLDL-C	29 ± 13	27 ± 18	p=0,274 ^b
Adiponectina (ug/mL)	19 ± 37	28 ± 18	p<0,001 ^b
Resistina (ng/uL)	2,1 ± 1,1	2 ± 0,8	p=0,090 ^b
Leptina (ng/mL)	20 ± 17	18 ± 16	p=0,241 ^b

Nota: Número de indivíduos em parêntesis. DM2: diabéticos tipo 2; NG: normoglicêmicos; IMC: Índice de massa corpórea; Hb1Ac: hemoglobina glicada; HOMA-IR: *Homeostasis model assessment* (resistência à insulina); HOMA-beta: (função secretora da célula beta); HDL-C: colesterol da lipoproteína de alta densidade; LDL-C: colesterol da lipoproteína de baixa densidade; VLDL-C: colesterol da lipoproteína de muito baixa densidade. Os resultados apresentados como média ± desvio-padrão e comparados por: Teste-t de student ^(a) e Wilcoxon Signed Rank Test ^(b).

4.1.2 Análise dos polimorfismos Pro12Ala e C161T

Nas **Figuras 2 e 3**, são demonstrados os produtos da PCR, para os polimorfismos Pro12Ala e C161T, respectivamente.

Figura 2. Fotografia do gel de eletroforese em agarose a 1% de produtos da PCR do SNP *PPAR*γ2 Pro12Ala. Linha M: marcador de pares de base de DNA de 100bp. Linha 1 a 8: produtos da PCR. Linha 9: controle dos reagentes da PCR.

Figura 3. Fotografia do gel de eletroforese em agarose a 1% de produtos da PCR do SNP *PPAR*γ C161T. Linha M: marcador pares de bases de DNA de 100bp. Linha 1 a 5: produtos da PCR. Linha 6: controle dos reagentes da PCR

Após a PCR, os genótipos dos SNPs *PPAR* γ 2 Pro12Ala e *PPAR* γ C161T foram identificados por RFLP. Os produtos da PCR foram digeridos com enzimas de restrição, específicas para análise de cada polimorfismo (**Figura 4 e 5**), respectivamente.

Figura 4. Fotografia do gel de eletroforese em poliacrilamida 8%, corado com nitrato de prata, dos produtos de restrição do SNP *PPAR* γ 2 Pro12Ala. Linha M: marcador de tamanho de pares de bases de DNA de 100 bp. Linha 1: genótipo Ala/Ala. Linha 2: genótipo Pro/Ala. Linha 3: genótipo Pro/Pro.

Figura 5. Fotografia do gel de eletroforese em agarose 10%, corado com brometo de etídeo, dos produtos de restrição do SNP *PPAR* γ C161T. Linha M: marcador de tamanho de pares de bases de DNA de 100 bp. Linha 1: genótipo CT. Linhas 2, 3 e 4: genótipos CC. Fragmentos que indicam genótipo TT não foram apresentados nesta figura, pois até esse momento este genótipo não foi encontrado nos indivíduos do estudo.

A distribuição de genótipos e a frequência relativa de alelos para os polimorfismos *Pro12Ala* 34C>G e C161T nos grupos estudados estão apresentadas na **Tabela 4**.

Os resultados da análise de Equilíbrio de Hardy-Weinberg indicam que para os polimorfismos estudados, o número de genótipos observados em ambos os grupos não obedece à distribuição esperada para uma população em condições de equilíbrio. Portanto a amostragem analisada não é representativa da população, não permitindo de forma confiável, a comparação das frequências gênicas entre os grupos avaliados. As frequências gênicas e genóticas não foram similares entre os grupos DM2 e controle (**Tabela 4**).

Tabela 4. Distribuição de genótipos e frequência relativa de alelos para os polimorfismos *Pro12Ala 34C>G* e *C161T* grupos diabetes melito tipo (DM2) e controles.

Polimorfismo	Distribuição de genótipos			Frequência de Alelos	
Pro12Ala 34C>G	CC	CG	GG	C	G
DM2 (36)	83,3% (31)	11,1% (4)	5,6% (1)	0,92	0,08
Controle (16)	100% (16)	0% (0)	0% (0)	1,0	0
	<i>*p=1,000</i>			<i>*p=1,000</i>	
C161T	CC	CT	TT	C	T
DM2 (36)	30,6% (11)	69,4% (25)	0% (0)	0,66	0,34
Controle (16)	31,2% (5)	68,8% (11)	0% (0)	0,7	0,3
	<i>*p=1,000</i>			<i>*p=1,000</i>	

* Teste exato de Fisher

Nota: Equilíbrio de Hardy-Weinberg:

Pro12Ala 34C>G: DM2: (1gl, $p < 0.05$); Controle: (1gl, $p < 0.05$).

C161T: DM2: (1gl, $p < 0.05$); Controle: (1gl, $p < 0.05$)

As características clínicas e os valores dos exames bioquímicos do grupo DM2 nas diferentes fases de medicação de acordo com os genótipos dos polimorfismos *Pro12Ala 34C>G* e *C161T* estão apresentados nas **Tabelas 5 e 6**, respectivamente. Os genótipos CG e GG foram agrupados, e não houve diferença entre as características clínicas e exames bioquímicos entre o grupo DM2 portadores de genótipos do polimorfismo *Pro12Ala 34C>G*.

As concentrações séricas de Colesterol Total e Colesterol LDL, após tratamento, de pacientes portadores do genótipo CT, do polimorfismo C161T, foram menores que os portadores do genótipo CC ($p=0,045$). E após o tratamento, houve diferença entre a variação de Hb1Ac e de IMAC após o tratamento, entre os genótipos CC vs CT, do polimorfismo C161T.

Tabela 5. Valores médios e desvio padrão dos parâmetros bioquímicos antes e após tratamento com pioglitazona em pacientes do grupo DM2, com diferentes genótipos do polimorfismo *Pro12Ala 34C>G*.

Parâmetros	CC (31)	CG + GG (5)	p (CC vs. CG/GG)
Colesterol Total			
Basal	193 ± 34	200 ± 43	0,071 ^a
Pioglitazona	196 ± 34	219 ± 44	0,181 ^b
Variação (%)	3 ± 14	10 ± 11	0,258 ^a
Triacilglicerol			
Basal	144 ± 66	144 ± 80	0,962 ^b
Pioglitazona	129 ± 66	170 ± 181	0,850 ^b
Variação (%)	-7 ± 38	34 ± 70	0,547 ^a
HDL-C			
Basal	36 ± 6	37 ± 4	0,598 ^a
Pioglitazona	42 ± 10	42 ± 6	0,807 ^b
Variação (%)	20 ± 28	13 ± 25	0,660 ^a
LDL-C			
Basal	127 ± 44	155 ± 29	0,185 ^a
Pioglitazona	120 ± 30	146 ± 29	0,222 ^a
Variação (%)	17 ± 87	-5 ± 7	0,706 ^a
VLDL-C			
Basal	29 ± 13	29 ± 12	1,000 ^b
Pioglitazona	27 ± 13	34 ± 36	0,700 ^b
Variação (%)	-4 ± 39	4 ± 66	0,650 ^b
Glicemia			

Basal	121 ± 20	133 ± 37	0,408 ^b
Pioglitazona	110 ± 14	101 ± 28	0,381 ^a
Variação (%)	-7 ± 14	-20 ± 24	0,166 ^a
Insulina			
Basal	15 ± 10	18 ± 12	0,614 ^a
Pioglitazona	16 ± 7	11 ± 9	1,000 ^b
Variação (%)	-28 ± 35	-33 ± 23	0,828 ^b
Glicemia, 120 min			
Basal	197 ± 56	84 ± 29	0,098 ^a
Pioglitazona	167 ± 64	137 ± 54	0,727 ^b
Variação (%)	-16 ± 28	64 ± 30	0,194 ^b
Hb1Ac			
Basal	6,6 ± 1,1	6,7 ± 0,2	0,788 ^b
Pioglitazona	6,1 ± 0,4	6 ± 0,5	0,873 ^b
Variação (%)	-5 ± 12	-7 ± 12	0,775 ^a
HOMA-IR			
Basal	4,7 ± 3	5,9 ± 2,3	0,374 ^a
Pioglitazona	2,7 ± 1,9	4,8 ± 2,7	0,825 ^a
Variação (%)	-37 ± 34	-22 ± 14	0,643 ^a
HOMA-Beta			
Basal	42 ± 32	63 ± 43	0,263 ^a
Pioglitazona	36 ± 24	46 ± 33	0,214 ^b
Variação (%)	-19 ± 51	-23 ± 11	0,594 ^b
IMC*			
Basal	30 ± 4	35 ± 8	0,307 ^b
Pioglitazona	30 ± 4	25 ± 8	0,285 ^b
Variação (%)	1 ± 3	0 ± 2	0,446 ^a
Adiponectina			
Basal	21 ± 42	10 ± 1	0,427 ^b
Pioglitazona	27 ± 19	22 ± 7	0,644 ^a
Variação (%)	99 ± 107	142 ± 45	0,513 ^a
Resistina			
Basal	2,3 ± 1,2	2,1 ± 0,8	0,734 ^a
Pioglitazona	1,9 ± 0,8	2 ± 1	0,886 ^a
Variação (%)	-1,4 ± 67	2 ± 26	0,299 ^b

Leptina

Basal	19 ± 18	22 ± 20	0,915 ^b
Pioglitazona	16 ± 15	19 ± 18	0,546 ^b
Variação (%)	-1,4 ± 43	-5 ± 43	0,909 ^a

Nota: Número de indivíduos em parêntesis. HDL-C: colesterol da lipoproteína de alta densidade; LDL-C: colesterol da lipoproteína de baixa densidade; VLDL-C: colesterol da lipoproteína de muito baixa densidade, IMC: Índice de massa corpórea; Hb1Ac: hemoglobina glicada; HOMA-IR: Homeostasis model assessment (resistência à insulina); HOMA-Beta: (função secretora da célula beta-pancreática). Os resultados apresentados como média ± desvio-padrão e comparados por teste-t de student^(a) Mann-Whitney^(b). *Obesidade considerada quando IMC>30 kg/m².

Tabela 6. Valores médios e desvio padrão dos parâmetros bioquímicos antes e após tratamento com pioglitazona em pacientes do grupo DM2, com diferentes genótipos do polimorfismo C161T.

Parâmetros	CC (11)	CT (25)	**p (CC vs. CT)
Colesterol Total			
Basal	200 ± 31	190 ± 36	0,432 ^a
Pioglitazona	220 ± 32	189 ± 34	0,015 ^a
Variação (%)	11 ± 17	0 ± 10	0,097 ^b
Triacilglicerol			
Basal	132 ± 50	143 ± 62	0,611 ^a
Pioglitazona	148 ± 118	126 ± 93	0,445 ^b
Variação (%)	13 ± 60	-12 ± 38	0,134 ^a
HDL-C			
Basal	38 ± 5	36 ± 6	0,430 ^a
Pioglitazona	43 ± 9	40 ± 9	0,438 ^a
Variação (%)	17 ± 32	14 ± 23	0,769 ^a
LDL-C			
Basal	149 ± 40	126 ± 39	0,123 ^a
Pioglitazona	145 ± 33	122 ± 26	0,045 ^a
Variação (%)	6 ± 25	3 ± 31	0,905 ^b
VLDL-C			

Basal	30 ± 14	28 ± 12	0,644 ^b
Pioglitazona	30 ± 16	25 ± 18	0,278 ^b
Variação (%)	2 ± 47	-12 ± 38	0,349 ^a
Glicemia			
Basal	132 ± 28	119 ± 20	0,346 ^b
Pioglitazona	111 ± 20	108 ± 14	0,768 ^a
Variação (%)	-14 ± 16	-7 ± 15	0,232 ^a
Insulina			
Basal	14 ± 7	16 ± 11	0,733 ^a
Pioglitazona	8 ± 3	11 ± 8	0,359 ^a
Variação (%)	-33 ± 20	-23 ± 38	0,355 ^a
Glicemia, 120 min			
Basal	171 ± 50	189 ± 66	0,469 ^a
Pioglitazona	155 ± 44	157 ± 52	0,965 ^a
Variação (%)	-3 ± 35	-9 ± 35	0,679 ^a
Hb1Ac			
Basal	6 ± 0,3	6,8 ± 1,2	0,159 ^b
Pioglitazona	6 ± 0,3	6,1 ± 0,5	0,681 ^a
Variação (%)	1,5 ± 0,9	-12 ± 22	0,054 ^b
HOMA-IR			
Basal	5 ± 2	4,9 ± 3,2	0,445 ^a
Pioglitazona	2,3 ± 1	3 ± 2,3	0,535 ^a
Variação (%)	-40 ± 26	-35 ± 38	0,921 ^a
HOMA-Beta			
Basal	38 ± 19	47 ± 39	0,491 ^a
Pioglitazona	25 ± 13	35 ± 29	0,309 ^a
Variação (%)	-34 ± 16	-14 ± 54	0,478 ^b
IMC*			
Basal	31 ± 4	31 ± 5	0,903 ^a
Pioglitazona	30 ± 2	31 ± 5	0,605 ^a
Variação (%)	-1 ± 3	1,5 ± 2,7	0,053 ^a
Adiponectina			
Basal	11 ± 8	24 ± 49	0,878 ^b
Pioglitazona	26 ± 17	24 ± 16	0,742 ^b
Variação (%)	107 ± 100	105 ± 96	0,975 ^a

Resistina

Basal	1,6 ± 0,8	2,5 ± 1,3	0,081 ^a
Pioglitazona	1,5 ± 0,8	2,2 ± 0,8	0,090 ^a
Variação (%)	-5,5 ± 21	5,4 ± 76	0,620 ^b

Leptina

Basal	14 ± 10	22 ± 20	0,261 ^a
Pioglitazona	13 ± 8	19 ± 18	0,518 ^b
Variação (%)	-0,1 ± 36	-5 ± 43	0,484 ^b

Nota: Número de indivíduos em parêntesis. HDL-C: colesterol da lipoproteína de alta densidade; LDL-C: colesterol da lipoproteína de baixa densidade; VLDL-C: colesterol da lipoproteína de muito baixa densidade, IMC: Índice de massa corpórea; Hb1Ac: hemoglobina glicada; HOMA-IR: Homeostasis model assessment (resistência à insulina); HOMA--Beta: (função secretora da célula beta-pancreática). Os resultados apresentados como média ± desvio-padrão e comparados por teste-t de student^(a) Mann-Whitney^(b). *Obesidade considerada quando IMC>30 kg/m²

4.2 Resultados da expressão gênica em LTSP.

As expressões genes *PPAR γ* , *PPAR γ 2*, *SUR1* e *KIR6.2* em leucócitos totais do sangue periférico (LTSP) foram analisadas em 36 indivíduos que concluíram o tratamento de 16 semanas e em 16 indivíduos para o grupo controle.

Os valores de Ct obtidos nesses ensaios foram utilizados para o cálculo da expressão relativa de mRNA de cada gene alvo em relação à do *GAPD* (controle endógeno). Essa relação é denominada Delta Ct (Δ Ct). Os dados de Δ Ct foram transformados em escala logarítmica (2^{Δ Ct) para comparar dados de expressão entre as fases de tratamento farmacológico. A expressão é interpretada pelo seu aumento ou diminuição após o tratamento.

A **Figura 6** ilustra a variação de expressão gênica normalizada, transformada em escala logarítmica em LTSP do grupo DM2 antes (box pretos) e após (box

brancos) o tratamento com pioglitazona. Observa-se grande variabilidade entre os indivíduos para todos os genes estudados

Figura 6. Box plots de valores de expressão normalizada dos genes *PPAR γ* , *PPAR γ 2*, *SUR1* e *KIR6.2* em LTSP, antes e após o tratamento com pioglitazona. Os Box plots mostram a mediana, distância interquartílica e os valores extremos (círculos).

Na **Tabela 7** são apresentados os valores de média $\pm$ desvio-padrão de expressão do mRNA dos genes *PPAR γ* , *PPAR γ 2*, *SUR1* e *KIR6.2* em LTSP no grupo DM2 basal (pré-tratamento) e grupo controle. Observou-se que a expressão de *PPAR γ* no grupo DM2 está aumentada em comparação ao grupo controle

($p < 0,05$). Para demais genes não houve diferenças estatisticamente significantes entre o grupo DM2 (basal) e o grupo controle.

Tabela 7. Valor de expressão basal de *PPAR γ* , *PPAR γ 2*, *SUR1*, e *KIR6.2*, comparados aos valores do grupo controle em LTSP.

Genes	DM2 ($2^{-\Delta Ct}$) (36)	Controle ($2^{-\Delta Ct}$) (16)	P
<i>PPARγ</i>	0,001257 (0,0006876- 0,001855)	0,0007695 (0,0003731- 0,001819)	0,012 ^a
<i>PPARγ2</i>	0,003027 (0,0004312- 0,02510)	0,01033 (0,001428-0,02889)	0,206 ^a
<i>SUR1</i>	0,001407 (0,0002743- 0,003286)	0,001717 (0,0002965- 0,004833)	0,705 ^a
<i>KIR6.2</i>	0,001640 (0,0002766- 0,006661)	0,004310 (0,0005687- 0,01098)	0,230 ^a
P	$p=0,230^b$	$p=0,015^c$	

Nota: Número de indivíduos em parênteses. ΔCt : CT do gene alvo – Ct GAPD da amostra. Os resultados apresentados como média $\pm$ desvio-padrão e comparados por: Mann-Whitney Rank Sun Test ^(a), One-Way ANOVA on Ranks ^(b) One-Way ANOVA (Dunn's Method).

Na **Tabela 8** são apresentados os valores medianos e os intervalos (25 e 75%) de expressão do mRNA dos genes em estudo em LTSP do grupo DM2. Observou-se que o tratamento com pioglitazona aumentou a expressão de mRNA dos genes *PPAR γ* , *PPAR γ 2*, *SUR1* e *KIR 6.2* ($p < 0,05$).

Tabela 8. Variação da expressão de mRNA dos genes *PPAR γ* , *PPAR γ 2*, *SUR1*, e *KIR6.2* em LTSP em diabéticos melito tipo 2 (DM2) tratados com pioglitazona (15, 30, 45, 45 mg/dia/16 semanas).

Genes	Basal ($2^{-\Delta Ct}$) n (31)	Pioglitazona ($2^{-\Delta Ct}$)	P
<i>PPARγ</i>	0,001257 (0,0006876- 0,001855)	0,001494 (0,0007202- 0,003284)	<0,0001 ^a
<i>PPARγ2</i>	0,003027 (0,0004312- 0,02510)	0,005590 (0,0006703- 0,02166)	<0,0001 ^a
<i>SUR1</i>	0,001407 (0,0002743- 0,003286)	0,001351 (0,0003343-0,0026)	<0,0001 ^a
<i>KIR6.2</i>	0,001640 (0,0002766- 0,006661)	0,001937 (0,0003709- 0,008510)	<0,0001 ^a
P	p=0,081 ^b	p=0,031 ^c	

Nota: Número de indivíduos em parênteses. ΔCt : CT do gene alvo – Ct GAPD da amostra. Valores de expressão apresentados como mediana (25%-75%). Os resultados foram comparados por Wilcoxon Signed Rank Test ^(a), One-Way ANOVA ^(b), One-Way ANOVA (Dunn's Method).

A análise de correlação entre os valores de expressão de mRNA dos genes *PPAR γ* , *PPAR γ 2*, *SUR1*, e *KIR6.2*, normalizados com o controle endógeno *GAPD* do grupo DM2, após o tratamento com pioglitazona ($\Delta Ct_{\text{pioglitazona}} (\Delta Ct_{\text{gene}} - \Delta Ct_{\text{GAPD}}) - \Delta Ct_{\text{basal}} (\Delta Ct_{\text{gene}} - \Delta Ct_{\text{GAPD}})$) está representada na **Figura 7**.

Houve correlação positiva significativa da expressão de mRNA entre os genes *SUR1* e *PPAR γ* ($r=-0,378$, $p = 0,039$); *SUR1* e *PPAR γ 2* ($r=0,822$, $p = < 0,001$). *KIR 6.2* e *PPAR γ 2* ($r=0,574$, $p < 0,0002$); *KIR6.2* e *SUR1* ($r=0,730$, $p = < 0,0001$). As correlações encontradas sugerem que a pioglitazona regula a expressão desses genes simultaneamente nos indivíduos DM2.

Figura 7. Análise de correlação entre as variações da expressão de mRNA ($\Delta Ct_{\text{pioglitazona}} - \Delta Ct_{\text{basal}}$) em LTSP após o tratamento com pioglitazona. A: Correlação entre o mRNA de $PPAR\gamma$ e $PPAR\gamma 2$; B: Correlação entre o mRNA de $PPAR\gamma 2$ e $SUR1$; C: Correlação entre $PPAR\gamma$ e $KIR6.2$; D: Correlação entre o mRNA de $PPAR\gamma 2$ e $SUR1$; E: Correlação entre o mRNA de $PPAR\gamma 2$ e $KIR6.2$ e F: Correlação entre o mRNA de $SUR1$ e $KIR6.2$

No grupo DM2, verificou-se que alguns pacientes apresentaram aumento de expressão gênica em LTSP enquanto outros tiveram diminuição após o tratamento com pioglitazona (**Figura 8**). Em razão dessa variabilidade na expressão gênica, os dados foram separados em dois grupos, A e D para cada gene, onde A corresponde ao grupo com a expressão aumentada e D com a expressão diminuída após o tratamento.

Observou-se que nos genes *PPAR γ* , *PPAR γ 2*, *SUR1* e *KIR6.2*, além da diferença encontrada na expressão de mRNA após o tratamento com a pioglitazona nos grupos A e D, também observou-se diferença de expressão basal entre os grupos A e D. Esse dado sugere que a expressão basal do grupo D são maiores que os de expressão basal do grupo A. O mesmo fenômeno ocorreu com os de expressão após o tratamento com a pioglitazona.

Figura 8. Valores de expressão de mRNA de *PPAR γ* , *PPAR γ 2*, *SUR1* e *KIR6.2* em LTSP antes e após o tratamento com pioglitazona. Dados comparados por Wilcoxon Signed Rank Test. A: aumento da expressão induzida pela pioglitazona; D diminuição da expressão induzida pela pioglitazona.

Nas tabelas a seguir (9 a 12), foram avaliadas as diferenças nos parâmetros bioquímicos, antes e após o tratamento com pioglitazona entre os grupos que aumentaram e diminuíram a expressão para cada gene. Diferenças de concentração de Hb1Ac foram encontradas do grupo A e D, basal ($p=0,013$) e após tratamento com pioglitazona ($p=0,008$), mas a redução não foi estatisticamente significativa (**Tabela 9**).

Para o gene *PPAR γ 2*, pacientes do grupo A e D, resultaram em concentrações de colesterol total diferentes, após tratamento com pioglitazona ($p=0,019$) e esta variação entre os grupos analisados foi significativa ($p=0,023$). Para a concentração de HDL-C, pacientes do grupo A e D, obtiveram variação de HDL-C, ($p=0,047$). E em relação ao VLDL-C, houve diferença após o tratamento ($p<0,001$), e variação foi significativa ($p=0,049$). Em relação a dosagem de resistina, houve diferença na concentração após o tratamento ($p=0,045$) e a variação foi significativa ($p=0,031$). (**Tabela 10**).

Em relação ao gene *SUR1*, diferenças de concentração de Colesterol Total e Hb1Ac foram encontradas do grupo A e D, após tratamento com pioglitazona, ($p=0,032$) e ($p=0,012$), respectivamente, mas a redução não foi estatisticamente significativa. Pacientes que aumentaram a expressão do gene *SUR1* obtiveram maiores concentrações basais de uréia ($p=0,028$). Valores médios de creatinina, após tratamento com pioglitazona, foram diferentes entre pacientes do grupo A e D, pacientes do primeiro grupo resultaram em concentrações de creatinina maiores, em relação ao grupo com diminuição da expressão ($p=0,032$) (**Tabela 11**).

Para o gene *KIR6.2*, pacientes que aumentaram a expressão de mRNA, houve redução de colesterol total, enquanto pacientes que resultaram em diminuição da expressão de mRNA de *KIR6.2*, aumentou a concentração de colesterol total sérico ($p=0,009$) e resultaram em variação de LDL-C após tratamento ($p=0,026$) (**Tabela 12**).

Tabela 9. Valores médios e desvio padrão dos parâmetros bioquímicos antes e após tratamento com pioglitazona em pacientes do grupo DM2, de acordo com a variação da expressão gênica de *PPAR γ* .

Perfil lipídico (mg/dL)		A (20)	D (16)	P
CT	Basal	196 $\pm$ 37	201 $\pm$ 32	0,661 ^a
	Pioglitazona	209 $\pm$ 42	201 $\pm$ 25	0,564 ^a
	Variação (%)	7,5 $\pm$ 15	-0,8 $\pm$ 5	0,160 ^a
Triacilglicerol	Basal	132 $\pm$ 48	141 $\pm$ 82	0,933 ^b
	Pioglitazona	134 $\pm$ 97	115 $\pm$ 81	0,276 ^b
	Variação (%)	5 $\pm$ 52	-29 $\pm$ 26	0,146 ^a
HDL-C	Basal	37 $\pm$ 6	38 $\pm$ 8	0,708 ^a
	Pioglitazona	41 $\pm$ 8	44 $\pm$ 8	0,438 ^a
	Variação (%)	16 $\pm$ 28	19 $\pm$ 23	0,721 ^a
LDL-C	Basal	140 $\pm$ 38	139 $\pm$ 56	0,950 ^b
	Pioglitazona	142 $\pm$ 31	134 $\pm$ 25	0,484 ^b
	Variação (%)	3 $\pm$ 16	32 $\pm$ 126	0,182 ^a
VLDL-C	Basal	26 $\pm$ 10	29 $\pm$ 16	0,900 ^b
	Pioglitazona	27 $\pm$ 20	23 $\pm$ 16	0,285 ^b
	Variação (%)	4 $\pm$ 51	-20 $\pm$ 26	0,132 ^a
Glicemia	Basal	117 $\pm$ 17	129 $\pm$ 32	0,345 ^b
	Pioglitazona	109 $\pm$ 20	110 $\pm$ 13	0,892 ^b
	Variação (%)	-6 $\pm$ 17	-11 $\pm$ 16	0,397 ^a
Insulina	Basal	15 $\pm$ 8	5 $\pm$ 13	0,476 ^a
	Pioglitazona	11 $\pm$ 7	10 $\pm$ 8	0,438 ^b
	Variação (%)	-18 $\pm$ 33	-28 $\pm$ 33	0,721 ^b
Glicemia 120 min	Basal	182 $\pm$ 60	208 $\pm$ 62	0,302 ^b
	Pioglitazona	160 $\pm$ 57	174 $\pm$ 37	0,273 ^b

	Variação (%)	-4 ± 35	-10 ± 33	0,891 ^a
Hb1Ac	Basal	5,9 ± 0,2	6,7 ± 1,2	0,013 ^b
	Pioglitazona	5,8 ± 0,3	6,2 ± 0,4	0,008 ^a
	Variação (%)	-1,7 ± 7,7	-6 ± 11	0,246 ^a
HOMA-IR	Basal	4,5 ± 2,5	4,9 ± 4	0,689 ^b
	Pioglitazona	2,9 ± 2,1	2,7 ± 2,2	0,593 ^b
	Variação (%)	-28 ± 36	-40 ± 34	0,434 ^b
HOMA-BETA	Basal	42 ± 28	45 ± 46	0,738 ^b
	Pioglitazona	34 ± 26	30 ± 27	0,548 ^b
	Variação (%)	-17 ± 34	-12 ± 60	0,789 ^b
Uréia	Basal	32 ± 16	35 ± 13	0,620 ^a
	Pioglitazona	37 ± 11	42 ± 13	0,314 ^b
	Variação (%)	41 ± 82	37 ± 70	0,558 ^b
Creatinina	Basal	1,1 ± 0,8	1,1 ± 0,8	0,750 ^b
	Pioglitazona	1,0 ± 0,2	0,9 ± 0,3	0,893 ^b
	Variação (%)	-2,7 ± 32	-3 ± 24	0,715 ^b
IMC	Basal	32 ± 5	29 ± 4	0,332 ^a
	Pioglitazona	31 ± 5	30 ± 5	0,380 ^a
	Variação (%)	- 0,6 ± 2,8	1 ± 2	0,612 ^a
Adiponectina	Basal	11 ± 8	11 ± 8	0,508
	Pioglitazona	29 ± 17	29 ± 17	0,822 ^a
	Variação (%)	148 ± 64	148 ± 64	0,275 ^a
Resistina	Basal	2,3 ± 0,9	1,7 ± 0,7	0,113 ^a
	Pioglitazona	2 ± 0,8	1,9 ± 1,1	0,867 ^a
	Variação (%)	-6 ± 30	25 ± 91	0,278 ^b
Leptina	Basal	17 ± 11	25 ± 25	0,360 ^a
	Pioglitazona	17 ± 9	21 ± 25	0,501 ^a
	Variação (%)	12 ± 38	-8 ± 41	0,221 ^a

Nota: Número de indivíduos em parêntesis. Basal: sem tratamento; Pioglitazona: após tratamento com pioglitazona; %: % redução; A: aumento da expressão gênica após o tratamento; D: diminuição da expressão gênica após o tratamento; IMC: Índice de massa corpórea; Hb1Ac: hemoglobina glicada; HOMA-IR: Homeostasis model assessment (resistência à insulina); HOMA-beta: (função secretora da célula beta-pancreática); HDL-C: colesterol da lipoproteína de alta densidade; LDL-C: colesterol da lipoproteína de baixa densidade; VLDL-C: colesterol da lipoproteína de muito baixa densidade. Os resultados apresentados como média ± desvio-padrão e comparados por teste t de Student^(a) e Mann Whitney^(b).

Tabela 10. Valores médios e desvio padrão dos parâmetros bioquímicos antes e após tratamento com pioglitazona em pacientes do grupo DM2, de acordo com a variação da expressão gênica de *PPARγ2*.

Perfil lipídico (mg/dL)		A (20)	D (16)	P
CT	Basal	191 ± 36	199 ± 34	0,569 ^a
	Pioglitazona	188 ± 28	246 ± 39	0,019 ^a
	Variação (%)	0,9 ± 9	10 ± 16	0,023 ^a
Triacilglicerol	Basal	127 ± 58	163 ± 66	0,058 ^b
	Pioglitazona	119 ± 61	149 ± 113	0,538 ^b
	Variação (%)	-1,1 ± 4,3	-11 ± 41	0,475 ^a
HDL-C	Basal	37 ± 6	35 ± 6	0,404 ^a
	Pioglitazona	40 ± 9	44 ± 9	0,254 ^a
	Variação (%)	10 ± 19	28 ± 31	0,047 ^a
LDL-C	Basal	136 ± 36	131 ± 55	0,800 ^a
	Pioglitazona	127 ± 27	142 ± 30	0,074 ^a
	Variação (%)	6,6 ± 16	39 ± 113	0,163 ^b
VLDL-C	Basal	25 ± 11	32 ± 13	0,067 ^b
	Pioglitazona	23 ± 12	40 ± 11	<0,001 ^a
	Variação (%)	-3 ± 40	38 ± 62	0,049 ^b
Glicemia	Basal	124 ± 26	118 ± 18	0,582 ^b
	Pioglitazona	110 ± 17	106 ± 16	0,462 ^b
	Variação (%)	-9 ± 16	-9 ± 16	0,967 ^a
Insulina	Basal	17 ± 11	14 ± 9	0,712 ^a
	Pioglitazona	10 ± 17	10 ± 8	0,719 ^a
	Variação (%)	-33 ± 28	-25 ± 37	0,764 ^a
Glicemia 120 min	Basal	188 ± 65	180 ± 57	0,543 ^a
	Pioglitazona	156 ± 42	158 ± 52	0,662 ^b
	Variação (%)	-9 ± 36	-6 ± 33	0,572 ^b
Hb1Ac	Basal	7 ± 1,3	6 ± 0,4	0,292 ^b
	Pioglitazona	6,3 ± 0,4	5,9 ± 0,3	0,135 ^b
	Variação (%)	-7 ± 13	-2,1 ± 7	0,448 ^a
HOMA-IR	Basal	5,2 ± 3	4,4 ± 2,7	0,486 ^a
	Pioglitazona	2,8 ± 1,8	2,8 ± 2,2	0,993 ^a
	Variação (%)	-42 ± 32	-33 ± 36	0,541 ^a
HOMA-BETA	Basal	50 ± 35	40 ± 33	0,440 ^a

	Pioglitazona	34 ± 22	32 ± 28	0,861 ^a
	Variação (%)	-26 ± 31	-12 ± 58	0,827 ^b
Uréia	Basal	35 ± 13	32 ± 13	0,482 ^b
	Pioglitazona	40 ± 10	39 ± 14	0,208 ^b
	Variação (%)	35 ± 78	33 ± 59	0,332 ^b
Creatinina	Basal	1,1 ± 0,5	1,2 ± 0,9	0,467 ^b
	Pioglitazona	1 ± 0,1	1 ± 0,2	0,987 ^b
	Variação (%)	-2 ± 21	-1,0 ± 23	0,638 ^b
IMC	Basal	31 ± 4	30 ± 6	0,659 ^a
	Pioglitazona	32 ± 4	30 ± 6	0,508 ^a
	Variação (%)	1,2 ± 2,6	0,2 ± 3,9	0,285 ^b
Adiponectina	Basal	30 ± 56	12 ± 5	0,396 ^b
	Pioglitazona	25 ± 18	29 ± 18	0,564 ^a
	Variação (%)	68 ± 96	131 ± 99	0,118 ^a
Resistina	Basal	2,3 ± 1,4	2,2 ± 0,9	0,804 ^a
	Pioglitazona	1,6 ± 0,7	2,2 ± 0,8	0,045 ^a
	Variação (%)	-22 ± 18	20 ± 79	0,031 ^a
Leptina	Basal	22 ± 21	16 ± 12	0,381 ^a
	Pioglitazona	18 ± 19	14 ± 10	0,747 ^b
	Variação (%)	-11 ± 32	6 ± 43	0,219 ^a

Nota: Número de indivíduos em parêntesis. Basal: sem tratamento; Pioglitazona: após tratamento com pioglitazona; %: % redução; A: aumento da expressão gênica após o tratamento; D: diminuição da expressão gênica após o tratamento; IMC: Índice de massa corpórea; Hb1Ac: hemoglobina glicada; HOMA-IR: Homeostasis model assessment (resistência à insulina); HOMA-beta: (função secretora da célula beta-pancreática); HDL-C: colesterol da lipoproteína de alta densidade; LDL-C: colesterol da lipoproteína de baixa densidade; VLDL-C: colesterol da lipoproteína de muito baixa densidade. Os resultados apresentados como média ± desvio-padrão e comparados por teste t de Student ^(a) e Mann Whitney ^(b).

Tabela 11. Valores médios e desvio padrão dos parâmetros bioquímicos antes e após tratamento com pioglitazona em pacientes do grupo DM2, de acordo com a variação da expressão gênica de *SUR1*.

Perfil lipídico (mg/dL)		A (19)	D (18)	P
CT	Basal	191 ± 34	199 ± 36	0,282 ^a
	Pioglitazona	188 ± 29	207 ± 37	0,032 ^a
	Variação (%)	-0,3 ± 10	5 ± 14	0,076 ^a
Triacilglicerol	Basal	140 ± 66	143 ± 66	0,446 ^b
	Pioglitazona	128 ± 63	137 ± 119	0,843 ^b
	Variação (%)	-7 ± 32	-4 ± 56	0,924 ^a
HDL-C	Basal	36 ± 8	38 ± 4	0,582 ^a
	Pioglitazona	40 ± 9	45 ± 10	0,175 ^a
	Variação (%)	15 ± 24	20 ± 27	0,425 ^a
LDL-C	Basal	133 ± 40	135 ± 45	0,888 ^a
	Pioglitazona	123 ± 28	140 ± 30	0,094 ^a
	Variação (%)	4 ± 35	20 ± 30	0,286 ^b
VLDL-C	Basal	28 ± 13	29 ± 13	0,645 ^b
	Pioglitazona	25 ± 12	27 ± 24	0,612 ^b
	Variação (%)	-8 ± 28	-3 ± 55	0,797 ^b
Glicemia	Basal	121 ± 22	122 ± 25	0,886 ^b
	Pioglitazona	107 ± 13	112 ± 17	0,366 ^b
	Variação (%)	-9 ± 16	-6 ± 11	0,366 ^a
Insulina	Basal	18 ± 11	14 ± 8	0,330 ^a
	Pioglitazona	12 ± 8	9 ± 6	0,519 ^b
	Variação (%)	-29 ± 39	-29 ± 24	0,955 ^a
Glicemia 120 min	Basal	194 ± 64	173 ± 61	0,406 ^a
	Pioglitazona	156 ± 42	157 ± 60	0,649 ^a
	Variação (%)	-13 ± 25	1 ± 44	0,318 ^a
Hb1Ac	Basal	7,1 ± 1,3	6 ± 0,3	0,025 ^a
	Pioglitazona	6,2 ± 0,4	5,8 ± 0,3	0,012 ^a
	Variação (%)	-9 ± 13	-2,2 ± 6	0,065 ^b
HOMA-IR	Basal	5,4 ± 3	3,7 ± 2	0,286 ^a
	Pioglitazona	3,1 ± 2,2	2,5 ± 1,7	0,387 ^a
	Variação (%)	-39 ± 40	-30 ± 23	0,775 ^a
HOMA-BETA	Basal	48 ± 36	39 ± 31	0,542 ^b

	Pioglitazona	35 ± 27	29 ± 24	0,597 ^a
	Variação (%)	-15 ± 61	-23 ± 26	0,788 ^b
Uréia	Basal	37 ± 12	30 ± 15	0,028 ^b
	Pioglitazona	42 ± 13	37 ± 11	0,081 ^b
	Variação (%)	24 ± 56	49 ± 87	0,326 ^b
Creatinina	Basal	1,02 ± 0,2	1,3 ± 1	0,130 ^b
	Pioglitazona	1,05 ± 0,2	0,9 ± 0,1	0,028 ^b
	Variação (%)	4 ± 13	- 8 ± 30	0,410 ^a
IMC	Basal	30 ± 4	30 ± 5	0,825 ^a
	Pioglitazona	31 ± 4	30 ± 5	0,964 ^a
	Variação (%)	1,9 ± 2,5	-0,4 ± 3,9	0,413 ^a
Adiponectina	Basal	27 ± 54	13 ± 5	0,865 ^b
	Pioglitazona	25 ± 21	29 ± 15	0,546 ^a
	Variação (%)	83 ± 100	135 ± 83	0,170 ^a
Resistina	Basal	2,5 ± 1,4	2 ± 0,9	0,304 ^a
	Pioglitazona	2 ± 0,8	1,9 ± 0,8	0,726 ^a
	Variação (%)	-10 ± 27	11 ± 79	0,942 ^b
Leptina	Basal	23 ± 22	17 ± 11	0,460 ^a
	Pioglitazona	19 ± 21	16 ± 10	0,890 ^b
	Variação (%)	-12 ± 35	8 ± 41	0,153 ^b

Nota: Número de indivíduos em parêntesis. Basal: sem tratamento; Pioglitazona: após tratamento com pioglitazona; %: % redução; A: aumento da expressão gênica após o tratamento; D: diminuição da expressão gênica após o tratamento; IMC: Índice de massa corpórea; Hb1Ac: hemoglobina glicada; HOMA-IR: Homeostasis model assessment (resistência à insulina); HOMA-beta: (função secretora da célula beta-pancreática); HDL-C: colesterol da lipoproteína de alta densidade; LDL-C: colesterol da lipoproteína de baixa densidade; VLDL-C: colesterol da lipoproteína de muito baixa densidade. Os resultados apresentados como média ± desvio-padrão e comparados por teste t de Student ^(a) e Mann Whitney ^(b).

Tabela 12. Valores médios e desvio padrão dos parâmetros bioquímicos antes e após tratamento com pioglitazona em pacientes do grupo DM2, de acordo com a variação da expressão gênica de *KIR6.2*.

Perfil lipídico (mg/dL)		A (21)	D (15)	P
CT	Basal	198 ± 33	191 ± 36	0,319 ^a
	Pioglitazona	192 ± 35	209 ± 35	0,651 ^a
	Variação (%)	-2 ± 10	10 ± 14	0,009 ^a
Triacilglicerol	Basal	146 ± 66	142 ± 62	0,819 ^b
	Pioglitazona	137 ± 14	128 ± 68	0,876 ^b
	Variação (%)	-5 ± 42	-7 ± 49	0,881 ^b
HDL-C	Basal	37 ± 8	36 ± 4	0,975 ^b
	Pioglitazona	41 ± 9	44 ± 9	0,418 ^b
	Variação (%)	14 ± 25	22 ± 26	0,385 ^a
LDL-C	Basal	137 ± 43	130 ± 48	0,434 ^a
	Pioglitazona	124 ± 29	140 ± 29	0,396 ^a
	Variação (%)	-4 ± 33	35 ± 110	0,026 ^b
VLDL-C	Basal	28 ± 13	29 ± 12	0,532 ^b
	Pioglitazona	27 ± 21	25 ± 13	0,626 ^a
	Variação (%)	-6 ± 41	-7 ± 41	0,956 ^a
Glicemia	Basal	121 ± 21	122 ± 25	0,493 ^b
	Pioglitazona	109 ± 15	107 ± 18	1,000 ^b
	Variação (%)	-8 ± 16	-10 ± 16	0,750 ^a
Insulina	Basal	16 ± 12	14 ± 7	0,979 ^a
	Pioglitazona	10 ± 8	10 ± 6	0,445 ^b
	Variação (%)	-29 ± 37	-29 ± 27	0,892 ^a
Glicemia 120 min	Basal	194 ± 69	172 ± 47	0,191 ^a
	Pioglitazona	162 ± 52	150 ± 43	0,291 ^a
	Variação (%)	- 7 ± 36	-8 ± 32	0,985 ^b
Hb1Ac	Basal	6,8 ± 1,2	6,4 ± 0,9	0,836 ^a
	Pioglitazona	6,1 ± 0,4	6 ± 0,3	0,583 ^a
	Variação (%)	-7 ± 12	-20 ± 40	0,775 ^a
HOMA-IR	Basal	4,8 ± 3,4	4,9 ± 2,5	0,407 ^a
	Pioglitazona	2,7 ± 2,1	2,9 ± 1,9	0,289 ^b
	Variação (%)	-38 ± 35	-36 ± 32	0,724 ^a
HOMA-BETA	Basal	47 ± 31	43 ± 20	0,645 ^b

	Pioglitazona	32 ± 28	33 ± 21	0,944 ^a
	Variação (%)	-17 ± 58	-24 ± 26	0,818 ^b
Uréia	Basal	35 ± 12	33 ± 14	0,721 ^a
	Pioglitazona	41 ± 13	39 ± 10	0,726 ^b
	Variação (%)	27 ± 56	43 ± 85	0,796 ^a
Creatinina	Basal	0,9 ± 0,2	1,3 ± 1,1	0,610 ^b
	Pioglitazona	1 ± 0,2	0,9 ± 0,2	0,279 ^b
	Variação (%)	4 ± 12	-9 ± 28	0,149 ^b
IMC	Basal	31 ± 5,7	31 ± 4	0,814 ^a
	Pioglitazona	31 ± 5,9	31 ± 4	0,836 ^a
	Variação (%)	0,7 ± 2,5	0,7 ± 3,8	0,989 ^a
Adiponectina	Basal	29 ± 55	11 ± 6	0,277 ^b
	Pioglitazona	31 ± 19	23 ± 17	0,315 ^a
	Variação (%)	103 ± 103	116 ± 89	0,749 ^a
Resistina	Basal	2,4 ± 1,3	1,9 ± 1	0,260 ^a
	Pioglitazona	2 ± 0,8	1,9 ± 0,8	0,917 ^a
	Variação (%)	-13 ± 26	15 ± 80	0,544 ^b
Leptina	Basal	23 ± 17	17 ± 17	0,231 ^b
	Pioglitazona	18 ± 14	17 ± 17	0,580 ^b
	Variação (%)	-10 ± 41	6 ± 37	0,214 ^a

Nota: Número de indivíduos em parêntesis. Basal: sem tratamento; Pioglitazona: após tratamento com pioglitazona; %: % redução; A: aumento da expressão gênica após o tratamento; D: diminuição da expressão gênica após o tratamento; IMC: Índice de massa corpórea; Hb1Ac: hemoglobina glicada; HOMA-IR: Homeostasis model assessment (resistência à insulina); HOMA-beta: (função secretora da célula beta-pancreática); HDL-C: colesterol da lipoproteína de alta densidade; LDL-C: colesterol da lipoproteína de baixa densidade; VLDL-C: colesterol da lipoproteína de muito baixa densidade. Os resultados apresentados como média ± desvio-padrão e comparados por teste t de Student ^(a) e Mann Whitney ^(b).

A análise de correlação entre os parâmetros bioquímicos e os valores de expressão de mRNA dos genes *PPAR γ* , *PPAR γ 2*, *SUR1* e *KIR6.2* normalizados com o controle endógeno *GAPD* do grupo DM2, antes do tratamento com pioglitazona, está representada conjuntamente na **Tabela 13**.

Observou-se correlações positivas entre os valores de expressão de mRNA dos genes *PPAR γ 2*, *SUR1* e *KIR 6.2*, com Colesterol LDL, (rs 0,511 p=0,001; rs 0,399 p=0,017 e rs 0,630 p=0,001), respectivamente. Essas correlações estão representadas na **Figura 9**, nos gráficos A, B e C, respectivamente. Em relação aos outros parâmetros, não houve correlações significativas.

Tabela 13. Análise da correlação entre expressão de *PPAR γ* , *PPAR γ 2*, *SUR1* e *KIR 6.2* em LTSP e os parâmetros bioquímicos, antes do tratamento com pioglitazona em indivíduos diabéticos tipo 2 (DM2).

Parâmetros	<i>PPARγ</i> n(36)	<i>PPARγ2</i> n(36)	<i>SUR1</i> n(36)	<i>KIR 6.2</i> n(36)
Glicemia (mg/dL)	-0,094 p=0,618	0,012 p=0,940	-0,076 p=0,648	-0,113 p=0,507
Glicemia 120 min. (mg/dL)	-0,140 p=0,490	0,022 p=0,904	-0,090 p=0,628	-0,082 p=0,654
Hb 1Ac (%)	-0,134 p=0,441	0,053 p=0,769	0,024 p=0,894	-0,189 p=0,289
Insulina (uUI/mL)	-0,006 p=0,976	0,065 p=0,739	0,232 p=0,232	0,143 p=0,465
IMC (Kg/m ²)	0,105 P=0,577	0,176 p=0,304	0,234 p=0,169	0,167 p=0,329
Homa –IR (%)	-0,020 p=0,926	-0,003 p=0,987	0,147 p=0,460	0,069 p=0,727
Homa –Beta (%)	-0,059 p=0,789	0,082 p=0,675	0,241 p=0,213	0,158 p=0,418
Colesterol Total (mg/dL)	0,285 P=0,133	-0,040 p=0,816	0,150 p=0,387	0,116 p=0,503
LDL-C (mg/dL)	0,173 p=0,365	0,511 p=0,001	0,399 p=0,017	0,630 p=0,001
HDL-C (mg/dL)	0,128	0,114	0,203	0,278

	p=0,496	p=0,504	p=0,233	p=0,099
VLDL-C (mg/dL)	-0,076	0,046	0,083	0,062
	p=0,688	p=0,787	p=0,625	p=0,715
Triglicérides (mg/dL)	-0,103	0,079	0,112	0,093
	p=0,587	p=0,645	p=0,513	p=0,586
Uréia (mg/dL)	0,033	Rs -0,075	-0,209	-0,184
	p=0,858	p=0,662	p=0,232	P=0,281
Creatinina (mg/dL)	0,199	-0,119	-0,251	-0,161
	p=0,289	p=0,489	p=0,139	P=0,346
Adiponectina (ug/mL)	0,223	0,083	-0,198	-0,0219
	p=0,292	p=0,671	p=0,310	p=0,910
Resistina (ng/mL)	-0,271	0,203	0,0781	0,105
	p=0,208	p=0,306	p=0,695	p=0,599
Leptina (ng/mL)	0,005	0,190	0,0733	0,0575
	p=0,979	p=0,328	p=0,708	p=0,769

Nota: Números de indivíduos em parênteses. IMC: Índice de massa corpórea; Hb1Ac: hemoglobina glicada; HOMA-IR: *Homeostasis model assessment* (resistência à insulina); HOMA-beta: (função secretora da célula beta-pancreática); HDL-C: colesterol da lipoproteína de alta densidade; LDL-C: colesterol da lipoproteína de baixa densidade; VLDL-C: colesterol da lipoproteína de muito baixa densidade. A significância da correlação foi calculada por coeficiente de correlação e Spearman (rs).

A Expressão basal de PPARG2

B Expressão basal de SUR

Figura 9. Análise de correlação entre expressão de mRNA ($\Delta Ct_{\text{pioglitazona}} - \Delta Ct_{\text{basal}}$) em LTSP de *PPARγ2* (A); *SUR1* (B); *KIR6.2* (C), com Colesterol LDL.

A análise de correlação entre os parâmetros bioquímicos e os valores de expressão de mRNA dos genes *PPARγ*, *PPARγ2*, *SUR1* e *KIR6.2* normalizados com o controle endógeno *GAPD* do grupo DM2, antes e após o tratamento com pioglitazona, está representada conjuntamente na **Tabela 14**.

Após o tratamento observou-se correlação negativa entre a variação da expressão gênica de *PPARγ2* e a variação de glicemia ($r_s -0,380$; $p=0,034$); com a variação de colesterol total ($r_s -0,369$; $p=0,048$); com a variação de LDL-C ($r_s -0,451$; $p=0,016$) e com a variação de HOMA-IR ($r_s -0,526$; $p=0,009$), essas correlações estão representadas na **Figura 10**, nos gráficos A, B, C e D, respectivamente. Em relação ao gene *PPARγ2*, resultou em correlação negativa com Colesterol Total ($r_s -0,394$; $p=0,019$), para o gene *SUR1*, resultou em uma correlação negativa com Hb1Ac ($r_s -0,379$; $p=0,032$). Dados demonstrados na **Figura 10**, nos gráficos E e F, respectivamente. Não houve correlação entre a variação da expressão gênica de *KIR6.2*, com a variação dos parâmetros bioquímicos após o tratamento.

Tabela 14. Análise da correlação entre expressão de *PPAR γ* , *PPAR γ 2*, *SUR1* e *KIR 6.2* em LTSP e os parâmetros bioquímicos, antes e após o tratamento com pioglitazona em indivíduos diabéticos tipo 2 (DM2).

Parâmetros	<i>PPARγ</i> n(36)	<i>PPARγ2</i> n(36)	<i>SUR1</i> n(36)	<i>KIR 6.2</i> n(36)
Glicemia (mg/dL)	0,051 p=0,783	-0,068 p=0,689	-0,380 p=0,022	-0,217 p=0,202
Glicemia 120 min. (mg/dL)	0,205 p=0,312	0,082 p=0,656	0,082 p=0,656	-0,149 p=0,421
Hb1Ac (%)	0,184 p=0,354	-0,226 p=0,211	-0,379 p=0,032	-0,293 p=0,102
Insulina (uUI/mL)	-0,562 p=0,006	-0,013 p=0,934	0,725 p=0,001	-0,265 p=0,170
IMC (Kg/m ²)	-0,172 p=0,360	0,066 p=0,696	0,000 p=0,996	0,129 p=0,451
Homa –IR (%)	-0,617 p=0,002	-0,027 p=0,886	-0,698 p<0,001	-0,315 p=0,102
Homa –Beta (%)	-0,616 p=0,002	-0,052 p=0,788	-0,498 p=0,046	-0,198 p=0,310
Colesterol Total (mg/dL)	0,395 p=0,034	-0,394 p=0,019	-0,255 p=0,139	-0,292 p=0,088
LDL-C (mg/dL)	0,018 p=0,924	-0,272 p=0,113	-0,125 p=0,470	-0,266 p=0,121
HDL-C (mg/dL)	0,128 p=0,496	-0,189 p=0,266	-0,090 p=0,598	-0,092 p=0,591
VLDL-C (mg/dL)	-0,040 p=0,831	0,067 p=0,693	-0,515 p=0,764	0,103 p=0,549
Triglicérides (mg/dL)	0,212 p=0,259	0,097 p=0,570	-0,036 p=0,832	0,117 p=0,493
Uréia (mg/dL)	-0,045 p=0,811	-0,038 p=0,822	-0,018 p=0,916	-0,061 p=0,721
Creatinina (mg/dL)	-0,212	-0,185	0,030	0,182

	p=0,910	p=0,279	p=0,860	p=0,286
Adiponectina (ug/mL)	0,107	-0,337	0,260	-0,326
	p=0,620	p=0,084	p=0,188	p=0,096
Resistina (ng/mL)	-0,223	-0,353	0,029	0,139
	p=0,301	p=0,070	p=0,880	p=0,485
Leptina (ng/mL)	0,162	-0,0695	-0,211	-0,181
	p=0,446	p=0,722	p=0,277	p=0,353

Nota: Números de indivíduos em parênteses. IMC: Índice de massa corpórea; Hb1Ac: hemoglobina glicada; HOMA-IR: *Homeostasis model assessment* (resistência à insulina); HOMA-beta: (função secretora da célula beta-pancreática); HDL-C: colesterol da lipoproteína de alta densidade; LDL-C: colesterol da lipoproteína de baixa densidade; VLDL-C: colesterol da lipoproteína de muito baixa densidade. A significância da correlação foi calculada por coeficiente de correlação de Spearman (rs).

C

D

Figura 8. Análise de correlação entre as variações da expressão de mRNA do *PPARγ*, *PPARγ2* e *SUR1* ($\Delta Ct_{\text{pioglitazona}} - \Delta Ct_{\text{basal}}$) em LTSP após o tratamento com pioglitazona. A: variação de *PPARγ* vs Insulina; B: variação de *PPARγ* vs Homa-IR; C: variação de *PPARγ* vs Homa-Beta; D: variação de *PPARγ* vs Colesterol Total; E: variação de *PPARγ2* vs Colesterol Total e F: variação de *SUR1* vs Hb1Ac. G: variação de *SUR1* vs insulina; H: variação de *SUR1* vs HOMA-IR e I: variação de *SUR1* vs HOMA-Beta.

4.3.1 Resultados de efeitos do polimorfismo Pro12Ala 34C>G sobre expressão gênica do *PPAR γ* e *PPAR γ 2* em LTSP

As expressões de mRNA do *PPAR γ* e *PPAR γ 2* em LTSP, nas diferentes fases de medicação são apresentadas nas **Tabelas 15 e 16**, respectivamente. Não foram encontradas diferenças de expressão basal de mRNA de *PPAR γ* , de acordo com os genótipos CC e CG+GG ($p > 0,05$), também não foram encontradas diferença na expressão basal e após tratamento com pioglitazona ($p > 0,05$). O mesmo ocorreu para a análise da expressão de mRNA do *PPAR γ 2* (**Tabela 16**).

Tabela 15. Influência do polimorfismo Pro12Ala 34C>G na expressão de mRNA do *PPAR γ* em LTSP em indivíduos diabéticos melito do tipo 2 (DM2), antes e após o tratamento com pioglitazona.

	CC (31)	CG+GG (5)	<i>p</i> (CC vs. CG/GG)
Basal ($2^{-\Delta Ct}$)	0,003844 (0,0004312- 0,02173)	0,002944 (0,001331- 0,01496)	0,947 ^d
Pioglitazona ($2^{-\Delta Ct}$)	0,004753 (0,0005481- 0,02208)	0,005292 (0,0005102- 0,01291)	0,641 ^a
<i>p</i>	0,235 ^c	0,873 ^b	

Nota: Número de indivíduos em parênteses. ΔCt : CT do gene alvo – Ct GAPD da amostra. Valores são apresentados como mediana (25%-75%) dos dados. Os resultados foram comparados por teste-*t* de student teste-*t*^(a); teste-*t* pareado^(b); Wilcoxon Signed Rank Test^(c) e Mann-Whitney^(d).

Tabela 16. Influência do polimorfismo Pro12Ala 34C>G na expressão de mRNA do *PPAR γ 2* em LTSP em indivíduos diabéticos melito do tipo 2 (DM2), antes e após o tratamento com pioglitazona.

	CC (31)	CG+GG (5)	p (CC vs. CG/GG)
Basal ($2^{-\Delta Ct}$)	0,001257 (0,0006876- 0,001895)	0,001141 (0,0007415- 0,001555)	0,629 ^d
Pioglitazona ($2^{-\Delta Ct}$)	0,001626 (0,001063- 0,003424)	0,001044 (0,0005938- 0,003223)	0,724 ^a
p	0,722 ^c	0,334 ^b	

Nota: Número de indivíduos em parênteses. ΔCt : CT do gene alvo – Ct GAPD da amostra. Valores são apresentados como mediana (25%-75%) dos dados. Os resultados foram comparados por teste-t de student teste- $t^{(a)}$; teste-t pareado $t^{(b)}$; Wilcoxon Signed Rank Test $t^{(c)}$ e Mann-Whitney $t^{(d)}$.

4.3.2 Resultados de efeitos do polimorfismo C161T sobre expressão gênica do *PPAR γ* e *PPAR γ 2* em LTSP.

Com relação ao polimorfismo C161T, a expressão basal de mRNA do *PPAR γ* e *PPAR γ 2* em LTSP foram similares entre os genótipos CC e CT do grupo DM2 ($p > 0,05$) (**Tabelas 17 e 18**). Após tratamento com pioglitazona, não foram encontradas diferenças da expressão de mRNA de *PPAR γ* , mas em relação a expressão gênica de *PPAR γ 2*, nos pacientes portadores do genótipo CC, houve uma elevação da expressão ($p=0,019$).

Tabela 17. Influência do polimorfismo C161T na expressão de mRNA do *PPAR γ* em LTSP em indivíduos diabéticos melito do tipo 2 (DM2), antes e após o tratamento com pioglitazona.

	CC (11)	CT (25)	p (CC vs. CT)
Basal ($2^{-\Delta Ct}$)	0.001408 (0,0006928- 0,001861)	0,0008608 (0,0005429- 0,001560)	0,219 ^b
Pioglitazona ($2^{-\Delta Ct}$)	0,001535 (0,0009751- 0,003243)	0,001179 (0,0005303- 0,003412)	0,634 ^b
p	0,862 ^C	0,465 ^c	

Nota: Número de indivíduos em parênteses. ΔCt : CT do gene alvo – Ct GAPD da amostra. Valores são apresentados como mediana (25%-75%) dos dados. Os resultados foram comparados por teste-t de student teste- $t^{(a)}$; teste- t pareado ^(b); Wilcoxon Signed Rank Test ^(c) e Mann-Whitney ^(d).

Tabela 18. Influência do polimorfismo C161T na expressão de mRNA do *PPAR γ 2* em LTSP em indivíduos diabéticos melitos do tipo 2 (DM2), antes e após o tratamento com pioglitazona.

	CC (11)	CT (25)	p (CC vs. CT)
Basal ($2^{-\Delta Ct}$)	0,001558 (0,0004085- 0,01279)	0,006355 (0,003088- 0,02517)	0,157 ^d
Pioglitazona ($2^{-\Delta Ct}$)	0,005292 (0,0006092- 0,02187)	0,005888 (0,0006265- 0,01929)	0,878 ^a
p	0,019 ^C	0,141 ^c	

Nota: Número de indivíduos em parênteses. ΔCt : CT do gene alvo – Ct GAPD da amostra. Valores são apresentados como mediana (25%-75%) dos dados. Os resultados foram comparados por teste-t de student teste- $t^{(a)}$; teste- t pareado ^(b); Wilcoxon Signed Rank Test ^(c) e Mann-Whitney ^(d).

4.4 Resultados da expressão gênica em Tecido Adiposo.

As expressões dos genes *PPAR γ* , *PPAR γ 2*, *SUR1* e *KIR6.2* em tecido adiposo foram analisadas em 36 indivíduos que concluíram o tratamento de 16 semanas e em 16 indivíduos para o grupo controle.

Os valores de Ct obtidos nesses ensaios foram utilizados para o cálculo da expressão relativa de mRNA de cada gene alvo em relação à do *GAPD* (controle endógeno). Essa relação é denominada Delta Ct (ΔCt). Os dados de ΔCt foram transformados em escala logarítmica ($2^{\Delta Ct}$) para comparar dados de expressão entre as fases de tratamento farmacológico. A expressão é interpretada pelo seu aumento ou diminuição após o tratamento.

A **Figura 11** ilustra a variação de expressão gênica normalizada, transformada em escala logarítmica em LTSP do grupo DM2 antes (box pretos) e após (box brancos) o tratamento com pioglitazona.

Figura 11. Box plots de valores de expressão normalizada dos genes *PPAR γ* , *PPAR γ 2*, *SUR1* e *KIR6.2* em LTSP, antes e após o tratamento com pioglitazona. Os Box plots mostram a mediana, distância interquartilica e os valores extremos (círculos).

Na **Tabela 19** são apresentados os valores medianos e os intervalos (25 e 75%) de expressão do mRNA dos genes *PPAR γ* , *PPAR γ 2*, *SUR1* e *KIR6.2* em Tecido Adiposo no grupo DM2 basal (pré-tratamento) e grupo controle. Observou-se que a expressão de *PPAR γ* e *PPAR γ 2* no grupo DM2 estão diminuídas em comparação ao grupo controle ($p=0,023$ e $p=0,031$), respectivamente. Para demais genes não houve diferenças estatisticamente significantes entre o grupo DM2 (pré-tratamento) e o grupo controle. Observou-se que os genes *SUR1* e *KIR6.2* são menos expressos que os genes *PPAR γ* e *PPAR γ 2*, no período basal.

Tabela 19. Valor de expressão basal de *PPAR γ* , *PPAR γ 2*, *SUR1*, e *KIR6.2*, comparados aos valores do grupo controle em LTSP.

Genes	DM2 ($2^{-\Delta Ct}$) (36)	Controle ($2^{-\Delta Ct}$) (16)	P
<i>PPARγ</i>	0,423372 (0,333440-0,54413)	0,5586000 (0,509100-0,628500)	0,023 ^a
<i>PPARγ2</i>	0,357062 (0,24275-0,69313)	0,627085 (0,45849-0,77062)	0,031 ^a
<i>SUR1</i>	0,005815 (0,0020482-0,0106740)	0,00468414 (0,00111017-0,0089804)	0,434 ^a
<i>KIR6.2</i>	0,00249679 (0,0018153-0,0058105)	0,00344566 (0,0022575-0,00495808)	0,572 ^a
P	$p < 0,001$ ^b	$p < 0,001$ ^b	

Nota: Número de indivíduos em parênteses. ΔCt : CT do gene alvo – Ct GAPD da amostra. Os resultados apresentados como média $\pm$ desvio-padrão e comparados por: Mann-Whitney Rank Sun Test^(a) e One-Way ANOVA (Dunn's Method)^(b)

Na **Tabela 20** são apresentados os valores medianos e os intervalos (25 e 75%) de expressão do mRNA dos genes *PPAR γ* , *PPAR γ 2*, *SUR1* e *KIR6.2* em Tecido Adiposo no grupo DM2 basa, basal e após tratamento com pioglitazona.

Tabela 20. Variação da expressão de mRNA dos genes *PPAR γ* , *PPAR γ 2*, *SUR1*, e *KIR6.2* em tecido adiposo em diabéticos melito tipo 2 (DM2) tratados com pioglitazona (15, 30, 45, 45 mg/dia/16 semanas).

Genes	Basal ($2^{-\Delta Ct}$) n (31)	Pioglitazona ($2^{-\Delta Ct}$)	P
<i>PPARγ</i>	0,423372 (0,333440-0,54413)	0,620119 (0,422571-1,006121)	0,024 ^a
<i>PPARγ2</i>	0,357062 (0,24275-0,69313)	0,3955000 (0,323310-0,787750)	0,076 ^a
<i>SUR1</i>	0,005815 (0,0020482-0,0106740)	0,0064656 (0,0032458-0,0102675)	0,531 ^a
<i>KIR6.2</i>	0,00249679 (0,0018153-0,0058105)	0,00472486 (0,00345706-0,0085516)	0,096 ^a
P	p < 0,001 ^b	p=0,114 ^b	

Nota: Número de indivíduos em parênteses. ΔCt : CT do gene alvo – Ct GAPD da amostra. Valores de expressão apresentados como mediana (25%-75%). Os resultados foram comparados por Wilcoxon Signed Rank Test ^(a) e One-Way ANOVA (Dunn's Method) ^(b)

A análise de correlação entre os valores de expressão de mRNA dos genes *PPAR γ* , *PPAR γ 2*, *SUR1*, e *KIR6.2*, normalizados com o controle endógeno *GAPD* do grupo DM2, no Tecido Adiposo, após o tratamento com pioglitazona ($\Delta Ct_{\text{pioglitazona}}$ ($\Delta Ct_{\text{gene}} - \Delta Ct_{\text{GAPD}}$) - ΔCt_{basal} ($\Delta Ct_{\text{gene}} - \Delta Ct_{\text{GAPD}}$)) está representada na **Figura 12**.

Houve correlação positiva significativa da expressão de mRNA entre os genes *PPAR γ* e *PPARG* ($r=0,7463$, $p < 0,0001$); *KIR 6.2* e *PPAR γ* ($r=0,4433$, $p=0,016$). As correlações encontradas sugerem que a pioglitazona regula a expressão desses genes, no tecido adiposo, simultaneamente nos indivíduos DM2.

Figura 12. Análise de correlação entre as variações da expressão de mRNA ($\Delta Ct_{\text{pioglitazona}} - \Delta Ct_{\text{basal}}$) em tecido adiposo após o tratamento com pioglitazona. A: Correlação entre o mRNA de PPAR γ e PPAR γ 2; B: Correlação entre o mRNA de PPAR γ 2 e SUR1; C: Correlação entre PPAR γ e KIR6.2; D: Correlação entre o mRNA de PPAR γ 2 e SUR1; E: Correlação entre o mRNA de PPAR γ 2 e KIR6.2 e F: Correlação entre o mRNA de SUR1 e KIR6.2

No grupo DM2, verificou-se que alguns pacientes apresentaram aumento de expressão gênica em LTSP enquanto outros tiveram diminuição após o tratamento com pioglitazona (**Figura 13**). Em razão dessa variabilidade na expressão gênica, os dados foram separados em dois grupos, A e D para cada gene, onde A corresponde ao grupo com a expressão aumentada e D com a expressão diminuída após o tratamento.

Observou-se que nos genes PPAR γ , PPAR γ 2, SUR1 e KIR6.2, além da diferença encontrada na expressão de mRNA após o tratamento com a pioglitazona nos grupos A e D, também observou-se diferença de expressão basal entre os grupos A e D. Esse dado sugere que a expressão basal do grupo D são maiores que os de expressão basal do grupo A. O mesmo fenômeno ocorreu com os de expressão após o tratamento com a pioglitazona.

Figura 13. Valores de expressão de mRNA de *PPAR γ* , *PPAR γ 2*, *SUR1* e *KIR6.2* em tecido adiposo antes e após o tratamento com pioglitazona. Dados comparados por Wilcoxon Signed Rank Test. A: aumento da expressão induzida pela pioglitazona; D diminuição da expressão induzida pela pioglitazona.

A análise de correlação entre os parâmetros bioquímicos basais e os valores basais de expressão de mRNA dos genes *PPAR γ* , *PPAR γ 2*, *SUR1* e *KIR6.2* normalizados com o controle endógeno *GAPD* do grupo DM2, antes e após o tratamento com pioglitazona, no tecido adiposo, está representada conjuntamente na **Tabela 21**.

Observou-se uma correlação positiva entre os valores basais Triacilglicerol e a expressão de mRNA do gene *PPAR γ* (rs 0,0408; p=0,046). Correlação positiva foi encontrada correlação positiva entre a expressão basal de mRNA de *PPAR γ 2* e resistina (p=0,028; p=0,457). Em relação a expressão de mRNA do gene *SUR1*, foi observada uma correlação negativa com os valores de IMC (rs -0,474; p=0,008), essas correlações estão representadas na **Figura 14**, nos gráficos A e B, respectivamente.

Tabela 21. Análise da correlação entre expressão basal de *PPAR γ* , *PPAR γ 2*, *SUR1* e *KIR6.2* em Tecido Adiposo e de parâmetros bioquímicos basais em indivíduos diabéticos melito tipo 2 (DM2).

Parâmetros	<i>PPARγ</i> n (36)	<i>PPARγ2</i> n (36)	<i>SUR1</i> n (36)	<i>KIR6.2</i> n (36)
Glicemia	-0,0522 p=0,771	0,0220 p=0,907	-0,0494 p=0,792	-0,326 p=0,083
Glicemia 120 min	-0,0059 p=0,975	-0,266 p=0,178	0,365 p=0,066	0,303 p=0,753
Hb1Ac	0,159 p=0,406	0,395 p=0,041	-0,376 p=0,0764	-0,0117 p=0,952
Colesterol Total	-0,305 p=0,089	-0,229 p=0,228	0,0739 p=0,695	0,296 p=0,125
LDL-C	-0,0563 p=0,757	-0,190 p=0,321	0,181 p=0,181	0,171 p=0,380
HDL-C	-0,096 p=0,593	0,208 p=0,268	0,0498 p=0,792	0,153 p=0,424
VLDL-C	0,0278 p=0,877	0,0881 p=0,641	-0,112 p=0,551	0,153 p=0,176
Triacilglicerol	0,0408 p=0,040	-0,0476 p=0,800	-0,236 p=0,242	0,357 p=0,174
Insulina	-0,188 p=0,355	-0,0696 p=0,743	-0,376 p=0,076	0,173 p=0,453
HOMA-IR	-0,199 p=0,325	-0,163 p=0,443	-0,340 p= 0,111	-0,305 p=0,164
HOMA-Beta	-0,208 p=0,304	0,0626 p=0,768	-0,379 p=0,073	0,125 p=0,575
IMC	-0,0705 p=0,694	0,132 p=0,484	-0,474 p=0,008	0,303 p=0,108
Adiponectina	0,364 p=0,079	0,310 p=0,168	0,307 p=0,211	0,0226 p=0,921
Resistina	0,369 p=0,068	0,457 p=0,028	0,429 p=0,058	-0,185 p=0,406
Leptina	-0,020 p=0,919	0,0652 p=0,764	0,0632 p=0,787	-0,322 p=0,141

Nota: número de Números de indivíduos em parênteses. IMC: Índice de massa corpórea; Hb1Ac: hemoglobina glicada; HOMA-IR: Homeostasis model assessment (resistência à insulina); HOMA-beta: (função secretora da célula beta-pancreática); HDL-C: colesterol da lipoproteína de alta densidade; LDL-C: colesterol da lipoproteína de baixa densidade; VLDL-C: colesterol da lipoproteína de muito baixa densidade. A significância da correlação foi calculada por coeficiente de correlação de Spearman (rs).

Figura 14. Análise de correlação entre as expressões de mRNA *PPARγ*2 (A e C) e *SUR1* (B) ($\Delta Ct_{\text{pioglitazona}} - \Delta Ct_{\text{basal}}$) em Tecido Adiposo antes do tratamento com pioglitazona. A: Correlação com triacilglicerol basal. B: Correlação com IMC basal. C: Correlação com Resistina basal.

A análise de correlação entre os parâmetros bioquímicos e valores de expressão de mRNA antes e após tratamento com pioglitazona, dos genes *PPAR γ* , *PPAR γ 2*, *SUR1* e *KIR6.2* normalizados com o controle endógeno *GAPD* do grupo DM2, no tecido adiposo, está representada conjuntamente na **Tabela 22**.

Observou-se uma correlação positiva entre os valores de expressão de mRNA do gene *KIR6.2* com Glicemia 2h após 75g de dextrose (rs 0,462; p=0,030), também foi observada uma correlação negativa entre variação de expressão de mRNA de *PPAR γ 2* com a variação de resistina (p=-0,450; p=0,031). Essas correlações estão representadas na **Figura 15**. Em relação aos outros parâmetros, não foi encontrado nenhum outro dado significativo.

Tabela 22. Análise da correlação entre expressão de *PPAR γ* , *PPAR γ 2*, *SUR1* e *KIR6.2* em Tecido Adiposo e da variação dos parâmetros bioquímicos, antes e após tratamento com pioglitazona em indivíduos diabéticos melito tipo 2 (DM2).

Parâmetros	<i>PPARγ</i> n (31)	<i>PPARγ2</i> n (31)	<i>SUR1</i> n (31)	<i>KIR6.2</i> n (31)
Glicemia	-0,0704 p=0,669	0,0109 p=0,953	-0,0989 p=0,620	0,359 p=0,071
Glicemia 120 min	-0,105 p=0,593	0,189 p=0,341	-0,0078 p=0,969	0,462 p=0,030
Hb1Ac	0,378 p=0,487	0,125 p=0,752	0,384 p=0,063	0,395 p=0,855
Colesterol Total	-0,210 p=0,254	0,238 p=0,238	-0,141 p=0,479	-0,0797 p=0,659
LDL-C	-0,0488 p=0,789	0,0650 p=0,730	-0,189 p=0,341	0,240 p=0,234
HDL-C	0,0660 p=0,717	0,0794 p=0,674	-0,166 p=0,404	-0,110 p=0,587
VLDL-C	0,103 p=0,571	0,0532 p=0,778	0,0815 p=0,682	-0,0041 p=0,981
Triacilglicerol	0,310 p=0,101	-0,294 p=0,135	0,111 p=0,580	0,359 p=0,859
Insulina	-0,109 p=0,555	0,140 p=0,510	-0,260 p=251	0,186 p=0,439
HOMA-IR	-0,163 p=0,432	0,170 p=0,421	-0,314 p= 0,162	0,232 p=0,327
HOMA-Beta	-0,106 p=0,610	0,112 p=0,597	0,300 p=0,183	-0,0105 p=0,963
IMC	-0,0751 p=0,680	0,0594 p=0,753	-0,0263 p=0,895	0,205 p=0,312
Adiponectina	-0,0618 0,771	-0,0929 p=0,682	-0,0196 p=0,934	-0,112 p=0,672
Resistina	0,0992 p=0,633	-0,450 p=0,031	0,305 p=0,187	-0,0691 p=0,780
Leptina	0,262 p=0,202	0,6682 p=0,753	0,0571 p=0,867	0,296 p=0,277

Nota: número de Números de indivíduos em parênteses. IMC: Índice de massa corpórea; Hb1Ac: hemoglobina glicada; HOMA-IR: Homeostasis model assessment (resistência à insulina); HOMA-beta: (função secretora da célula beta-pancreática); HDL-C: colesterol da lipoproteína de alta densidade; LDL-C: colesterol da lipoproteína de baixa densidade; VLDL-C: colesterol da lipoproteína de muito baixa densidade. A significância da correlação foi calculada por coeficiente de correlação de Spearman (rs).

Figura 15. Análise de correlação entre a variação de expressão de mRNA *KIR6.2* ($\Delta Ct_{\text{pioglitazona}} - \Delta Ct_{\text{basal}}$) em Tecido Adiposo antes e após o tratamento com pioglitazona vs variação da glicemia, 2h após 75g de dextrose.

4.5.1 Resultados de efeitos do polimorfismo Pro12Ala 34C>G sobre expressão gênica do *PPAR γ* e *PPAR γ 2* em Tecido Adiposo

Em relação ao polimorfismo Pro12Ala, nos pacientes portadores do genótipo CC, estes resultaram em maior expressão do gene *PPAR γ* , após o tratamento ($p=0,008$). Não foi observada diferença de expressões basais entre os genótipos CC vs CG/GG, e também entres as expressões após tratamento de pioglitazona por 16 semanas, dados demonstrados na **Tabela 23**.

Nos valores resultados da expressão gênica de *PPAR γ 2*, nos pacientes portadores do genótipo CC, estes resultaram em maior expressão do gene *PPAR γ 2*,

após o tratamento ($p=0,008$). Também foi observado que os pacientes portadores do genótipo CC, possuem menor expressão basal do gene *PPAR γ 2*, comparados a expressão basal dos pacientes com genótipos CG/GG ($p=0,031$) (**Tabela 24**).

Tabela 23. Influência do polimorfismo Pro12Ala 34C>G na expressão de mRNA do *PPAR γ* em tecido adiposo em indivíduos diabéticos melito do tipo 2 (DM2), antes e após o tratamento com pioglitazona.

	CC (31)	CG+GG (5)	p (CC vs. CG/GG)
Basal ($2^{-\Delta Ct}$)	0,4159 (0,3346-0,5318)	1,060 (0,1608-1,880)	0,303 ^d
Pioglitazona ($2^{-\Delta Ct}$)	0,6281 (0,4368-1,011)	0,6439 (0,3192-2,805)	0,436 ^d
p	0,008 ^b	0,403 ^b	

Nota: Número de indivíduos em parênteses. ΔCt : CT do gene alvo – Ct GAPD da amostra. Valores são apresentados como mediana (25%-75%) dos dados. Os resultados foram comparados por teste-t de student teste- $t^{(a)}$; teste- t pareado ^(b); Wilcoxon Signed Rank Test ^(c) e Mann-Whitney ^(d).

Tabela 24. Influência do polimorfismo Pro12Ala 34C>G na expressão de mRNA do *PPAR* γ 2 em tecido adiposo em indivíduos diabéticos melito do tipo 2 (DM2), antes e após o tratamento com pioglitazona.

	CC	CG+GG	p
	(31)	(5)	(CC vs. CG/GG)
Basal ($2^{-\Delta Ct}$)	0,3266 (0,283-0,695)	0,6004 (0,3198-2,184)	0,031 ^d
Pioglitazona ($2^{-\Delta Ct}$)	0,4073 (0,3340-0,8740)	0,5118 (0,2870-0,7142)	0,837 ^d
p	0,008 ^c	0,287 ^b	

Nota: Número de indivíduos em parênteses. ΔCt : CT do gene alvo – Ct GAPD da amostra. Valores são apresentados como mediana (25%-75%) dos dados. Os resultados foram comparados por teste-t de student teste- $t^{(a)}$; teste-t pareado $^{(b)}$; Wilcoxon Signed Rank Test $^{(c)}$ e Mann-Whitney $^{(d)}$.

4.5.2 Resultados de efeitos do polimorfismo C161T sobre expressão gênica do *PPAR* γ e *PPAR* γ 2 em Tecido Adiposo

Com relação ao polimorfismo C161T, a expressão basal de mRNA do *PPAR* γ e *PPAR* γ 2 em LTSP foram similares entre os genótipos CC e CT do grupo DM2 ($p > 0,05$) (**Tabelas 25 e 26**). Após tratamento com pioglitazona, não foram encontradas diferenças da expressão de mRNA de *PPAR* γ e *PPAR* γ 2 em LTSP, de acordo com os genótipos ($p > 0,05$).

Tabela 25. Influência do polimorfismo C161T na expressão de mRNA do *PPAR γ* em LTSP em indivíduos diabéticos melito do tipo 2 (DM2), antes e após o tratamento com pioglitazona.

	CC (11)	CT (25)	p (CC vs. CT)
Basal ($2^{-\Delta Ct}$)	0,3477 (0,2981-0,5475)	0,4542 (0,3468-0,5656)	0,349 ^d
Pioglitazona ($2^{-\Delta Ct}$)	0,6893 (0,5804-1,011)	0,5826 (0,4018-1,029)	0,360 ^d
p	0,054 ^b	0,194 ^c	

Nota: Número de indivíduos em parênteses. ΔCt : CT do gene alvo – Ct GAPD da amostra. Valores são apresentados como mediana (25%-75%) dos dados. Os resultados foram comparados por teste-t de student teste- $t^{(a)}$; teste-t pareado ^(b); Wilcoxon Signed Rank Test ^(c) e Mann-Whitney ^(d).

Tabela 26. Influência do polimorfismo C161T na expressão de mRNA do *PPAR γ 2* em LTSP em indivíduos diabéticos melitos do tipo 2 (DM2), antes e após o tratamento com pioglitazona.

	CC (11)	CT (25)	p (CC vs. CT)
Basal ($2^{-\Delta Ct}$)	0,2683 (0,2281-0,6004)	0,2593 (0,3456-0,6950)	0,526 ^d
Pioglitazona ($2^{-\Delta Ct}$)	0,4324 (0,3140-0,7143)	0,3797 (0,2951-0,8718)	0,564 ^a
p	0,188 ^b	0,251 ^c	

Nota: Número de indivíduos em parênteses. ΔCt : CT do gene alvo – Ct GAPD da amostra. Valores são apresentados como mediana (25%-75%) dos dados. Os resultados foram comparados por teste-t de student teste- $t^{(a)}$; teste-t pareado ^(b); Wilcoxon Signed Rank Test ^(c) e Mann-Whitney ^(d).

5 DISCUSSÃO

Pioglitazona, medicamento utilizado no tratamento do DM2, causa aumento da sensibilidade à insulina, melhora a função das células beta, apresenta efeitos favoráveis nas dislipidemias, melhorando a função cardiovascular. Shand e colaboradores (2007) demonstraram em seus estudos que os pacientes tratados com pioglitazona 45 mg durante seis meses tiveram valores de glicemia diminuídos e perfil lipídico melhorado com o aumento de HDL. Esses achados foram confirmados no presente estudo, observando-se redução significativa nos valores de glicemia de jejum, de glicemia de 120 min após sobrecarga de 75g glicose, Hb1Ac e aumento de HDL-C, nos indivíduos tratados com pioglitazona.

A eficácia da pioglitazona no tratamento de DM2 tem sido investigada em estudos de até 2,5 anos de duração. Os estudos avaliaram a eficácia da monoterapia com pioglitazona ou em terapia combinada em comparação ao placebo ou outro medicamento, sendo o *PROactive* (Estudo Clínico Prospectivo da Pioglitazona em Eventos Macrovasculares), o maior estudo já realizado com pioglitazona, avaliando seu efeito sobre a prevenção secundária de eventos macrovasculares em pacientes diabéticos tipo 2, que receberam pioglitazona em adição a outros medicamentos redutores da glicose e outras medicações por 2,5 anos. O amplo estudo, concluiu que a pioglitazona é geralmente bem tolerada e resulta em ganho de peso, em nosso estudo o IMC não se alterou, podendo ser devido ao curto período de tratamento, de quatro meses. (DORMANDY *et al.*, 2005).

Em três grandes estudos multicêntricos randomizados, duplo-cegos controlados com placebo de 12-16 semanas de duração em pacientes DM2 tratados e/ou virgens de tratamento, a pioglitazona reduziu valores de Hb1Ac, de uma forma significativamente maior do que o placebo, com exceção da fase com posologia de 15 mg/dia em um dos estudos. Após o tratamento de 16 semanas com pioglitazona em nosso estudo, reduziu-se o valor de Hb1Ac em 25%. De forma semelhante, as reduções a partir do período basal nas concentrações de glicose plasmática de jejum foram significativamente maiores nos que receberam pioglitazona do que naqueles com placebo em todas as dosagens (HERZ *et al.*, 2003; ROSENBLATT *et al.*, 2001; SCHERBAUM & GOKE, 2002).

Adiponectina é a mais abundante adipoquina plasmática, com potente ação sensibilizadora sobre a insulina e propriedades antiaterogênicas. Em seres humanos, concentrações de adiponectina estão diminuídas em pacientes com diabetes, síndrome metabólica, doença arterial coronariana e hipertensos. Baixa concentração de adiponectina resulta no desenvolvimento de resistência a insulina e acarreta efeitos diretos sobre a parede vascular (BARAC *et al.*, 2008). Em nosso estudo, após o tratamento de 16 semanas de pioglitazona, houve aumento da concentração plasmática de adiponectina, estudo de Sharma e colaboradores (2006) utilizando a pioglitazona em pacientes DM2 por 16 semanas, também resultaram em aumento de sua concentração. O mesmo resultado também foi observado no estudo de IKEDA e colaboradores (2008), mas por período de apenas 14 dias de tratamento de pioglitazona, tempo suficiente para que a concentração de adiponectina aumentasse com o tratamento.

O mecanismo correto de ação de *PPAR γ* na regulação da adiponectina *in vivo* está em debate. Conclusões podem ser explicadas por estudos *in vitro*, onde células adiposas (3T3-L1), incubadas com diferentes tiazolidinedionas e concentrações, incluindo a pioglitazona. Esses medicamentos agem diretamente na regulação do promotor do gene da adiponectina, aumentando a expressão de mRNA e conseqüentemente aumento da secreção (BARAC *et al.*, 2008).

Constataram-se também os efeitos dessa medicação na melhora do perfil lipídico. Em nosso estudo, os indivíduos controles resultaram em valores da HDL-C maiores em relação ao grupo DM2 sem tratamento, entretanto esses pacientes aumentaram os valores de HDL-C após o tratamento com pioglitazona. Esses resultados foram semelhantes à de outros estudos, que demonstraram aumento de HDL-C, em 15 a 28%, após tratamento com pioglitazona (PFÜTZNER *et al.*, 2005; GOLDBERG *et al.*, 2005).

Ao analisar as características biodemográficas dos indivíduos DM2 e controles, em relação ao sexo, no grupo DM2 foi observada uma prevalência do sexo masculino, dados contrários foram encontrados no grupo controle, no qual a presença do sexo feminino foi superior. Em relação à obesidade, o grupo DM2 possui maior proporção de não obesos, mas analisando conjuntamente com IMC, este apresenta valores médios acima de 30 kg/m², evidenciando a presença de obesos no grupo estudado.

Também foi observado que o Índice HOMA-IR está aumentado no grupo DM2 antes do tratamento com pioglitazona em relação ao grupo controle e que após o tratamento o índice HOMA-IR, HOMA-Beta e insulina diminuíram no grupo DM2. Wallace e colaboradores (2004) demonstraram em seu estudo de

12 semanas de tratamento com pioglitazona uma melhora em relação ao período sem tratamento, na função das células beta (HOMA-Beta) e na sensibilidade à insulina (HOMA-IR), que foram significativamente maiores na monoterapia com pioglitazona do que com placebo. Assim, comprovando a eficiência da pioglitazona em diminuir a resistência à insulina, com melhora na função secretora das células β pancreática (OLIVEIRA *et al*, 2005).

A terapia com pioglitazona pode reduzir o estresse da célula beta e prevenir a deterioração de sua função (CAMPBELL & MARIZ, 2006). Essas melhoras na função da célula beta podem resultar diretamente da ativação do $PPAR\gamma$ presentes nas células beta e/ou, indiretamente, por meio de diminuições na lipotoxicidade e reduções no estresse da célula beta associado com a resistência à insulina reduzida (WALTER & LUBBEN, 2005).

Neste trabalho, a expressão dos genes *PPAR γ* e *SUR1* foi maior em diabéticos melito do tipo 2 do que nos normoglicêmicos, em LTSP. Para os genes *PPAR γ 2* e *KIR6.2* a expressão foi menor em relação aos controles, em LTSP.

Tanaka e colaboradores (2005) evidenciaram que a pioglitazona, regula positivamente a expressão de *PPAR γ* , em cultura de monócitos, que resultou na inibição da proliferação celular, devido ao aumento de expressão de *PPAR γ* . Em nosso estudo, o tratamento com pioglitazona, aumentou a expressão de *PPAR γ* . Entretanto, é importante considerar que o trabalho de Tanaka e colaboradores (2005) utilizaram somente monócitos para a análise e sua metodologia foi diferente, utilizando RT-PCR convencional.

Adamiec e colaboradores (2007), em seus estudos, concluíram que a administração de rosiglitazona por 22 semanas, não alterou a expressão de *PPAR γ* .

Os resultados são diferentes, no entanto, esses dados não contradizem totalmente ao do presente trabalho, pois foi utilizado outro medicamento e as células utilizadas foram monócitos de sangue periférico.

No presente estudo verificou-se que alguns indivíduos DM2 apresentaram aumento, enquanto outros resultaram em redução da expressão de mRNA de *PPAR γ* e *PPAR γ 2* em leucócitos totais de sangue periférico após tratamento com pioglitazona. *PPAR γ* , por ser um fator de transcrição, regulando inúmeros outros genes e também sendo regulado por ácidos graxos e derivado, incluindo uma variedade de eicosanóides e prostaglandinas têm sido identificados como ligantes para os PPARs, tendo também sido demonstrado serem alvos para numerosas classes de compostos sintéticos, utilizados no tratamento do diabetes e dislipidemias (GELMAN et al., 2007).

Portanto, o conhecimento dos mecanismos moleculares e fisiológicos destes receptores torna-se extremamente importante no desenvolvimento e na utilização do fármaco para o tratamento de doenças metabólicas. Ainda não se sabe a razão pelas quais os pacientes que receberam pioglitazona, por 16 semanas, resultaram em padrões diferentes de expressão em leucócitos totais de sangue periférico.

A frequência relativa do alelo G do polimorfismo Pro12Ala 34C>G em nosso estudo, não foi similar entre os indivíduos DM2 (0,07) e controles (0), em relação à frequência no grupo DM2, está foi semelhante a outro estudo brasileiro, que resultou em uma frequência relativa de 0,09 do alelo G em pacientes diabéticos tipo 2 (TAVARES et al., 2005a). Até esse momento, em nossos resultados, não foi encontrada nenhuma associação dos genótipos do polimorfismo Pro12Ala 34C>G,

com os parâmetros bioquímicos e a expressão gênica com os parâmetros *PPAR γ* e *PPAR γ 2* em leucócitos totais de sangue periférico, em pacientes diabéticos tipo 2.

É necessário ressaltar que os resultados são parciais, tendo em vista que a casuística ainda não está completa. Portanto, sabendo-se que o polimorfismo Pro12Ala 34C>G possui uma frequência que varia de 2 a 23% em diferentes grupos étnicos, esses resultados não foram suficientes para estabelecer uma análise entre o polimorfismo, com parâmetros bioquímicos e a expressão gênica do *PPAR γ* e *PPAR γ 2* (STUMVOLL & HARING, 2002).

Em relação ao polimorfismo C161T a frequência relativa do alelo T foi de 0,38 em DM2 e 0,5 no grupo controle, as quais podem ser devido ao baixo número de indivíduos controle mostrando diferença. Tavares e colaboradores (2005b) mostraram em uma frequência relativa de 0,10 do alelo T, com predominância de genótipos CC em seu estudo. Neste estudo, a presença do alelo T não foi associada a nenhuma diferença de expressão gênica *PPAR γ* e *PPAR γ 2* basal e após tratamento com pioglitazona e também não teve relação com os parâmetros bioquímicos. O efeito das variantes genéticas e a resposta ao tratamento devem ser testados em grupo amostral maior para uma melhor avaliação de envolvimento farmacogenético deste medicamento hipoglicemiante.

Condizente a outros estudos, nossos dados confirmaram que pioglitazona aumenta a expressão de mRNA de *PPAR γ* , por ser seu ligante (HANEFELD, 2007). Foi observado uma correlação negativa entre a expressão mRNA de *PPAR γ* e a concentração de insulina, isso pode ser explicado pelo fato do medicamento melhorar o quadro de resistência à insulina, fazendo com que a célula beta

pancreática diminua sua liberação, por não precisar secretar insulina em quantidades elevadas, na tentativa de reduzir a glicemia plasmática.

Os canais iônicos estão presentes na membrana plasmática e nas organelas intracelulares de todas as células, sendo responsáveis pela coordenação de diversas funções como neurotransmissão, contração, secreção e controle do volume celular. Na literatura, não há estudos que abordem o padrão de secreção da insulina *in vivo*, associado à expressão mRNA de *SUR1* e *KIR6.2* em leucócitos totais de sangue periférico.

Analisando de uma maneira geral os resultados de expressão dos pacientes, percebeu-se que não houveram diferenças após o tratamento na expressão de mRNA dos genes *SUR1* e *KIR6.2*, contudo percebeu-se que o padrão de expressão entre os pacientes era diferente, por isso os dados foram analisados entre os grupos que aumentaram e diminuíram a expressão, desta maneira os resultados foram significantes para os dois genes estudados.

Sunaga e colaboradores (1999) analisaram o perfil de liberação de insulina pelo canal de potássio em culturas de células beta pancreáticas, que expressavam *SUR1* e *KIR6.2*, relataram que pioglitazona não regula a liberação de insulina e que somente a troglitazona possui ação sobre o canal de potássio, atuando na liberação de insulina. Esses resultados se contradizem com os resultados obtidos no nosso estudo, a correlação positiva encontrada na variação da expressão do mRNA de *SUR1* em LTSP e variação de insulina após tratamento com pioglitazona (rs 0,625; p=0,001), evidencia que a variação da expressão de mRNA do *SUR1* está associado com concentrações de insulina, assim a pioglitazona, age sobre os canal de potássio, especialmente na sub-unidade *SUR1*.

Acreditamos que o tratamento melhora o quadro de resistência à insulina, por atuar nas células beta pancreáticas. Está hipótese é reforçada por dados do nosso estudo, a correlação da expressão de mRNA do *SUR1* com variação no HOMA-IR e HOMA-Beta, resultou em uma correlação negativa com (rs -0,650; $p < 0,001$) e (rs -0,460; $p = 0,049$), respectivamente. Porém não foi encontrados em nossos resultados, dados que indiquem que a pioglitazona atue na regulação dos genes *SUR1* e *KIR6.2* em tecido adiposo, não houve alteração da expressão de mRNA antes e após o tratamento. Foi observado a presença de uma correlação positiva entre a expressão de mRNA *PPAR γ* e *KIR6.2* no tecido adiposo, sugerindo que os dois padrões de expressão estejam associados, mas não o suficiente para haver diferenças após o tratamento

Na última década demonstrou-se que mutações nos genes codificadores para as subunidades formadoras dos canais iônicos resultam em doenças em uma enorme gama de tecidos. O papel importante do K_{ATP} na regulação da secreção da insulina foi evidenciado após a descoberta de que mutações nos genes codificadores para ambas as subunidades *SUR1* e *KIR6.2* expressos nas células beta pancreáticas apresentam um papel fundamental nos mecanismos de secreção da insulina em resposta ao estímulo da glicose (SHI *et al.*, 2005).

PPAR γ é altamente expresso em tecido adiposo, possuindo ações diretas sobre este tecido, devido a propriedades sensibilizadoras de insulina. Com base em estudos *in vitro*, o aumento da expressão de *PPAR γ* em tecido adiposo resulta em apoptose de adipócitos maduros de origem visceral e quebra de depósitos de gordura subcutânea e induzem a diferenciação de pré-adipócitos em células adiposas maduras em tecido subcutâneo e o aumento da expressão de genes

envolvidos na lipogênese e armazenamento de triacilglicerol. Outro efeito de *PPAR γ* no tecido adiposo, é relacionado com a obesidade e resistência à insulina, que altera a secreção das adipoquinas, além de IL-6, TNF-alfa, PAI-1 e angiotensinogênio (GUO & TABRIZCHI, 2006; TANG & MAROO, 2007).

Em nossos resultados, foi observado que a expressão basal de mRNA de *PPAR γ* e *PPAR γ 2* no tecido adiposo foi menor em relação ao grupo controle, assim é possível constatar que pacientes DM2 possuem menor expressão de *PPAR γ* e *PPAR γ 2*, e que após o tratamento com 16 semanas de pioglitazona, resultou somente no aumento de expressão de mRNA de *PPAR γ* . Esses dados são confirmados com base na literatura, por ser um ligante de *PPAR γ* , o medicamento pioglitazona atua neste gene no tecido adiposo, elevando sua expressão, o que acarreta uma cascata de mecanismos, entre eles a maior secreção de adiponectina, como observado em nossos resultados, onde houve um aumento da concentração plasmática, após o tratamento.

Porém, foi constatado que a expressão de mRNA de *PPAR γ 2* o tecido adiposo não se alterou, no entanto foi encontrado uma correlação negativa entre a variação da expressão de mRNA *PPAR γ 2* e a variação da concentração de resistina, dados inovadores que indicam que a isoforma 2 do gene *PPAR γ* esteja associado a redução plasmática de resistina, sendo esta adipoquina associada a resistência à insulina e desenvolvimento de DM2.

A secreção das adipoquinas pelo tecido adiposo é modificada em função da obesidade. Em estados de obesidades, há uma diminuição concentração plasmática de adiponectina, associado à resistência à insulina e hiperinsulenemia, na obesidade ainda é observado o aumento da concentração de leptina, e aumento de resistina, sendo sugerido que está adipoquina desenvolva uma ligação crucial entre obesidade e diabetes tipo 2, com alterações em mecanismos moleculares na adiposidade, resultado em aumento de gordura e desenvolvimento de DM2, mecanismos ainda desconhecidos (SHARMA & STAELS, 2007). Foi observado que nos pacientes DM2, a concentração basal de adiponectina estava reduzida em relação ao grupo controle, mas não houve diferenças entre as concentrações basais de resistina e leptina (YANG & BAROUCH, 2007; STEFFENS & MARCH, 2008).

6 CONCLUSOES

A expressão de mRNA dos genes *PPAR γ* , *PPAR γ 2*, *SUR1*, *KIR6.2* em leucócitos totais de sangue periférico é variável em resposta a pioglitazona em pacientes DM2.

A terapia hipoglicemiante utilizando a pioglitazona parece atuar sobre o canal de potássio, melhorando o quadro de resistência à insulina e sua secreção, regulando principalmente a expressão de mRNA da sub-unidade SUR1, resultando em melhora dos índices HOMA-IR e HOMA-Beta.

A resposta ao tratamento com pioglitazona não foi associada com os SNPs Pro12Ala e C161T dos genes *PPAR γ* e *PPAR γ 2* e também não foi relacionado aos exames bioquímicos.

Após o tratamento por 16 semanas de pioglitazona, a expressão de mRNA de *PPAR γ* no tecido adiposo aumentou, confirmando a ação do medicamento neste tecido. Não houve diferença de expressão gênica de *PPAR γ 2* após o tratamento.

Diferenças foram encontradas na dosagem de adiponectina após o tratamento, resultando em aumento da concentração desta adipoquina, melhorando o quadro de resistência à insulina. Pacientes DM2 possuíam menor concentração de adiponectina, em relação ao grupo controle.

A expressão dos genes das sub-unidades do canal de potássio dependente de ATP, *SUR1* e *KIR6.2*, no tecido adiposo, não se alterou após o tratamento, evidenciando que a ação da pioglitazona sobre o canal de potássio, não se entende ao tecido adiposo, diferentemente encontrado em leucócitos totais de sangue periférico.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHIMA, R.S.; LAZAR, M.A. Adipokines and the peripheral and neural control of energy balance. **Molecular Endocrinology**. v. 22, n. 5, p. 1023-1031, 2008.

ADAMIEC, R.; GACKA, M.; DOBOSZ, T.; SZYMANIEC, S.; BEDNARSKA-CHABOWSKA, D.; SADAKIERSKA-CHUDY, A. Stimulation of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR gamma) and the expression of selected blood monocyte cytokine genes in diabetic macroangiopathy. **Atherosclerosis**. v. 194, n. 2, p. e108-115, 2007.

ASHCROFT, F.M.; K(ATP) channels and insulin secretion: a key role in health and disease. **Biochem Soc Trans**. v. 34, pt. 2, p. 243-246, 2006.

BABSON, AL.; OLSON, D.R.; PALMIERI, T.; ROSS, A.C.; BECKER, D.M.; MULQUEEN, P.J. The IMMULITE assay tube: a new approach to heterogeneous ligand assay. **Clin Chem**. v. 37, n. 9, p.1521-2, 1991.

BATISIS, J.A.; NIETO-MARTINEZ, R.E.; LOPEZ-JIMENEZ, F. Metabolic Syndrome: From Global Epidemiology to Individualized Medicine. **CLINICAL PHARMACOLOGY & THERAPEUTICS**. v. 82, n. 5, p. 509-524, 2007.

BEHRE, C.J. Adiponectin, obesity and atherosclerosis. **Scand J Clin Lab Invest**. v. 67, p. 449-458, 2007.

BRYAN, J.; VILA-CARRILES, W.H.; ZHAO, G.; BABENKO, A.P.; BRYAN, L.A. Toward Linking Structure With Function in ATP-Sensitive K Channels. **DIABETES**,. v. 53, s. 3, p. S104-S112, 2004.

BUSTIN, S.A., Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. **J Mol Endocrinol**., v. 25, n.2, p.169-193, 2000.

CAMPBELL I.W.; MARIZ S. Beta-cell preservation with thiazolidinediones. **Diabetes Res Clin Pract**. v. 76, n. 2, p. 163-176, 2007.

CHOU, F.S.; WANG, P.S.; KULP, S.; PINZONE, J.J. Effects of Thiazolidinediones on Differentiation, Proliferation, and Apoptosis. **Mol Cancer Res**. v. 5, n. 6, p. 523-530, 2007.

DORMANDY, J.A; CHARBONNEL B. ; ECKLAN, D.J. ; et al. Secondary prevention of macrovascular events in patients with type 2 diabetes in the PROactive study (PROspective pioglitazone Clinical Trial In Macrovascular Events): a randomized controlled trial. **Lancet**. v. 366, n. 9493, p. 1279-1289, 2005.

DUNCOMBE, W.G. The colorimetric micro-determination of non-esterified fatty acids in plasma. **Clin Chim Acta**. v. 9, p. 122-125, 1964.

DYCK, D.J.; HEIGENHAUSER, G.J.F.; BRUCE, R.C. The role of adipokines as regulators of skeletal muscle fatty acid metabolism and insulin sensitivity. **Acta Physiol** . v. 186, p. 5-16, 2006.

FRIEDWALD, W.T.; LEVY, R.I.; FREDRICKSON, D.S. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein – an integrated approach to mechanisms and disorders. **N. Engl. J. Med.** v. 276, n. 32, 1967.

GELMAN, L.; JÉRÔME, N.F. DESVERGNE, B. Molecular basis of selective PPAR γ modulation for the treatment of Type 2 diabetes. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1771, n. 8, p. 1094-1107, 2007.

GOLDBERG, R.B.; KENDALL, D.M.; DEEG, M.A.; BUSE, J.B.; ZAGAR, A.J.; PINAIRE, J.A.; TAN, M.H.; KHAN, M.A.; PEREZ, A.T.; JACOBBER, S.J.; GLAI STUDY INVESTIGATORS. A comparison of lipid and glycemic effects of pioglitazone and rosiglitazone in patients with type 2 diabetes and dyslipidemia. **Diabetes Care**. v. 28, n. 7, p. 1547-1554, 2005.

CRAIG, T.J.; ASHCROFT, F.M.; PROKS, P. How ATP inhibits the open K(ATP) channel. **The Journal of General Physiology**. v. 132, n. 1, p. 131-144, 2008.

GROSS, B. PPAR agonists: multimodal drugs for the treatment of type-2 diabetes. **Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism**. v. 21, n. 4, p. 687-710, 2007.

GUO, L.; TABRIZCHI, R. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma as a drug target in the pathogenesis of insulin resistance. **Pharmacology & Therapeutics**. v. 111, p. 145-173, 2006.

HANEFELD, M. Pioglitazone and sulfonylureas: effectively treating type 2 diabetes. **J Clin Pract**. v. 61, s. 153, p. 20-27, 2007.

HERZ, M.; JOHNS, D.; REVIRIEGO, J.; GROSSMAN, L.D.; GODIN, C.; DURAN, S.; HAWKINS, F.; LOCHNAN, H.; ESCOBAR-JIMÉNEZ, F.; HARDIN, P.A.; KONKOY, C.S.; TAN, M.H. A randomized, double-blind, placebo-controlled, clinical trial of the effects of pioglitazone on glycemic control and dyslipidemia in oral antihyperglycemic medication-naïve patients with type 2 diabetes mellitus. **Clin Ther**. v. 25, n. 4, p. 1074-1095, 2003.

HICKMAN, I.J.; MACDONALD, G.A. Diabetes on the Severity of Liver Disease. **Am J Med**. v. 120, n. 10, p. 829-834, 2007.

JAFFE, M.Z. **Physiol Chem**. v. 10, p. 391-400, 1866.

KENDALL, D.M. Thiazolidinediones. **DIABETES CARE**. v. 29, n. 1, p. 154-157, 2006.

KERSHAW, E.E.; FLIER, J.S. Adipose tissue as an endocrine organ. **J Clin Endocrinol Metab**. v. 89, n. 6, p. 2548-2556, 2004.

LEHRKE, M.; LAZAR, M.A. **The Many Faces of PPARGAMMA**. Cell. v. 123, p. 993-999, 2005.

LIVAK, K.J.; SCHMITTGEN, T.D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ Method. **Methods**, v.25, p. 402-408, 2001.

MALECKI, M.T.; KLUPA, T. Type 2 diabetes mellitus: from genes to disease. **Pharmalogical Reports**. V. 57, suppl., p.20-32, 2005.

MASSIRER KB, HIRATA MH, SILVA AE, FERRAZ ML, NGUYEN NY, HIRATA RD. Interferon-alpha receptor 1 mRNA expression in peripheral blood mononuclear cells is associated with response to interferon-alpha therapy of patients with chronic hepatitis C. **Braz J Med Biol Res**, v.37, n.5, p.643-7, 2004

MARCHETTI P, DOTTA F, LAURO D, PURRELLO F. An overview of pancreatic beta-cell defects in human type 2 diabetes: implications for treatment. **Regulatory peptides**. v. 146, n. 1-3, p. 4-11, 2008.

MATARESE, G.; LEITER, H.; LA CAVA, A. Leptin in autoimmunity: many questions, some answers. **Blackwell Munksgaard Tissue Antigens**, v. 70, p. 87-95, 2007.

MATTHEWS, D.R.; HOSKER, J.P.; RUDENSKI, A.S.; NAYLOR, B.A.; TREACHER, D.F.; TURNER, R.C. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. **Diabetologia**, v. 28, p. 412-419, 1985.

MEIRHAEGHE, A.; FAJAS, L.; HELBECQUE, N.; COTTEL, D.; LEBEL, P.; DALLONGEVILLE, J.; DEEB, S.; AUWERX, J.; AMOUYEL, P. A genetic polymorphism of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma gene influences plasma leptin levels in obese humans. **Hum Mol Genet**. v. 7, n. 3, p. 435-440, 1998.

MEETOO, D.; MCGOVERN, P.; SAFADI, R. An epidemiological overview of diabetes across the world British. **Journal of nursing**. v. 16, n. 16, p. 1002-1007, 2007.

OLIVEIRA, E. O.; SOUZA, M.L.A.; LIMA, M.D.A. Índice HOMA (*homeostasis model assessment*) na prática clínica: uma revisão. **J Brás Patol Metab Lab**. v. 41, n. 4, p. 237-43, 2005.

PAIVA, D.C.P.; BERSUSA, A.A.S.; ESCUDER, M.M.L. Avaliação da assistência ao paciente com diabetes e/ou hipertensão pelo Programa Saúde da Família do Município de Francisco Morato, São Paulo, Brasil. **Cad. Saúde Pública, Rio de Janeiro**. v. 22, n.2, p.377-385, 2006.

PATEL, C.B.; DE LEMOS, J.A.; WYNE, K.L.; MCGUIRE, D.K. Thiazolidinediones and risk for atherosclerosis: pleiotropic effects of PPar gamma agonism. **Diab Vasc Dis Res**. v. 2, n. 2, p. 65-71, 2006.

PFÜTZNER, A.; MARX, N.; LÜBBEN, G.; LANGENFELD, M.; WALCHER, D.; KONRAD, T.; FORST, T.; Improvement of cardiovascular risk markers by pioglitazone is independent from glycemic control: results from the pioneer study. **J Am Coll Cardiol.** V. 45, n. 12, p. 1925-1931, 2005.

PILZ, S.; MÄRZ, W. Free fatty acids as a cardiovascular risk factor. **Clin Chem Lab Med.** v. 46, n. 4, p. 429-434, 2008.

PRATO, S.D.; BIANCHI, C.; MARCHETTI, P. β -cell function and anti-diabetic pharmacotherapy. **Diabetes/Metabolism Research and Reviews.** v. 23, p. 518 – 527, 2007.

RHEE, E.J.; OH, K.W.; LEE, W.Y.; KIM, S.Y.; OH, E.S.; BAEK, K.H.; KANG, M.L.; WOO, S.W. Effects of Two Common Polymorphisms of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- γ Gene on Metabolic Syndrome. **Archives of Medical Research.** v. 37, p. 86–94, 2006.

ROGLIC, G.; UNWIN, N.; BENNETT, P.H.; MATHERS, C.; TUOMILEHTO, J.; NAG, S.; CONNOLLY, V.; KING, H. The burden of mortality attributable to diabetes: realistic estimates for the year 2000. **Diabetes Care.** v. 28, n. 9, p. 2130-2135, 2005.

ROSENBLATT, S.; MISKIN, B.; GLAZER, N.B.; PRINCE, M.J.; ROBERTSON, K.E.; PIOGLITAZONE 026 STUDY GROUP. The impact of pioglitazone on glycemic control and atherogenic dyslipidemia in patients with type 2 diabetes mellitus. **Coron Artery Dis.** v.12, n.5, p. 413-423, 2001.

SALAZAR, L.A.; HIRATA, M.H.; QUINTAO, E.C.R.; HIRATA, R.D.C. Lipid lowering response of the HMG CoA R inhibitor fluvastatin is influenced by polymorphisms in the low-density lipoprotein receptor gene in Brazilian patients with primary hypercholesterolemia. **J. Clin Lab. Anal.**, v.14, p.125-131, 2000.

SALAZAR, L. A.; HIRATA, M. H.; FORTI, N.; DIAMENT, J.; GIANNINI S. D.; ISSA, J. S.; HIRATA, R. D. Pvu II intron 15 polymorphism at the LDL receptor gene is associated with differences in serum lipid concentrations in subjects with low and high risk for coronary artery disease from Brazil. **Clin. Chim. Acta.** v. 293, n. 1-2, p. 75-88, 2000.

SALAZAR, L.A.; HIRATA, M.H.; CAVALLI, S.A.; MACHADO, M.O.; HIRATA, R.D.C. Optimized procedure for DNA isolation from fresh and cryopreserved clotted human blood useful in clinical molecular testing. **Clin. Chem.** v.44, p. 1748-50, 1998.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D.W. A single-step method for the simultaneous preparation of DNA, RNA, and protein from cells and tissues. In: **Molecular cloning: a laboratory manual.** 3^a ed. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 2001, cap. 7, p. 7.9-7.12b

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D.W. Agarose gel electrophoresis. In: **Molecular cloning: a laboratory manual.** 3^a ed. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 2001, cap. 7, p. 7.43-7.45a.

SCHERBAUM, W.A; GÖKE, B.; GERMAN PIOGLITAZONE STUDY GROUP. Metabolic efficacy and safety of once-daily pioglitazone monotherapy in patients with type 2 diabetes: a double-blind, placebo-controlled study. **Horm Metab Res.** v. 34, n. 10, p. 589-595, 2002.

SEMPLE, R.K.; CHATTERJEE, V.K.; O'RAHILLY, S. PPAR γ and human metabolic disease. **The Journal of Clinical Investigation.** v. 116, n. 3, p. 581-589, 2006.

SHAND, B., SCOTT, R., CONNOLLY, S., CLARKE, R. BAKER, J. ELDER, P., FRAMPTON, C. YEO, J. Comparative study on the efficacy of pioglitazone in Caucasian and Maori- Polynesian patients with poorly controlled type 2 diabetes. **Diabetes, Obesity and Metabolism.** v. 9, p. 540-547, 2007.

SHARMA, A.Y.; STAELS, B. Peroxisome Proliferator-Activated Receptor and Adipose Tissue—Understanding Obesity-Related Changes in Regulation of Lipid and Glucose Metabolism. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism.** v.92, n.2, p. 386-395, 2007.

SHI, N.Q.; YE, B.; MAKIELSKI, J.C. Function and distribution of the SUR isoforms and splice variants. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology.** v. 39, p. 51–60, 2005.

SHI, H.; MOUSTAID-MOUSSA, N.; WILKISON, W.O.; ZEMEL, M.B. Role of the sulfonylurea receptor in regulating human adipocyte metabolism. **FASEB J.** v. 13, 1833-1838, 1999.

SIEDEL, J.; *et al.* **AACC Meeting Abstract 34. Clin Chem.** v.39, n.1127, 1993.

SIEDEL, J.; HAGELE, E.O.; ZIEGENHORN, J.; *et al.* **Clin Chem.** v.29, n. 1075, 1983.

SKELLY, A.H. Type 2 Diabetes Mellitus. **Nursing Clinics of North America,** v. 41, p 531-547, 2006.

SMITH, A..J.; TANEJA, T.K.; MANKOURI, J.; SIVAPRASADARAO, A. Molecular cell biology of KATP channels: implications for neonatal diabetes. **Expert Rev Mol Med.** v. 9, n. 21, p. 1-17, 2007.

SPELLMAN, C.W. Aggressively managing type 2 diabetes mellitus, hyperlipidemia, and bone loss. **J Am Osteopath Assoc.** v. 5, n. 3, p. 20-27, 2008.

STEFFENS, S.; MACH, F. Adiponectin and adaptive immunity: linking the bridge from obesity to atherogenesis. **Circulation research.** v. 102, n. 2, p. 218-225m 2008.

STUMVOLL, M.; HÄRING, H; Reduced lipolysis as possible cause for greater weight gain in subjects with the Pro12Ala polymorphism in PPAR γ 2? **Diabetologia.** v. 45, n.1, p.152-153, 2002.

SUGIUCHI H.; UJI Y.; OKABE, H.; IRIE T. *et al.* Direct measurement of high-density lipoprotein cholesterol in serum with polyethylene glycol-modified enzymes and sulfated α -cyclodextrin. **Clin. Chem.** v.41, p. 717-23, 1995.

SUNAGA, Y.; INAGAKI, N.; GONOI, T.; YAMADA, Y.; ISHIDA, H.; SEINO, Y., SEINO, S. Troglitazone but not pioglitazone affects ATP-sensitive K_q channel activity. *European Journal of Pharmacology.* v. 381, p. 71–76, 1999.

TACK, C.J.J.; SMITS, P. Thiazolidinedione derivatives diabetes mellitus. **The Journal of Medicine.** v. 64, n. 6, p. 166-174, 2006.

TALKE, H.; SHUBERT, G.E. Enzymatic urea determination in blood and serum in the Warburg optical test. **Klin Wochenschr.** v. 43, n. 1, p. 174-5, 1965.

TANAKA, T.; FUKUNAGA, Y.; ITOH, H.; DOI, K.; YAMASHITA, J.; CHUN, T.H.; INOUE, M.; MASATSUGU, K.; SAITO, T., SAWADA, N.; SAKAGUCHI, S.; ARAI, H.; NAKAO, K. Therapeutic potential of thiazolidinediones in activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma for monocyte recruitment and endothelial regeneration. **Eur J Pharmacol.** v. 508, v. 1-3, 255-265, 2005.

TANG, W.H.; MAROO, A. PPAR γ agonists: safety issues in heart failure Diabetes. **Obesity and Metabolism.** v. 9, p. 447–454, 2007.

TAVARES, V. Rastreamento molecular do gene do receptor ativado por proliferadores de peroxissoma gama (PPAR γ) em pacientes com diabetes melito do tipo 2. 2004. 124 f. Tese (Doutorado em Análises Clínicas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 2004.

TAVARES, V.; HIRATA, M.H.; HIRATA, R.D.C. Receptor ativado por proliferadores de peroxissoma gama (Pparg): estudo molecular na homeostase da glicose, metabolismo de lipídeos e abordagem terapêutica. **Arq Bras Endocrinol Metab.** v. 51, n.4, p. 523-533, 2007.

TAVARES, V.; HIRATA, R.D.; RODRIGUES, A.C.; MONTE, O., SALLES, J.E.; SCALLISSI, N.; SPERANZA, A.C.; HIRATA, M.H. Association between Pro12Ala polymorphism of the PPAR-gamma2 gene and insulin sensitivity in Brazilian patients with type-2 diabetes mellitus. **Diabetes Obes Metab.** v. 7, n. 5, p. 605-611, 2005.

TAVARES, V; HIRATA, R.D.; RODRIGUES, A.C.; MONTE, O.; SALLES, J.E.; SCALLISSI, N.; SPERANZA, A.C.; GOMES, S.; HIRATA, M.H. Effect of the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma C161T polymorphism on lipid profile in Brazilian patients with Type 2 diabetes mellitus. **J Endocrinol Invest.** v. 28, n. 2, p. 129-136, 2005.

TIBALDI, J. Initiating and Intensifying Insulin Therapy in Type 2 Diabetes Mellitus. **The American Journal of Medicine.** v. 121, n. 6, p. 20-29, 2008.

TILG, H.; MOSCHEN, A.R.; Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity. **Nature Publishing Group.** v. 6, n. 10, p. 772-783, 2006.

UK Prospective Diabetes Study Group. Effect of intensive blood-glucose control with metformin on complications in overweight patients with type 2 diabetes: UKPDS 34. **Lancet**. v. 352, p. 854-65, 1998.

UK Prospective Diabetes Study Group. Intensive blood-glucose control with sulfonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes: UKPDS 33. **Lancet**. v. 352, p.837-53, 1998.

WALLACE, T.M.; LEVY, J.C.; MATTHEWS, D.R. An increase in insulin sensitivity and basal beta-cell function in diabetic subjects treated with pioglitazone in a placebo-controlled randomized study. **Diabet Med**. V. 21, n. 6, p. 568-576, 2004.

WALTER, H.; LÜBBEN, G. Potential role of oral thiazolidinedione therapy in preserving beta-cell function in type 2 diabetes mellitus. **Drugs**. V. 65, n. 1, p. 1-13, 2005.

WENZEL, K. W. Pharmacological interference with in vitro tests of thyroid function. **Metabolim**. v. 30, n.7, p. 717-732, 1981.

WILD, S; ROGLIC, G.; GREEN, A.; SICREE R., KING, H.G. Prevalence of diabetes. Estimates for the year 2000 and projections for 2030. **Diabetes Care**. v. 27, p 1047-53, 2004.

Wilding, J. P. H. The importance of free fatty acids in the development of Type 2 diabetes. **Diabetic Medicine**. V. 24, p. 934–945, 2007.

World Health Organization. Definition and Diagnosis of classification of diabetes mellitus and intermediate hyperglycemia. Report of a WHO/IDF consultation, 2006.

YANG, R.; BAROUCH, L.A. Leptin Signaling and Obesity Cardiovascular Consequences. **Circ. Res**. v. 101, p. 545-559, 2007.

YANG, X.; SMITH, U. Adipose tissue distribution and risk of metabolic disease: does thiazolidinedione-induced adipose tissue redistribution provide a clue to the answer? **Diabetologia**, v. 50, p. 1127–1139, 2007.

ZACHAROVA, J.; CHIASSEON, J.L.; LAAKSO, M.; STOP-NIDDM STUDY GROUP. The common polymorphisms (single nucleotide polymorphism [SNP] +45 and SNP +276) of the adiponectin gene predict the conversion from impaired glucose tolerance to type 2 diabetes: the STOP-NIDDM trial. **Diabetes**. v. 54, n. 3, p. 893-899, 2005.

8. ANEXOS

ANEXO A

Cópia da ficha do aluno

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Documento sem validade oficial

9136 - 5765009/1 - Milano Felipe dos Santos Ferreira Marques

Email: milano@usp.br
Data de Nascimento: 23/02/1983
Cédula de Identidade: RG - 334318816 - SP
Local Nascimento: Estado de São Paulo
Nacionalidade: Brasileira
Graduação: Farmacêutico - Universidade do Oeste Paulista - - São Paulo - Brasil
 - 2004

Curso: Mestrado em Farmácia
Área: Análises Clínicas
Data da Matrícula: 05/07/2006
Início da Contagem de Prazo: 05/07/2006
Data Limite: 05/01/2009
Orientador(es): Prof(a). Dr(a). Mario Hiroyuki Hirata - 05/07/2006 a -- E.Mail: mhhirata@usp.br
Proficiência em Línguas: Inglês, Aprovado em 05/07/2006
Exame de Qualificação: Aprovado em 21/02/2008
Data do Depósito do Trabalho:
Data máxima para aprovação da Banca:
Título do Trabalho:
Data de Aprovação da Banca:
Data Máxima para Defesa:
Data da Defesa:
Resultado da Defesa:
Ocorrência: Última matrícula em 17/07/2008

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Hor.	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Sit. Matric.
FBC5757-1	Seminários em Análises Clínicas II	02/08/2006	14/11/2006	30	2	100.00	A	N	Concluída

FBC5709-4	Biologia Molecular em Análises Clínicas	07/08/2006	10/09/2006	75	5	92.00	A	N	Concluída
FBC5749-1	Biossegurança em Laboratórios de Ensino e Pesquisa	31/08/2006	05/10/2006	30	2	80.00	A	N	Concluída
BMB5804-1	O Órgão Adiposo como Centro Regulador do Metabolismo	26/09/2006	07/11/2006	60	4	92.00	B	N	Concluída
FBA5728-2	Aprimoramento Didático	03/10/2006	30/10/2006	60	0	0.00	-	N	Pré-matrícula indeferida
Atividade do Programa	Participou da Etapa de Estágio Supervisionado em Docência do Programa de Aperfeiçoamento de Ensino junto à Disciplina FBC-0512 Bioquímica Clínica, ministrada aos alunos de graduação do curso de Farmácia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo	01/02/2007	30/06/2007	-	3	0.00	-	-	-
FBC5748-1	Trabalhos Científicos: da Elaboração à Publicação	01/03/2007	10/05/2007	60	4	100.00	A	N	Concluída
FBC5793-8	Seminários em Análises Clínicas	14/03/2007	27/06/2007	30	2	100.00	A	N	Concluída
FBA5728-2	Aprimoramento Didático	05/06/2007	02/07/2007	60	4	100.00	A	N	Concluída
FBC5764-4	Protótipos em Bioquímica Clínica	03/10/2007	30/10/2007	60	4	100.00	A	N	Concluída

Créditos mínimos exigidos	Para Exame de Qualificação	Para Depósito de Dissertação/Tese	Créditos obtidos	
Disciplinas:	25	25	Disciplinas:	30
Atividades Programadas:	0	0	Atividades Programadas:	0
Seminários:	0	0	Seminários:	0
Estágios:	0	0	Estágios:	0
Total:	25	25		30

ANEXO B -**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO****ANEXO 1: TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

Projeto de pesquisa: "Caracterização de genes e proteínas plasmáticas relacionadas ao diabetes melito tipo2 em indivíduos tratados com pioglitazona".

Dados de identificação do sujeito da pesquisa

NOME DO PACIENTE _____
DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº _____ SEXO M ☐ F ☐
DATA DE NASCIMENTO ____/____/____
ENDEREÇO _____ Nº _____ APTO _____
BAIRRO _____ CIDADE _____
CEP _____ TELEFONE _____

Prezado Paciente,

Você está sendo convidado a participar do projeto de pesquisa acima citado que estou desenvolvendo com a equipe de médicos da Seção de Coronariopatias que estão fazendo seu atendimento no Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia. Esse estudo é necessário para o entendimento do mecanismo de ação das glitazonas, medicamento que reduz o açúcar no sangue (glicemia), bem como no papel do adipócito (célula que produz gordura) no estado de diabetes.

Para participar desta pesquisa precisarei do seu consentimento e de amostras de sangue e de tecido adiposo (gordura), que serão coletadas no Setor de Coleta do Laboratório Clínico do IDPC e pelo seu médico, respectivamente. O risco a sua saúde será mínimo, por causa da coleta de sangue que pode formar uma mancha roxa (hematoma) no local da picada da agulha. A coleta de tecido adiposo será feita através de biópsia por agulha, com anestesia local. Além de você outros cento e noventa e nove pacientes também participarão do estudo. Precisarei, ainda, que você responda algumas perguntas sobre doenças existentes nas pessoas de sua família, hábitos alimentares e uso de medicamentos.

Inicialmente, será coletada uma amostra de sangue para a avaliação da glicose e de insulina. Se a sua glicemia (açúcar no sangue) for normal, será coletado 50mg de tecido adiposo e sua participação no estudo se encerra. Se você tiver glicose alta, será encaminhado para o Setor de Nutrição do IDPC que lhe indicará uma dieta para baixar a glicose no sangue e manter seu peso, e após um mês seu sangue será coletado e será medida a sua glicemia. Se a glicose continuar alta, o seu médico

receitará uma glitazona de acordo com suas necessidades, e você deverá tomar durante quatro meses. Ao final de cada mês, para acompanhamento do tratamento, será coletada uma amostra de sangue (cerca de 5 mL) para medir a glicose no sangue. Ao final dos quatro meses serão coletadas mais 40 mL de sangue e 50mg de tecido adiposo e então, sua participação neste estudo terminará. As amostras serão utilizadas para medir glicose, colesterol e outros lipídeos, hormônios da tireóide e também para realizar os testes genéticos.

Você receberá todos os resultados dos exames laboratoriais necessários, bem como o medicamento receitado (glitazona) sem qualquer custo. Você não receberá qualquer pagamento por sua participação. Caso seja de seu interesse, também disponibilizarei os resultados dos testes genéticos no final da pesquisa.

Sua participação neste estudo é voluntária. Você pode retirar-se a qualquer momento do estudo, sem penalidades ou perda dos benefícios a que você tem direito e seu tratamento médico no Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia não será afetado.

Os dados e os resultados obtidos durante a investigação serão confidenciais e não serão revelados a terceiros, a menos que sua autorização prévia seja obtida. Sua identidade será mantida em segredo, quando os resultados desse estudo forem publicados em revistas, artigos e serem tema de debate e aulas.

Por quaisquer motivos adequados, independentes de seu consentimento, os membros da equipe de pesquisa podem encerrar sua participação no estudo. O motivo lhe será explicado e poderá ser devido a alguma alteração médica que pode colocá-lo em risco de outras complicações se continuar a participar, cancelamento do estudo pela coordenação do estudo, caso o sujeito não cumpra as orientações ou outras questões administrativas.

Caso você tenha alguma dúvida em relação à pesquisa, ou se ocorrer lesão ou doença relacionada com a investigação você pode entrar em contato com a Dra Maria Isabel Del Monaco (telefones: 5085-6038/6086), a qualquer hora do dia.

Eu, _____
 declaro que, após convenientemente esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, aceito, voluntariamente, em participar do presente Protocolo da Pesquisa.

São Paulo, _____ de _____ de 20 _____.

_____
 Assinatura do sujeito de pesquisa

_____
 assinatura do pesquisador
 (carimbo ou nome legível)

Uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido será fornecida para você pelo médico do estudo.

ANEXO C
Comitê de Ética em Pesquisa da FCF/USP

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Comitê de Ética em Pesquisa - CEP

Ofício CEP nº 153/2007

São Paulo, 27 de novembro de 2007.

Ilmo(a). Sr(a).
Prof. Dr. Mário Hiroyuki Hirata
FBC

Senhor(a) Pesquisador(a),

O Comitê de Ética em Pesquisa da FCF/USP, em reunião de 26 de novembro de 2007, tomou ciência do projeto intitulado "Caracterização de genes e proteínas plasmáticas relacionadas ao Diabetes melito tipo 2 em indivíduos tratados com pioglitazona" (Protocolo CEP nº 459), apresentado por Vossa Senhoria e resolveu que, tendo em vista o projeto já ter sido iniciado, não emitirá parecer sobre a realização do mesmo, mas acatará a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa do instituto "Dante Pazzanese" de Cardiologia, cujo documento comprobatório deverá ser apresentado com seu trabalho final de pós-graduação à Secretaria de Pós-Graduação desta Faculdade.

O CEP informa, ainda, que cabe ao orientador e ao pesquisador a responsabilidade de enviar o projeto ao Comitê de Ética antes do início do projeto.

Atenciosamente,

Profa. Dra. Elvira Maria Guerra Shinohara
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa
FCF/USP

ANEXO D

Carta de Aprovação do CEP do Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia

Secretaria de Estado da Saúde
 Coordenadoria de Saúde da Região Metropolitana da Grande São Paulo
 Instituto "Dante Pazzanese" de Cardiologia

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA – CEP

Data da Entrada: 21 de Julho de 2004
Investigador Principal: Dr. Dikran Armaganijan
Registro no CEP: 3276
 (ESTE N.º DEVERÁ CITAR NAS CORRESPONDÊNCIAS REFERENTES A ESTE PROJETO)

Projeto de Pesquisa: "Caracterização de Genes e Proteínas Plasmáticas Relacionadas ao Diabetes Melito Tipo 2 em Indivíduos Tratados com Pioglitazona".

Ao se proceder à análise das respostas ao parecer, relativo ao projeto em questão, considerando-se que:

- a) Foram atendidas as solicitações do referido parecer.
- b) O projeto preenche os requisitos fundamentais das resoluções CNS 196/96, 251/97 e 292/99, sobre as Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisa Envolvendo Seres Humanos, do Conselho Nacional de Saúde / Conselho Nacional de Ética em Pesquisa / Agência Nacional de Vigilância Sanitária e as Boas Práticas de Pesquisa Clínica do ICH-GCP.
- c) O Comitê de Ética em Pesquisa avaliou o Protocolo de Estudo e o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Diante do exposto, O Comitê de Ética em Pesquisa, manifesta-se pela:
Protocolo de Estudo – versão 30/ 09/2004 : Aprovado
Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – versão 09/09/2004: Aprovado

- Solicitamos que enviem o primeiro relatório parcial em 07 / 04 / 2005;
- Que informem imediatamente relatório sobre qualquer evento adverso ocorrido;
- Comunicar qualquer alteração no projeto e no TCLE.

MEMBROS DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA – Mandato 2002 – 2006

DR. PEDRO SILVIO FARSKY	PRESIDENTE
DR. ANDRÉ ARPAD FALUDI	MEMBRO EFETIVO
PSICª. ANA AUGUSTA MARIA PEREIRA	MEMBRO EFETIVO
ENFª CÉLIA HIROMI SHIOTSU	MEMBRO EFETIVO
DRª CLÁUDIA GRAVINA TADDEI	MEMBRO EFETIVO
SR. HUGO VLADIMIR CAGNONI	MEMBRO EFETIVO
DR. JOÃO MANOEL ROSSI	MEMBRO EFETIVO
LIGIA OKEMI OKI	MEMBRO EFETIVO

São Paulo, 14 de Outubro de 2004.

Dr. Pedro Silvio Farsky
 Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa

AV. DR. DANTE PAZZANESE, 500 - PRÉDIO I - MACKS OUD - IBIRAPUERA - 04012-180 - S.P.
 Telefax: (11) 5085-4040
 cepidpe@terra.com.br

ANEXO E -
FICHA PARA COLETA DE DADOS INDIVIDUAIS

DADOS DO PACIENTE

Nome:.....Paciente nº .....

Data:...../...../..... **Registro:**.....

Data de nascimento:...../...../.....

Sexo: M-1 ( ) F-2 ( ) **Menopausa:** Pré-1 ( ) Pós-2 ( )

Cor: Branca ( ) Parda ( ) Negra ( ) Amarela ( )

Hábito de fumar: Nunca fumou ( ) Parou de fumar ( ) há quanto tempo?.....

Fuma ( ) N° de cigarros/dia:.....

Consume bebida alcoólica? Sim ( ) Não ( )

Até 7 doses/sem. ( ) Mais de 7 doses/sem ( )

Possui algum tipo de doença? Sim ( ) Não ( ) Qual(is)?

Diabetes Mellitus ( )

Já teve infarte? Sim ( ) Não ( ) Há quanto tempo?.....

É hipertenso? Sim ( ) Não ( )

Medida de Pressão arterial:.....(mmHg)

É obeso? Sim ( ) Não ( )

Peso (Kg):..... **Altura (cm):**..... **IMC:**.....

Cintura (cm) :..... **Quadril (cm) :**..... **razão :**.....

Toma medicamento? Sim ( ) Não ( )

Qual(is)? Em que dosagem?.....

.....

Profissão:..... Há exigência de esforço físico? Sim ( ) Não ( )

Pratica exercício físico? Sim ( ) Não ( ) Com que frequência?.....

HISTÓRICO FAMILIAR

Possui algum parente com:

Diabetes Mellitus ( )

Obesidade ( )

Hipertensão ( )

Doença cardiovascular ( )

Hipercolesterolemia ( )

Quem?.....

Não tem ( )

Não sabe ( )

EXAMES FÍSICOS

Coleta	Basal	4 sem	8 sem	12 sem	16 sem
Glicemia (mg/dL)					
Peso (kg)					
Cintura/quadril (cm)					
Pressão Arterial (mmHg)					

EXAMES LABORATORIAIS

Parâmetros	Medida Basal	Após Pioglitazona
Data da coleta:	___/___/___	___/___/___
Glicemia em jejum (mg/dL)		
Glicemia pós-prandial (mg/dL)		
Glico-hemoglobina (mg/dL)		
Insulinemia em jejum (mg/dL)		
Insulinemia pós-prandial (mg/dL)		
Colesterol total (mg/dL)		
LDL-c (mg/dL)		
HDL-c (mg/dL)		
VLDL-c (mg/dL)		
Triacilgliróis (mg/dL)		
Uréia		
Creatinina		
Adiponectina Unidades		
Leptina		
Resistina		
Ácido Graxo Livre		

ANEXO F**Currículo Lattes****Milano Felipe dos Santos Ferreira Marques**

Dados Pessoais

Nome Milano Felipe dos Santos Ferreira Marques
CPF 31742486800

Endereço profissional Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas,
Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas
Av. Prof. Lineu Prestes 580 Bloco 17 - Laboratório de Biologia Molecular
Aplicada ao Diagnóstico
Cidade Universitária - São Paulo
05508-000, SP - Brasil
Telefone: 11 30913660

Endereço eletrônico

e-mail para contato : milano@usp.br
e-mail alternativo : milanomarques@msn.com

Formação Acadêmica/Titulação

2006 Mestrado em Farmácia (Análises Clínicas).
Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, Brasil
Título: Caracterização de genes e proteínas plasmáticas relacionadas ao diabetes mellitus do tipo 2 em indivíduos tratados com pioglitazona
Orientador: Mario Hiroyuki Hirata
Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

2001 - 2005 Graduação em Farmácia e Bioquímica.
Universidade do Oeste Paulista, UNOESTE, Presidente Prudente, Brasil

---

Formação complementar

2007 - 2007 PCR Quantitativo em Tempo Real.
Applied Biosystems do Brasil, Applied, São Paulo, Brasil

Atuação profissional

1. Centro de Análises Clínicas Unilab - UNILAB

Vínculo institucional

2003 - 2005 Vínculo: Estágio remunerado , Enquadramento funcional: Farmacêutico Bioquímico , Carga horária: 30, Regime: Parcial

Atividades

10/2003 - 06/2005 Estágio, Unilab

Estágio:

Estágio nos setores da hematologia, imunologia, hormônios, bioquímica, parasitologia, microbiologia, urinálise, coleta e laboratório de urgência

2. Universidade de São Paulo - USP

Vínculo institucional

2006 - 2006 Vínculo: estágio , Enquadramento funcional: aluno , Carga horária: 45, Regime: Dedicação Exclusiva

3. Universidade do Oeste Paulista - UNOESTE

Vínculo institucional

2002 - 2003 Vínculo: Aluno , Enquadramento funcional: Aluno , Carga horária: 12, Regime: Parcial

Atividades

03/2001 - 11/2003 Extensão Universitária, Projeto Interação SESI - Unoeste

Especificação:

Realização de exames de glicemia capilar, hanseníase, prevenção quanto ao uso de preservativos, destinados a populações carentes de cidades vizinhas de Presidente Prudente

02/2002 - 12/2003 Projetos de pesquisa, Departamento de Bioquímica Unoeste - Iniciação Científica

Participação em projetos:

*Respostas metabólicas em *Piaractus mesopotamicus* submetido a presença de agente poluente.*

02/2002 - 12/2003 Projetos de pesquisa, Departamento de Microbiologia Clínica Unoeste - Iniciação Científica

Participação em projetos:

Avaliação qualitativa da contaminação bacteriana das mãos e unhas de manipuladores de alimentos de trailers (chapeiros) em Presidente Prudente - SP.

Projetos

2002 - 2003 Avaliação qualitativa da contaminação bacteriana das mãos e unhas de manipuladores de alimentos de trailers (chapeiros) em Presidente Prudente - SP.
Descrição: objetivo de avaliar a presença de patógenos em manipuladores de lanches ao

prepará-lo, sendo este projeto desenvolvido conjuntamente com a Secretária de Vigilância Sanitária de Presidente Prudente - sp.

Situação: Concluído Natureza: Pesquisa

Alunos envolvidos: Graduação (1);

Integrantes: Milano Felipe dos Santos Ferreira Marques Alexandre Braoios (Responsável); Mércia de Carvalho Almeida

Financiador(es):

2002 - 2004 Respostas metabólicas em *Piaractus mesopotamicus* submetido a presença de agente poluente.

Descrição: peixes armazenados em dois aquários foram expostos ao agente poluente por 24 horas em concentrações diferentes e um aquário com ausência de qualquer agente poluente, após a exposição, foram feitas análises de alterações bioquímicas, metabólicas e alterações patológicas das brânquias.

Situação: Concluído Natureza: Pesquisa

Alunos envolvidos: Graduação (2);

Integrantes: Milano Felipe dos Santos Ferreira Marques Vera Lucia Perussi Polez; Sandro Estevam Moron (Responsável)

Financiador(es):

Prêmios e títulos

2007 Menção Honrosa, XV Congresso Paulista de Farmacêuticos

Produção em C, T & A

Produção bibliográfica

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)

1. Hirata, M. H., Himelfarb, S. T., MARQUES, M. F. S. F., Del Monaco, M. I., RODRIGUES, A. C., Sampaio, M. F., DINKHUYSEN, J. J., Bertolami, M., Armaganijan, D., Silva, V. F., Rezende, A. A., Hirata, R. D. C.

Effects of pioglitazone on RANK and RANKL mRNA expression in peripheral blood leukocytes from individuals with type 2 diabetes mellitus In: American Association for Clinical Chemistry (AACC) Annual Meeting, 2008, Washington, DC.

AACC Annual Meeting 2008. , 2008.

2. Hirata, M. H., MARQUES, M. F. S. F., Himelfarb, S. T., Silva, V. F., RODRIGUES, A. C., SILVA, F. A., Del Monaco, M. I., Sampaio, M. F., DINKHUYSEN, J. J., Bertolami, M., Armaganijan, D., Hirata, R. D. C.

Effects of pioglitazone on total PPARG, PPARG2, SUR1 and KIR6.2 mRNA expression in peripheral blood leukocytes from individuals with type 2 diabetes mellitus In: American Association for Clinical Chemistry - Annual Meeting, 2008, Washington, DC.

AACC Annual Meeting 2008. , 2008.

3. MARQUES, M. F. S. F., Himelfarb, S. T., Silva, V. F., Del Monaco, M. I., Sampaio, M. F., Bertolami, M., Armaganijan, D., Hirata, R. D. C., Hirata, M. H.

Estudo da expressão gênica do PPARG, SUR1 e KIR6.2 em indivíduos diabéticos melito tipo

2 tratados com pioglitazona In: XV Congresso Paulista de Farmacêuticos, 2007, São Paulo.

Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences. São Paulo: Faculdade de Ciências Farmacêuticas USP, 2007. v.43. p.65 - 65

4. Himelfarb, S. T., MARQUES, M. F. S. F., Silva, V. F., Del Monaco, M. I., Sampaio, M. F., Armaganijan, D., Rezende, A. A., Hirata, R. D. C., Hirata, M. H.

Estudo da expressão gênica do RANK e RANKL em indivíduos diabéticos tipo 2 tratados com pioglitazona In: XV Congresso Paulista de Farmacêuticos, 2007, São Paulo.

Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences. São Paulo: Faculdade de Ciências Farmacêuticas - USP, 2007. v.43. p.62 - 62

5. MARQUES, M. F. S. F., BERTOLLI, J., POLEZ, V. L. P.

Alterações bioquímicas em *Piaractus mesopotamicus* exposto ao agrotóxico Siptran 500SC. In: XV Encontro Brasileiro de Ictiologia, 2003, São Paulo.

Alterações bioquímicas em *Piaractus mesopotamicus* exposto ao agrotóxico Siptran 500SC.. , 2003.

6. MARQUES, M. F. S. F., ALMEIDA, M. C., BRAOIOS, A.

Avaliação qualitativa da contaminação das mãos e unhas de manipuladores de alimentos (chapeiros) de trailers em Presidente Prudente In: VIII Encontro Anual de Pesquisa Institucional da UNOESTE, 2003, Presidente Prudente.

Anais do VIII Encontro Anual de Pesquisa Institucional da UNOESTE. , 2003. p.72 - 72

7. MARQUES, M. F. S. F., ALMEIDA, M. C., BRAOIOS, A.

Presença de *Staphylococcus aureus* e enterobactérias nas mãos e unhas de preparadores de lanches nas vias públicas de Presidente Prudente - SP In: XXII Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2003, Florianópolis.

Anais do XXII Congresso Brasileiro de Microbiologia. , 2003.

Eventos

Participação em eventos

1. **66º Curso Intensivo de Cardiologia**, 2008. (Seminário)

.

2. **III Simpósio Temático do Departamento de Fisiologia e Biofísica "Sinalização Celular"**, 2008. (Simpósio)

.

3. **65º Curso Intensivo de Cardiologia - Dante Pazzanese**, 2007. (Congresso)

.

4. **VII Simpósio de biossegurança e descartes de produtos químicos perigosos em instituições de ensino e pesquisa**, 2007. (Seminário)

.

5. **VII Seminário Internacional de Farmacêuticos**, 2007. (Seminário)

.

6. **XV Congresso Paulista de Farmacêuticos**, 2007. (Congresso)

.

7. **2º Curso de Biologia Molecular e Celular**, 2007. (Simpósio)

.

8. **Real Time PCR: Users Meeting 2007**, 2007. (Encontro)

.

9. **VI Simpósio de biossegurança e descartes de produtos químicos perigosos em instituições de ensino e pesquisa**, 2006. (Simpósio)

.

10. **Real Time PCR: Users Meeting 2006**, 2006. (Seminário)

.

11. Apresentação (Outras Formas) no(a) **XV Encontro Brasileiro de Ictiologia**, 2003. (Congresso)
Alterações bioquímicas em *Piaractus mesopotamicus* exposto ao agrotóxico Siptran 500SC..

12. Apresentação (Outras Formas) no(a) **XXII Congresso Brasileiro de Microbiologia 2003**, 2003. (Congresso)

Presença de *Staphylococcus aureus* e Enterobactérias nas mãos e unhas de preparadores de lanches nas vias públicas de Presidente Prudente - SP.