

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS:
ENDOCRINOLOGIA

**Estudo da interação entre os polimorfismos D2 Tre92Ala e
PPAR γ 2 Pro12Ala em pacientes com diabetes mellitus tipo 2**

Dissertação de Mestrado

Aline Albeche Farias Estivalet

Orientadoras: Profa. Dra. Daisy Crispim Moreira

Profa. Dra. Ana Luiza Maia

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós- Graduação em Ciências Médicas: Endocrinologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Endocrinologia.

Porto Alegre, dezembro de 2009.

AGRADECIMENTOS

São vários os nomes que devem ser citados neste momento, mas certamente há o receio do esquecimento de alguém e procurarei não fazê-lo.

Um agradecimento especial às minhas orientadoras, a Profa. Dra. Daisy Crispim Moreira e a Profa. Dra. Ana Luiza Maia por me orientarem de maneira precisa nos objetivos que deveriam e seriam atingidos. Além das palavras de incentivo, muito importantes e bem-vindas, gostaria de ressaltar a determinação, qualidade científica, vivacidade, bom humor, energia, apoio e persistência nas horas dedicadas para a realização desta dissertação. Profissionais exemplares e grandes amigas, que admiro e com quem eu aprendi muito.

Às amigas Clara Capp e Denise Sortica por terem sido a minha primeira referência de incentivo e persistência desde que ingressei no Serviço de Endocrinologia.

Às colegas de turma e amigas, em especial, Débora Siqueira e Nadja Zennig, pelos momentos compartilhados dentro e fora das salas de aulas, e pelas palavras de conforto nos momentos de apuros.

Às companheiras da fase de maternidade e amigas, Márcia Puñales, Simone Wajner e Erika Meyer pelos gestos de incentivo e apoio e, principalmente, pela gentileza sempre dispensada.

Às amigas Jakeline Rheinheimer, Bianca Souza, Ana Paula Bouças, Ana Paula Fayh e Leticia Brondani por também ajudarem na realização deste projeto.

Aos amigos e colegas Iuri Martin, Leonardo Leiria, Miguel Dora, Walter Machado, Lucieli Ceolin e Miriam Romitti pelas sugestões e auxílios para o melhor desenvolvimento desta tese.

Ao Serviço de Endocrinologia e ao Programa de Pós-graduação em Ciências Médicas: Endocrinologia pela compreensão e apoio.

Ao meu marido André por sua paciência, compreensão e companheirismo, principalmente na conclusão deste trabalho.

Ao meu filho Arthur por fazer parte desta nova fase da minha vida.

Aos meus pais João Farias e Maria Julia, por me terem educado, pelo amor incondicional, pela compreensão, pela força e, sobretudo, por terem sempre acreditado em mim e, ainda, ao meu irmão Alne e minha cunhada Milena por me incentivarem e aconselharem nas horas difíceis.

Por fim, manifesto a minha gratidão a todos aqueles que estiveram ao meu lado, lançando ou intuindo novas idéias para a resolução do que foi proposto.

O formato da dissertação segue o modelo recomendado pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas: Endocrinologia da UFRGS, sendo apresentada na forma de uma breve introdução sobre o tema, seguido de um artigo original contendo os resultados finais.

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas	6
Resumo	7
Capítulo 1. Introdução geral	9
1.1. O diabetes mellitus (DM).....	10
1.2. O DM2 e a resistência à insulina.....	11
1.3. A iodotironina desiodase do tipo 2 (D2).....	14
1.4. Interação entre o polimorfismo D2 Thr92Ala e o polimorfismo Pro12Ala no gene do PPAR γ 2.....	16
1.5. Referências da introdução.....	18
Capítulo 2. Artigo Original: <i>D2 Thr92Ala and PPARγ2 Pro12Ala Polymorphisms Interact in the Modulation of Insulin Resistance in Patients with Type 2 Diabetes Mellitus</i>	23
Anexo	53

Lista de abreviaturas

- BMI: *body mass index*
- BP: *blood pressure*
- D2: *type 2 deiodinase* – desiodase tipo 2
- *DIO2*: human D2 gene – gene da D2 humana
- DM: diabetes mellitus
- DM1: diabetes mellitus tipo 1
- DM2: diabetes mellitus tipo 2
- GHb: *glycated hemoglobin*- hemoglobina glicada
- GLUT4: *glucose transporter 4* – transportador de glicose tipo 4
- HOMA: *homeostasis model assessment*
- PPAR γ : *peroxisome proliferator-activated receptor- γ* – receptor ativado pelo proliferador de peroxissoma γ
- PPAR γ 2: *PPAR γ gene* - gene do PPAR γ
- PPRE: *peroxisome proliferator response element*- elemento de resposta ao PPAR
- RI: resistência à insulina
- WHR: *waist-to-hip ratio*- razão-cintura-quadril

Resumo

Introdução. A enzima iodotironina desiodase tipo 2 (D2) converte o pró-hormônio T4 em sua forma ativa, T3, um passo essencial no metabolismo da tiróide. O polimorfismo Tre92Ala no gene que codifica a D2 foi associado com resistência à insulina em algumas populações. Interessantemente, um estudo recente relatou que o polimorfismo D2 Tre92Ala interage com o polimorfismo Pro12Ala, no gene que codifica o fator de transcrição PPAR γ 2, na modulação da síndrome metabólica em indivíduos não-diabéticos, sendo que os portadores do genótipo D2 Ala/Ala e do alelo PPAR γ 2 12Ala apresentam os piores fenótipos de síndrome metabólica e pressão arterial sistólica e diastólica.

Objetivos. Avaliar o efeito isolado ou combinado dos polimorfismos D2 Tre92Ala e PPAR γ 2 Pro12Ala na modulação da resistência à insulina em pacientes com diabetes mellitus tipo 2 (DM2).

Material e Métodos. Os polimorfismos D2 Tre92Ala e PPAR γ 2 Pro12Ala foram genotipados em 711 pacientes com DM2 brancos, utilizando-se a técnica de discriminação alélica por PCR em tempo real. Todos os pacientes incluídos no estudo foram submetidos a um exame físico completo e a exames laboratoriais padrões. A resistência à insulina foi avaliada através do cálculo do índice HOMA (*Homeostasis Model Assessment*) em um subgrupo de 215 pacientes sem uso de insulina e com creatinina sérica < 1,5mg/dL.

Resultados. As frequências dos alelos D2 92Ala e PPAR γ 2 12Ala foram 0,32 e 0,076, respectivamente, e suas frequências genóticas estavam em equilíbrio de Hardy-Weinberg ($p > 0,05$). Pacientes com o genótipo D2 Ala/Ala apresentaram níveis mais altos de insulina plasmática no jejum e índice HOMA quando comparados com pacientes portadores dos genótipos Tre/Ala ou Tre/Tre ($p = 0,015$ e $p = 0,001$; respectivamente). Além disso, um efeito sinérgico significativo foi observado entre os polimorfismos D2 Tre92Ala e PPAR γ 2 Pro12Ala na modulação do índice HOMA: portadores do genótipo D2 Ala/Ala e do alelo PPAR γ 2 12Ala apresentaram valores mais elevados de HOMA (mediana 8,5 [valor máximo 28,2 - valor mínimo 1,3]) do que os pacientes portadores das outras combinações genóticas destes polimorfismos (4,0 [17,6-0,3] no grupo de pacientes com os genótipos D2 Tre/Tre - PPAR γ 2 Pro/Pro, 5,8 [35,2-0,9] no grupo D2 Ala/Ala - PPAR γ 2 Pro/Pro e 3,5 [17,2-0,5] no grupo D2 Tre/Tre - PPAR γ 2 12Ala), após ajuste para sexo, idade e índice de massa corporal (p da interação = 0,010).

Conclusões. Pacientes com DM2 portadores dos genótipos D2 Ala/Ala e PPAR γ 2 12Ala apresentam níveis mais severos de resistência à insulina quando comparados aos pacientes com outras combinações genóticas dos polimorfismos D2 Tre92Ala e PPAR γ 2 Pro12Ala. Isso sugere que esses dois polimorfismos interagem na modulação da resistência à insulina em indivíduos brancos, o que pode constituir um alvo terapêutico potencial.

Capítulo 1

Introdução Geral

1.1. O diabetes mellitus (DM)

O diabetes mellitus (DM) é um grupo de doenças metabólicas de etiologia múltipla caracterizado por uma hiperglicemia crônica resultante de defeitos na secreção de insulina, na ação da insulina ou em ambos (1). O impacto do DM decorre não apenas de seu quadro clínico diretamente relacionado à hiperglicemia, mas também por distúrbios no metabolismo dos carboidratos, proteínas e lipídios que levam ao aparecimento de complicações agudas e crônicas. De acordo com a intensidade e o tempo de exposição à hiperglicemia, ocorrem lesões estruturais no endotélio vascular e no tecido nervoso que causam disfunções e falhas de vários órgãos e tecidos, especialmente rins, olhos, nervos, coração e vasos sanguíneos (1-3).

As desordens hiperglicêmicas agrupadas sob o termo “DM” diferem na sua patogênese, história natural, resposta ao tratamento e prevenção. Diversos fatores genéticos e ambientais podem resultar em formas de DM que parecem semelhantes entre si, mas apresentam etiologias diferentes. Os vários processos patogênicos que levam ao DM abrangem desde a destruição autoimune das células-beta pancreáticas, levando a uma deficiência de insulina, até anormalidades que resultam na resistência à ação da insulina (1, 3).

A classificação de DM atualmente recomendada apresenta quatro tipos de DM: DM tipo 1 (DM1), DM tipo 2 (DM2), outros casos específicos de DM e DM gestacional. Os dois principais tipos são o DM1 e o DM2, que anteriormente eram chamados de DM dependente de insulina (*insulin-dependent diabetes mellitus* – IDDM) e DM não-dependente de insulina (*non-insulin-dependent diabetes mellitus* – NIDDM), respectivamente. Apesar de apresentarem etiopatogênias diferentes que explicam as diferenças nas suas manifestações clínicas, os quatro tipos de DM têm como alteração

em comum a incapacidade de manter a homeostase glicêmica (1). Sintomas característicos do DM são polidipsia, poliúria, polifagia, visão turva e perda de peso. Nos casos mais severos, a cetoacidose pode ocorrer e causar estupor, coma, e na ausência de tratamento, morte (1, 2).

Estima-se que existam aproximadamente 171 milhões de diabéticos em todo o mundo (prevalência de 2,8% em 2000) e para o ano de 2030, algumas estimativas indicam que o número de indivíduos com DM, em particular com DM2, ficará em torno de 366 milhões (prevalência estimada de 4,4%) (4). Números da Organização Mundial da Saúde estimam que, em todo o globo, 987.000 mortes no ano de 2002 ocorreram em decorrência do DM, representando 1,7% da mortalidade geral (5). Dados mais recentes indicaram que o excesso de mortalidade global atribuível ao DM no ano de 2000 foi estimado em 2,9 milhões de mortes, equivalente a 5,2% da mortalidade geral, sendo 2-3% nos países pobres e mais de 8% em países desenvolvidos, tais como os Estados Unidos e Canadá (6).

1.2. O DM2 e a resistência à insulina

O DM2 corresponde a 90-95% dos casos de DM e é caracterizado pela hiperglicemia crônica causada pelo desbalanço entre a ação e secreção de insulina (1). Em geral, o DM2 ocorre em indivíduos com mais de 40 anos de idade, mas também pode ocorrer em indivíduos mais jovens (7). Pacientes com DM2 apresentam diferentes graus de deficiência à insulina, variando desde uma pequena intolerância à glicose até a forma insulinopênica semelhante ao DM1. Como o DM2 é frequentemente assintomático em seus estágios iniciais, os pacientes com esse tipo de DM podem permanecer sem diagnóstico por vários anos. No entanto, mesmo uma hiperglicemia

discreta pode provocar lesões em diversos órgãos e tecidos, levando ao aparecimento das complicações crônicas micro- e macroangiopáticas do DM (1).

Na maioria dos casos, a anormalidade inicial detectável é a resistência à insulina (RI). A RI pode ser definida como um estado onde é reduzido o efeito biológico de uma determinada concentração de insulina ou, ainda, como a inabilidade dos tecidos sensíveis à insulina (músculos, tecido adiposo e/ou fígado) responderem de forma eficiente à mesma (8). A insulina tem a função de diminuir o nível de glicose no plasma mantendo a glicemia em valores normais. Com a presença da RI, a normoglicemia é alcançada pelo aumento da secreção de insulina pelas células-beta pancreáticas, resultando em hiperinsulinemia. Entretanto, com o passar do tempo, ocorre uma “exaustão” na capacidade secretória das células-beta, fazendo com que a homeostase glicêmica no jejum não possa mais ser mantida. A forma clínica de DM2 é detectada quando os níveis de insulina não são mais suficientes para manter a glicemia normal no estado de jejum (1, 2, 9).

Aproximadamente 80% dos pacientes com DM2 são obesos (2), sendo que o aumento da gordura intra-abdominal ou visceral por si só já causa ou agrava a RI (10). O risco de desenvolver DM2 aumenta com a idade, presença de obesidade e ausência de atividade física e é maior em mulheres que tiveram DM gestacional e em indivíduos com intolerância à glicose e/ou história familiar de DM2 (1). A RI está frequentemente associada a diversos fatores de risco cardiovasculares que, além da hiperglicemia decorrente do DM2, incluem obesidade, dislipidemia e hipertensão arterial, compondo, assim, um quadro sindrômico chamado de Síndrome Metabólica (11, 12). Com a evolução da RI, outros problemas como a disfunção endotelial, a arterosclerose e as inflamações tendem a se agravar (13). Fatores ambientais como dieta, estresse e fumo são fatores de risco associados ao desenvolvimento da RI (14).

Estudos mostram que a prevalência da RI na população em geral vem aumentando progressivamente ao longo dos anos (15). Ela pode estar presente de forma transitente ou permanente durante a gravidez, estresse cirúrgico, traumas ou inanição; porém, é mais prevalente em pacientes com DM2 (16). Um melhor conhecimento dos mecanismos que levam às alterações na sensibilidade à insulina é um ponto chave para o melhor entendimento do DM2 e também, num grau mais extremo, para a síndrome metabólica.

Em pacientes com DM2, a RI resulta na desinibição da gliconeogênese hepática e/ou na diminuição das taxas de glicose dentro das células. O transportador de glicose insulino-dependente (GLUT4) atua no transporte de glicose no músculo esquelético e tecido adiposo. A expressão do GLUT4 é regulada positivamente através dos hormônios da tireóide e a sua superexpressão em ratos db/db insulino-resistentes melhora o controle da glicemia em dietas hipercalóricas (17, 18). Além disso, a desregulação lipídica e lipoprotéica está fortemente relacionada com o estado de RI. Defeitos no armazenamento e no metabolismo de ácidos graxos aumentam os níveis de insulina, modificando a expressão dos transportadores de glicose, o que resulta em um estado de RI e lipólise. Juntamente com esse processo, moléculas inflamatórias são ativadas, como citocinas e adipocinas, diminuindo a sensibilidade à insulina através da modulação do metabolismo dos ácidos graxos e do GLUT4 (15, 19). Além disso, o sistema neuroendócrino também contribui para o desenvolvimento da RI. Concentrações elevadas de cortisol, hormônio de crescimento e catecolaminas podem gerar um efeito antiinsulínico, resultando no aumento da glicose hepática (15).

Nesse contexto, a suscetibilidade à RI pode estar relacionada a uma grande variedade de genes, como por exemplo, *DIO2* (*type 2 iodothyronine deiodinase*), *PPAR γ* (*peroxisome proliferator-activated receptor γ*), *UCP1* e *UCP3* (*type 1 and 3*

uncoupling proteins), adiponectina, receptor retinóide-x e genes para adrenoreceptores (20-27).

1.3. A iodotironina desiodase do tipo 2 (D2)

A iodotironina desiodase do tipo 2 (D2) é uma selenoenzima pertencente à família das oxidoredutases que catalisa a remoção de uma molécula de iodo (desiodação) do anel aromático externo do pró-hormônio T4 ativando-o em T3, um passo essencial para o metabolismo da tiróide (28, 29).

A expressão da D2 é tecido-específica e altamente regulada. Em tecidos humanos normais, o RNAm e/ou a atividade da D2 estão presentes na tiróide, no tecido adiposo, nos músculos lisos da artéria coronariana e aorta, no coração, no cérebro, no músculo esquelético, na medula espinhal, na pele, na glândula hipófise, na placenta, no fígado e no pâncreas (30-37). Além disso, também possui uma expressão diferencial em tumores cerebrais e de pituitária, mesotelioma e em neoplasias da tiróide (38, 39).

Em modelos animais, a disrupção do gene que codifica a D2 e, conseqüentemente, o bloqueio da expressão desse gene, leva a um aumento da secreção de TSH, cuja presença chega a ser duas vezes maior que em ratos normais, demonstrando a importância desse gene na regulação do TSH (40). Devido a sua expressão diferencial nos diferentes tecidos, a D2 também está associada com outros mecanismos que não os da produção de hormônios da tiróide, tendo um ação importante na regulação da termogênese adaptativa em ratos, gasto energético, obesidade, metabolismo da glicose e aumento da RI (41-45).

O gene da iodotironina desiodase do tipo 2 humana (*DIO2*) está localizado no cromossomo 14 (posição 14q24.3) e seu transcrito de 7 kb é formado por 3 éxons e 2

íntrons (46). Como outras selenoenzimas, a D2 é caracterizada pela presença de uma selenocisteína no seu domínio catalítico. Essa selenocisteína é codificada por um códon UGA no gene *DIO2* que, na presença de um elemento específico na região 3'UTR (3' *untranslated region*), chamado de sequência de inserção de selenocisteína (SECIS), interage com o RNAt da selenocisteína e outros componentes da maquinaria de tradução, permitindo a incorporação da selenocisteína na proteína ao invés do códon de terminação. Mutações de nucleotídeos importantes no elemento SECIS virtualmente impedem a incorporação da selenocisteína, abolindo a atividade da enzima (46).

Mentuccia *et al.* (42), em 2002, descreveram um polimorfismo A/G no gene *DIO2*, que resulta na troca de uma treonina por uma alanina no códon 92 (D2 Tre92Ala) e que estava associado a uma redução de cerca de 20% na taxa de disponibilidade da glicose (uma medida da sensibilidade à insulina) em uma amostra de indivíduos não-diabéticos italianos. Mais recentemente, pesquisadores do nosso grupo mostraram que em pacientes diabéticos tipo 2 os níveis de RI são significativamente mais elevados em indivíduos com o genótipo D2 Ala/Ala do que em indivíduos com os genótipos D2 Tre/Ala ou Tre/Tre (24). Entretanto, em oposição a esses resultados, três outros estudos com ingleses, com uma comunidade religiosa dos EUA e dinamarqueses não demonstraram a associação do polimorfismo D2 Tre92Ala com RI, outros índices glicêmicos ou DM2 (47-49).

Canani *et al.* (24) também demonstraram que em pacientes com o genótipo D2 Ala/Ala a velocidade da D2 (*ex vivo*) na tiróide e músculo esquelético é aproximadamente a metade daquela apresentada por pacientes com os genótipos D2 Tre/Ala ou Tre/Tre. Os hormônios da tiróide influenciam o metabolismo da glicose no músculo esquelético e tecido adiposo via a regulação transcricional do transportador de glicose específico para esses tecidos (GLUT4), o que aumenta a sensibilidade à insulina.

Um polimorfismo que cause a redução da atividade da D2 pode diminuir a geração intracelular do hormônio ativo da tireóide (T3) no músculo esquelético e tecido adiposo. Essa diminuição na concentração de T3 diminuiria a expressão de GLUT4 e outros genes envolvidos no gasto energético, o que, conseqüentemente, levaria ao surgimento da RI nesses tecidos (42, 50, 51).

Porém, estudos funcionais *in vitro* de cinética e de atividade enzimática da D2 contendo o alelo mutado (92Ala) não demonstraram alterações significativas quando comparados com a cinética e atividades *in vitro* da enzima contendo o alelo selvagem (Tre92) (24, 52), sugerindo que embora o polimorfismo D2 Tre92Ala possa ser um marcador para RI, ele não parece ser o fator causal dessa complicação.

1.4. Interação entre o polimorfismo D2 Tre92Ala e o polimorfismo Pro12Ala no gene do PPAR γ 2

Interessantemente, Fiorito *et al.* (53) demonstraram que o gene *DIO2* apresenta na sua região promotora uma região de interação com o fator de transcrição PPAR γ , chamada de elemento de resposta ao PPAR (*peroxisome proliferator response element* – PPRE), indicando que a expressão do gene *DIO2* pode ser regulada por esse fator de transcrição. O PPAR γ é membro de uma superfamília de receptores nucleares e fatores de transcrição ativados por ligantes e está envolvido na regulação transcricional de diversos genes relacionados ao metabolismo dos lipídios, ao balanço energético e em rotas envolvidas na patogênese do DM2, RI e doenças cardiovasculares (54-56). Além disso, ele é o receptor-alvo para uma classe de hipoglicemiantes orais (tiazolidinedionas - TZDs) que atuam melhorando a sensibilidade à insulina (56).

Fiorito *et al.* (53) também relataram uma interação gene-gene significativa entre o polimorfismo D2 Tre92Ala e PPAR γ 2 Pro12Ala na modulação de características da síndrome metabólica em indivíduos não-diabéticos brancos. Indivíduos apresentando o alelo D2 92Ala em conjunto com o alelo PPAR γ 2 12Ala apresentaram níveis mais elevados de pressão sistólica e diastólica e também um risco aumentado de síndrome metabólica quando comparados com indivíduos portando os alelos D2 Tre92 e PPAR γ 2 Pro12 (53).

O polimorfismo PPAR γ 2 Pro12Ala é o resultado de uma mutação C/G no códon 12 do éxon B, causando uma mudança de uma prolina para uma alanina e que codifica o domínio aminoterminal que define a isoforma 2 do PPAR (PPAR γ 2), específica de adipócitos (55, 57). Esse polimorfismo tem sido reconhecido como tendo um papel importante na determinação do risco de fenótipos relacionados à RI e DM2 (55, 58-60). Uma meta-análise de vários estudos de associação sobre o polimorfismo PPAR γ 2 Pro12Ala mostrou que o alelo mais raro (12Ala) está associado a uma redução do risco de se desenvolver DM2 e que o alelo mais comum (Pro12) confere um risco de 1,25 para essa doença. Apesar desse risco de 1,25 ser baixo, o risco atribuível para a população (cerca de 25%) é relativamente alto, uma vez que o alelo Pro12 apresenta uma frequência de aproximadamente 80% entre a maioria das populações estudadas (57).

1.5. Referências bibliográficas da introdução

1. **American Diabetes Association** 2008 Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care* 31:S55-60
2. **Oliveira JEP** 2004 Conceito, classificação e diagnóstico do diabetes mellitus. In: Oliveira JEP e Milech A (eds) *Diabetes mellitus. Clínica, diagnóstico, tratamento multidisciplinar*. Ed. Ateneu, São Paulo (SP), pp 7-18
3. **Galindo V, Cavalcanti N, Lyra R** 2006 Definição, diagnóstico e classificação dos distúrbios no metabolismo dos hidratos de carbono. In: Lyra R e Cavalcanti N (eds) *Diabetes mellitus*. Ed. Diagraphic, Rio de Janeiro (RJ), pp 55-60
4. **Wild S, Roglic G, Green A, Sicree R, King H** 2004 Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care* 27:1047-1053
5. **World Health Organization** 2003 The World Health Report 2003. Geneva:World Health Organization
6. **Roglic G, Unwin N, Bennett PH, Mathers C, Tuomilehto J, Nag S, Connolly V, King H** 2005 The burden of mortality attributable to diabetes: realistic estimates for the year 2000. *Diabetes Care* 28:2130-2135
7. **Gaylor AS, Condren ME** 2004 Type 2 diabetes mellitus in the pediatric population. *Pharmacotherapy* 24:871-878
8. **Wallace TM, Matthews DR** 2002 The assessment of insulin resistance in man. *Diabet Med* 19:527-534
9. **LeRoith D** 2002 Beta-cell dysfunction and insulin resistance in type 2 diabetes: role of metabolic and genetic abnormalities. *Am J Med* 113 Suppl 6A:3S-11S
10. **Lazar MA** 2005 How obesity causes diabetes: not a tall tale. *Science* 307:373-375
11. **Reaven GM** 1988 Banting lecture 1988. Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes* 37:1595-1607
12. **Bloomgarden ZT** 2004 Definitions of the insulin resistance syndrome: the 1st World Congress on the Insulin Resistance Syndrome. *Diabetes Care* 27:824-830
13. **Despres JP, Lemieux I** 2006 Abdominal obesity and metabolic syndrome. *Nature* 444:881-887
14. **Chiolero A, Faeh D, Paccaud F, Cornuz J** 2008 Consequences of smoking for body weight, body fat distribution, and insulin resistance. *Am J Clin Nutr* 87:801-809
15. **Avramoglu RK, Basciano H, Adeli K** 2006 Lipid and lipoprotein dysregulation in insulin resistant states. *Clin Chim Acta* 368:1-19
16. **Alberti KG, Zimmet P, Shaw J** 2006 Metabolic syndrome--a new world-wide definition. A Consensus Statement from the International Diabetes Federation. *Diabet Med* 23:469-480

17. **Ikemoto S, Thompson KS, Takahashi M, Itakura H, Lane MD, Ezaki O** 1995 High fat diet-induced hyperglycemia: prevention by low level expression of a glucose transporter (GLUT4) minigene in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:3096-3099
18. **Ezaki O** 1997 Regulatory elements in the insulin-responsive glucose transporter (GLUT4) gene. *Biochem Biophys Res Commun* 241:1-6
19. **Bastard JP, Maachi M, Lagathu C, Kim MJ, Caron M, Vidal H, Capeau J, Feve B** 2006 Recent advances in the relationship between obesity, inflammation, and insulin resistance. *Eur Cytokine Netw* 17:4-12
20. **Szanto A, Narkar V, Shen Q, Uray IP, Davies PJ, Nagy L** 2004 Retinoid X receptors: X-ploring their (patho)physiological functions. *Cell Death Differ* 11 Suppl 2:S126-143
21. **Kim H, Haluzik M, Asghar Z, Yau D, Joseph JW, Fernandez AM, Reitman ML, Yakar S, Stannard B, Heron-Milhavet L, Wheeler MB, LeRoith D** 2003 Peroxisome proliferator-activated receptor-alpha agonist treatment in a transgenic model of type 2 diabetes reverses the lipotoxic state and improves glucose homeostasis. *Diabetes* 52:1770-1778
22. **Kim JA, Wei Y, Sowers JR** 2008 Role of mitochondrial dysfunction in insulin resistance. *Circ Res* 102:401-414
23. **Moller DE, Berger JP** 2003 Role of PPARs in the regulation of obesity-related insulin sensitivity and inflammation. *Int J Obes Relat Metab Disord* 27 Suppl 3:S17-21
24. **Canani LH, Capp C, Dora JM, Meyer EL, Wagner MS, Harney JW, Larsen PR, Gross JL, Bianco AC, Maia AL** 2005 The type 2 deiodinase A/G (Thr92Ala) polymorphism is associated with decreased enzyme velocity and increased insulin resistance in patients with type 2 diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab* 90:3472-3478
25. **Fukuyama K, Ohara T, Hirota Y, Maeda K, Kuno S, Zenibayashi M, Teranishi T, Kouyama K, Maeda E, Sakamoto N, Kasuga M** 2006 Association of the -112A>C polymorphism of the uncoupling protein 1 gene with insulin resistance in Japanese individuals with type 2 diabetes. *Biochem Biophys Res Commun* 339:1212-1216
26. **Choi CS, Fillmore JJ, Kim JK, Liu ZX, Kim S, Collier EF, Kulkarni A, Distefano A, Hwang YJ, Kahn M, Chen Y, Yu C, Moore IK, Reznick RM, Higashimori T, Shulman GI** 2007 Overexpression of uncoupling protein 3 in skeletal muscle protects against fat-induced insulin resistance. *J Clin Invest* 117:1995-2003
27. **Hasstedt SJ, Chu WS, Das SK, Wang H, Elbein SC** 2008 Type 2 diabetes susceptibility genes on chromosome 1q21-24. *Ann Hum Genet* 72:163-169
28. **Bianco AC, Salvatore D, Gereben B, Berry MJ, Larsen PR** 2002 Biochemistry, cellular and molecular biology, and physiological roles of the iodothyronine selenodeiodinases. *Endocr Rev* 23:38-89
29. **Bianco AC, Kim BW** 2006 Deiodinases: implications of the local control of thyroid hormone action. *J Clin Invest* 116:2571-2579

30. **Croteau W, Davey JC, Galton VA, St Germain DL** 1996 Cloning of the mammalian type II iodothyronine deiodinase. A selenoprotein differentially expressed and regulated in human and rat brain and other tissues. *J Clin Invest* 98:405-417
31. **Salvatore D, Bartha T, Harney JW, Larsen PR** 1996 Molecular biological and biochemical characterization of the human type 2 selenodeiodinase. *Endocrinology* 137:3308-3315
32. **Salvatore D, Tu H, Harney JW, Larsen PR** 1996 Type 2 iodothyronine deiodinase is highly expressed in human thyroid. *J Clin Invest* 98:962-968
33. **Bartha T, Kim SW, Salvatore D, Gereben B, Tu HM, Harney JW, Rudas P, Larsen PR** 2000 Characterization of the 5'-flanking and 5'-untranslated regions of the cyclic adenosine 3',5'-monophosphate-responsive human type 2 iodothyronine deiodinase gene. *Endocrinology* 141:229-237
34. **Imai Y, Toyoda N, Maeda A, Kadobayashi T, Fangzheng G, Nishikawa M, Iwasaka T** 2001 Type 2 iodothyronine deiodinase expression is upregulated by the protein kinase A-dependent pathway and is downregulated by the protein kinase C-dependent pathway in cultured human thyroid cells. *Thyroid* 11:899-907
35. **Kaplan MM, Pan CY, Gordon PR, Lee JK, Gilcrest BA** 1988 Human epidermal keratinocytes in culture convert thyroxine to 3,5,3'-triiodothyronine by type II iodothyronine deiodination: a novel endocrine function of the skin. *J Clin Endocrinol Metab* 66:815-822
36. **Mizuma H, Murakami M, Mori M** 2001 Thyroid hormone activation in human vascular smooth muscle cells: expression of type II iodothyronine deiodinase. *Circ Res* 88:313-318
37. **Murakami M, Araki O, Hosoi Y, Kamiya Y, Morimura T, Ogiwara T, Mizuma H, Mori M** 2001 Expression and regulation of type II iodothyronine deiodinase in human thyroid gland. *Endocrinology* 142:2961-2967
38. **Itagaki Y, Yoshida K, Ikeda H, Kaise K, Kaise N, Yamamoto M, Sakurada T, Yoshinaga K** 1990 Thyroxine 5'-deiodinase in human anterior pituitary tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 71:340-344
39. **Murakami M, Araki O, Morimura T, Hosoi Y, Mizuma H, Yamada M, Kurihara H, Ishiuchi S, Tamura M, Sasaki T, Mori M** 2000 Expression of type II iodothyronine deiodinase in brain tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 85:4403-4406
40. **Schneider MJ, Fiering SN, Pallud SE, Parlow AF, St Germain DL, Galton VA** 2001 Targeted disruption of the type 2 selenodeiodinase gene (DIO2) results in a phenotype of pituitary resistance to T4. *Mol Endocrinol* 15:2137-2148
41. **Christoffolete MA, Linardi CC, de Jesus L, Ebina KN, Carvalho SD, Ribeiro MO, Rabelo R, Curcio C, Martins L, Kimura ET, Bianco AC** 2004 Mice with targeted disruption of the Dio2 gene have cold-induced overexpression of the uncoupling protein 1 gene but fail to increase brown adipose tissue lipogenesis and adaptive thermogenesis. *Diabetes* 53:577-584
42. **Mentuccia D, Proietti-Pannunzi L, Tanner K, Bacci V, Pollin TI, Poehlman ET, Shuldiner AR, Celi FS** 2002 Association between a novel variant of the

- human type 2 deiodinase gene Thr92Ala and insulin resistance: evidence of interaction with the Trp64Arg variant of the beta-3-adrenergic receptor. *Diabetes* 51:880-883
43. **de Jesus LA, Carvalho SD, Ribeiro MO, Schneider M, Kim SW, Harney JW, Larsen PR, Bianco AC** 2001 The type 2 iodothyronine deiodinase is essential for adaptive thermogenesis in brown adipose tissue. *J Clin Invest* 108:1379-1385
 44. **Liu X, Rossmeis M, McClaine J, Riachi M, Harper ME, Kozak LP** 2003 Paradoxical resistance to diet-induced obesity in UCP1-deficient mice. *J Clin Invest* 111:399-407
 45. **Lowell BB, Spiegelman BM** 2000 Towards a molecular understanding of adaptive thermogenesis. *Nature* 404:652-660
 46. **Celi FS, Canettieri G, Mentuccia D, Proietti-Pannunzi L, Fumarola A, Sibilla R, Predazzi V, Ferraro M, Andreoli M, Centanni M** 2000 Structural organization and chromosomal localization of the human type II deiodinase gene. *Eur J Endocrinol* 143:267-271
 47. **Grarup N, Andersen MK, Andreasen CH, Albrechtsen A, Borch-Johnsen K, Jorgensen T, Auwerx J, Schmitz O, Hansen T, Pedersen O** 2007 Studies of the common DIO2 Thr92Ala polymorphism and metabolic phenotypes in 7342 Danish white subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 92:363-366
 48. **Maia AL, Dupuis J, Manning A, Liu C, Meigs JB, Cupples LA, Larsen PR, Fox CS** 2007 The type 2 deiodinase (DIO2) A/G polymorphism is not associated with glycemic traits: the Framingham Heart Study. *Thyroid* 17:199-202
 49. **Mentuccia D, Thomas MJ, Coppotelli G, Reinhart LJ, Mitchell BD, Shuldiner AR, Celi FS** 2005 The Thr92Ala deiodinase type 2 (DIO2) variant is not associated with type 2 diabetes or indices of insulin resistance in the old order of Amish. *Thyroid* 15:1223-1227
 50. **Torrance CJ, Devente JE, Jones JP, Dohm GL** 1997 Effects of thyroid hormone on GLUT4 glucose transporter gene expression and NIDDM in rats. *Endocrinology* 138:1204-1214
 51. **Weinstein SP, O'Boyle E, Fisher M, Haber RS** 1994 Regulation of GLUT2 glucose transporter expression in liver by thyroid hormone: evidence for hormonal regulation of the hepatic glucose transport system. *Endocrinology* 135:649-654
 52. **Peeters RP, van Toor H, Klootwijk W, de Rijke YB, Kuiper GG, Uitterlinden AG, Visser TJ** 2003 Polymorphisms in thyroid hormone pathway genes are associated with plasma TSH and iodothyronine levels in healthy subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 88:2880-2888
 53. **Fiorito M, Torrente I, De Cosmo S, Guida V, Colosimo A, Prudente S, Flex E, Menghini R, Miccoli R, Penno G, Pellegrini F, Tassi V, Federici M, Trischitta V, Dallapiccola B** 2007 Interaction of DIO2 T92A and PPARgamma2 P12A polymorphisms in the modulation of metabolic syndrome. *Obesity (Silver Spring)* 15:2889-2895

54. **Ahmed W, Ziouzenkova O, Brown J, Devchand P, Francis S, Kadakia M, Kanda T, Orasanu G, Sharlach M, Zandbergen F, Plutzky J** 2007 PPARs and their metabolic modulation: new mechanisms for transcriptional regulation? *J Intern Med* 262:184-198
55. **Stumvoll M, Haring H** 2002 The peroxisome proliferator-activated receptor-gamma2 Pro12Ala polymorphism. *Diabetes* 51:2341-2347
56. **Sharma AM, Staels B** 2007 Review: Peroxisome proliferator-activated receptor gamma and adipose tissue--understanding obesity-related changes in regulation of lipid and glucose metabolism. *J Clin Endocrinol Metab* 92:386-395
57. **Altshuler D, Hirschhorn JN, Klannemark M, Lindgren CM, Vohl MC, Nemesh J, Lane CR, Schaffner SF, Bolk S, Brewer C, Tuomi T, Gaudet D, Hudson TJ, Daly M, Groop L, Lander ES** 2000 The common PPARgamma Pro12Ala polymorphism is associated with decreased risk of type 2 diabetes. *Nat Genet* 26:76-80
58. **Owen KR, McCarthy MI** 2007 Genetics of type 2 diabetes. *Curr Opin Genet Dev* 17:239-244
59. **Tonjes A, Stumvoll M** 2007 The role of the Pro12Ala polymorphism in peroxisome proliferator-activated receptor gamma in diabetes risk. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 10:410-414
60. **Lohmueller KE, Pearce CL, Pike M, Lander ES, Hirschhorn JN** 2003 Meta-analysis of genetic association studies supports a contribution of common variants to susceptibility to common disease. *Nat Genet* 33:177-182

Capítulo 2

Artigo Original: *D2 Thr92Ala and PPAR γ 2 Pro12Ala*

Polymorphisms Interact in the Modulation of Insulin Resistance

in Patients with Type 2 Diabetes Mellitus

D2 Thr92Ala and PPAR γ 2 Pro12Ala Polymorphisms Interact in the Modulation of Insulin Resistance in Patients with Type 2 Diabetes Mellitus

Aline A. F. Estivalet, Leonardo B. Leiria, Jakeline Rheinheimer, Ana L. Maia, and Daisy Crispim

Endocrine Division, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

Abbreviated title: D2 and PPAR γ 2 polymorphisms and insulin resistance

Address for correspondence and print request:

Prof. Dr. Ana L. Maia

Serviço de Endocrinologia, Setor de Tiróide, Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Rua Ramiro Barcelos 2350, Prédio 12, 4^o andar

90035-003 Porto Alegre, RS, Brazil

Phone: +55 51 33598127. Fax: + 55 51 33310207

E-mail: almaia@ufrgs.br

Keywords: type 2 deiodinase, *DIO2* gene, *PPAR γ 2* gene, insulin resistance, type 2 diabetes mellitus

Word count: 3330

Abstract:**Context and Objective:**

Type 2 deiodinase (D2) converts T4 into its active metabolite T3, an essential step in thyroid metabolism. A Thr92Ala polymorphism in the gene encoding D2 has been inconsistently associated with insulin resistance. Recently, it was reported that the D2 Thr92Ala and the PPAR γ 2 Pro12Ala polymorphisms interact in the modulation of metabolic syndrome in nondiabetic subjects, with carriers of both D2 Ala92 and PPAR γ 2 Ala12 variants showing the worst phenotype. Here, we investigated the effect of both polymorphisms, isolated or in combination, on insulin resistance in patients with type 2 diabetes mellitus (DM2).

Methods:

The D2 Thr92Ala (rs225014) and PPAR γ 2 Pro12Ala (rs1801282) polymorphisms were genotyped in 711 DM2 patients. All patients underwent physical and laboratory evaluations. Insulin resistance was evaluated using the homeostasis model assessment (HOMA) index.

Results:

The frequencies of D2 Ala12 and PPAR γ 2 Ala12 variants were 0.392 and 0.076, respectively. Patients carrying D2 Ala/Ala genotype had a higher fasting plasma insulin and HOMA index as compared to patients carrying Thr/Ala or Thr/Thr genotypes (P=0.015 and P=0.001, respectively). A significant synergistic effect was observed between D2 Thr92Ala and PPAR γ 2 Pro12Ala polymorphisms on HOMA index, with carriers of both D2 Ala/Ala genotype and PPAR γ 2 Ala12 allele showing the highest HOMA values, after adjusting for gender, age and body mass index (P=0.010).

Conclusions:

DM2 patients harboring both D2 Ala/Ala genotype and PPAR γ 2 12Ala allele present more severe insulin resistance than those with other D2/PPAR γ 2 genotype combinations. These findings suggest that these polymorphisms interact in the insulin resistance modulation, which may constitute a potential therapeutic target.

Type 2 diabetes mellitus (DM2) is a heterogeneous group of disorders usually characterized by varying degrees of insulin resistance and increased blood glucose concentrations (1). Ultimately, insulin resistance results either from uninhibited hepatic gluconeogenesis or decreased glucose disposal rate in tissues such as skeletal muscle, adipose tissue and liver (2). The type 2 iodothyronine deiodinase (D2) catalyzes the intracellular conversion of the pro-hormone thyroxine (T4) into its active metabolite triiodothyronine (T3), an essential step in thyroid hormone metabolism (3). In humans, the gene that encodes D2 (*DIO2*) is also expressed in skeletal muscle and adipocytes (4, 5), in which thyroid hormone is known to up-regulate the expression of the primary glucose transporter 4 (GLUT4), and thereby to increase basal and insulin-stimulated glucose uptake (6-8).

Previous studies have reported that a *DIO2* single nucleotide polymorphism A/G, in which a threonine (Thr) changes to alanine (Ala) at codon 92 (Thr92Ala), was associated with a ~20% lower glucose disposal rate in non-diabetic Caucasian subjects and a more pronounced insulin resistance in DM2 patients (9, 10). Moreover, decreased D2 activity has been described in tissue biopsy samples obtained from subjects homozygous for the Ala92 minor allele (10). Nevertheless, other studies failed to demonstrate an association between the D2 Thr92Ala polymorphism and glycemic traits or DM2 (11-13).

The peroxisome proliferator-activated receptor (*PPAR*) γ 2 gene encodes a transcription factor involved in the regulation of adipocyte differentiation and intracellular insulin signaling, and it is recognized as playing an important role in determining the risk of insulin resistance-related abnormalities (14-16). Of interest, in a recent study, a significant interaction was observed between the D2 Thr92Ala polymorphism and the Pro12Ala polymorphism of the *PPAR* γ 2 gene (17). This gene-

gene interaction was associated with elevated systolic and diastolic blood pressure and also with an increased risk of metabolic syndrome in 590 nondiabetic subjects from Italy. Among these subjects, carriers of both D2 Ala92 and PPAR γ 2 Ala12 alleles displayed the most severe phenotypes. This study also reported the presence of a PPAR element in the *DIO2* promoter, thus providing biological plausibility for the observed interaction (17).

Based on these observations, we hypothesized that the interaction between the D2 Thr92Ala and PPAR γ 2 Pro12Ala polymorphisms might account for part of the conflicting results on the association between the D2 Thr92Ala polymorphism and insulin resistance observed in different populations. Therefore, we decided to evaluate the potential synergistic effect of D2 Thr92Ala and PPAR γ 2 Pro12Ala polymorphisms on insulin resistance and related characteristics in a sample of White DM2 patients.

Patients and Methods

Patients and phenotype measurements

The sample population consists of DM2 patients participating in a multicenter study that started recruiting patients in Southern Brazil in 2002. That project aimed to study risk factors for DM2 and its complications. Initially, it included four centres located at general hospitals in the State of Rio Grande do Sul, namely Grupo Hospitalar Conceição, Hospital São Vicente de Paula, Hospital Universitário de Rio Grande, and Hospital de Clínicas de Porto Alegre. The detailed description of that study can be found elsewhere (18). DM2 was defined by diagnosis of diabetes after the age of 40 years with no use of insulin during the first year after diagnosis and no previous episodes of ketoacidosis (1).

The D2 Thr92Ala and PPAR γ 2 Pro12Ala polymorphisms were analyzed in blood samples from 711 DM2 patients. Insulin resistance was evaluated only in 215 patients, including a subgroup of 183 subjects previously reported (10). All patients were of European ancestry (mostly descendants of Portuguese, Spanish, Italians and Germans). The ethnic group was defined on the basis of self-classification and subjective classification (skin color, nose and lip shapes, hair texture, and family history).

A standard questionnaire was used to collect information about age, age at DM2 diagnosis, and drug treatment. All patients underwent physical and laboratory evaluations. They were weighed without shoes and in light outdoor clothes and had their height measured. Body mass index (BMI) was calculated as weight (kg) / height (meters)². To calculate waist-to-hip ratio (WHR), waist circumference was measured at the narrowest point, as viewed from the front, and hip circumference was measured at the widest point. Blood pressure (BP) was measured twice after a 5-min rest in the sitting position using a mercury sphygmomanometer (Korotkoff phases I and V). The mean value of two measurements was used to calculate systolic and diastolic BP. Hypertension was defined as BP levels \geq 140/90 mm Hg, or if the patient was taking antihypertensive drugs.

The information obtained from the study did not influence the patients' diagnosis or treatment. The protocol was approved by the Hospital ethical committees, and all patients gave their written informed consent.

Laboratory analysis

A serum sample was collected after a 12-h fast. Glucose levels were determined using the glucose oxidase method; creatinine by the Jaffé reaction; glycated hemoglobin

(GHb) by an ion-exchange HPLC procedure (Merck-Hitachi L-9100 GHb analyzer, Merck, Darmstadt, Germany; reference range: 4.7–6.0%); and total plasma cholesterol, HDL cholesterol, and triglycerides by enzymatic methods. Serum insulin was measured by radioassay (ElecsysR Systems 1010/2010/modular analytics E170, Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, USA) in a subgroup of 215 patients not having insulin therapy and with serum creatinine < 1.5 mg/dl (132.6 μ mol/l). Insulin sensitivity was estimated by homeostasis model assessment (HOMA) index [fasting insulin (micro units per milliliter) x fasting glucose (millimoles per liter) / 22.5] (19). The mean HOMA values of control subjects in our laboratory was 1.84 ± 1.02 (20).

Molecular analyses

DNA was extracted from peripheral blood leukocytes by a standardized salting-out procedure. Both D2 Thr92Ala (rs225014) and PPAR γ 2 Pro12Ala (rs1801282) polymorphisms were determined using primers and probes contained in the Human Custom TaqMan Genotyping Assay 40x (Assays-By-Design Service, Applied Biosystems, Foster City, CA; USA). Primer and probe sequences used for genotyping the D2 Thr92Ala and PPAR γ 2 Pro12Ala polymorphisms were: D2-5'-GGTACCATTGCCACTGTTGTCA-3' (forward primer), D2-5'-GTCAGGTGAAATTGGGTGAGGAT-3' (reverse primer), D2-FAM-5'-ATGTCTCCAGTGCAGAA-3', D2-VIC-5'-CATGTCTCCAGTACAGAA-3', PPAR γ 2-5'-GTTATGGGTGAACTCTGGGAGATT-3' (forward primer), PPAR γ 2-5'-GCAGACAGTGTATCAGTGAAGGAAT-3' (reverse primer), PPAR γ 2-FAM-5'-CTATTGACGCAGAAAG-3', PPAR γ 2-VIC-5'-CTCCTATTGACCCAGAAAG-3'. The reactions were conducted in a 96-well plate, in a total 5 μ l reaction volume using 2 ng of genomic DNA, TaqMan Genotyping Master Mix 1x (Applied Biosystems), and

Custom TaqMan Genotyping Assay 1x. The plates were then positioned in a real-time PCR thermal cycler (7500 Fast Real PCR System; Applied Biosystems) and heated for 10 minutes at 95°C, followed by 50 cycles of 95°C for 15 seconds and 63°C for 1 minute. Fluorescence data files from each plate were analyzed using automated allele-calling software (SDS 2.1; Applied Biosystems). Only 703 patients were successfully genotyped for both analyzed polymorphisms.

Statistical Analyses

Results are expressed as mean \pm SD, % or median (interquartile range). Allelic frequencies were determined by gene counting and departures from the Hardy-Weinberg equilibrium were verified using χ^2 tests. Clinical and laboratory characteristics were compared using ANOVA, unpaired Student's t test or χ^2 , as appropriate. Multiple linear regression analysis was performed with HOMA index (logarithmic) as dependent variable and age, gender, BMI, use of medications and D2 Thr92Ala genotypes (Thr/Thr-Thr/Ala vs. Ala/Ala) as independent variables.

Interaction between D2 Thr92Ala and PPAR γ 2 Pro12Ala polymorphisms in modulating different variables was tested by general linear model univariate analyses, followed by adjusting for covariates. In these interaction analyses, each of the two polymorphisms was modeled as dichotomous variables: D2 Thr/Thr-Thr/Ala vs. Ala/Ala, and PPAR γ 2 Pro/Pro vs. Pro/Ala-Ala/Ala. Variables with skewed distribution were logarithmically transformed before analyses. All analyses were performed in SPSS version 16.0 (SPSS, Chicago, IL, USA). $P < 0.05$ was considered statistically significant.

Results

Sample Description

The characteristics of the 711 DM2 patients analyzed in this study were as follows. The mean age was 58.7 ± 10.5 years, the median DM2 duration was 12.1 ± 9.4 years, the mean GHb was 7.35 ± 2.03 %, and the mean BMI was 28.8 ± 5.1 kg/m². Males comprised 48.1% (n = 342) of the sample, and 66.2% (n = 471) of all patients had arterial hypertension. Eighty-four patients (9.5%) were treated by diet alone. Sulfonylureas alone were used by 31.9% (n = 227), metformin alone by 34.2% (n = 243), and the combination of both by 14.6% (n = 104) of the patients.

D2 Thr92Ala polymorphism

Of the 706 patients genotyped for the D2 Thr92Ala polymorphism, 263 (37.3%) patients were homozygous for the Thr92 allele (Thr/Thr), 332 (47.0%) were heterozygous (Thr/Ala), and 111 (15.7%) were homozygous for the Ala92 allele (Ala/Ala). The Thr92 allele frequency was 0.61, and the Ala92 allele frequency was 0.39. Genotypes were in agreement with those predicted by the Hardy-Weinberg equilibrium ($P > 0.05$).

Table 1 summarizes the clinical and laboratory data of the patients grouped according to the D2 Thr92Ala polymorphism. The median fasting plasma insulin level in Ala/Ala subjects was significantly higher than in patients with the Thr/Ala or Thr/Thr genotypes ($P = 0.015$), while fasting plasma glucose levels did not differ significantly among these genotypes ($P = 0.147$). Therefore, patients carrying the Ala/Ala genotype had a higher HOMA index when compared with patients carrying Thr/Ala or Thr/Thr genotypes ($P = 0.001$). The mean age, DM2 duration, proportion of males, systolic and

diastolic blood pressure, BMI, use of medication, creatinine levels and metabolic control were not significantly different among the three different genotypes (Table 1).

Assuming a recessive model of inheritance, patients with Thr/Ala and Thr/Thr genotypes were grouped and compared with patients carrying the Ala/Ala genotype. Fasting plasma insulin levels were higher in the Ala/Ala group compared with Thr/Ala-Thr/Thr group [median 16.4 μ IU/ml (range 56.9) vs. 11.2 (44.0); $P = 0.012$]. The HOMA index also was higher in the Ala/Ala group compared with the Thr/Ala-Thr/Thr group [6.6 (34.3) vs. 3.6 (17.3); $P < 0.001$]. Because insulin sensitivity is known to be influenced by multiple independent factors, a multiple linear regression analysis was performed with HOMA index (\log_{10} HOMA) as dependent variable. The Ala/Ala genotype remained significantly associated with HOMA index after controlling for age, gender, BMI, and use of medication (standardized coefficient β for Ala/Ala genotype = -0.205, 95% confidence interval: -0.321 – 0.079; $P = 0.001$).

We then stratified the sample according to gender (males/females), BMI (above or below 30 kg/m^2) or age (above and below the mean value = 58.7 years). Interesting, by the association between the Ala/Ala genotype and HOMA index was more pronounced in females [7.4 (25.1) in the Ala/Ala group vs. 3.8 (17.3) in the Thr/Ala-Thr/Thr group; $P = 0.011$] and in the group of patients older than 58.7 years [8.2 (27.3) vs. 3.1 (11.1); $P = 0.001$]. All other variables were similar across different strata (data not shown).

PPAR γ 2 Pro12Ala polymorphism

Six-hundred and nine (85.7%) patients carried the PPAR γ 2 Pro/Pro, 97 (13.6%) the Pro/Ala, and only 5 (0.7%) the Ala/Ala genotype. The Pro12 allele frequency was

0.925, and the Ala12 allele frequency was 0.075. Genotypes were in Hardy-Weinberg equilibrium ($P > 0.05$).

Table 2 illustrates the clinical and laboratory characteristics of patients grouped according to the presence of the PPAR γ 2 12Ala allele (Pro/Pro vs. Pro/Ala-Ala/Ala). Patients carrying the PPAR γ 2 12Ala allele had a longer duration of DM2 when compared to patients with the Pro/Pro genotype (15.2 ± 8.4 vs. 13.3 ± 80.8 years; $P = 0.036$). In addition, the frequency of males was higher in the Pro/Ala-Ala/Ala group than in the Pro/Pro group (59.8% vs. 46.0%; $P = 0.013$). The PPAR γ 2 Pro12Ala polymorphism had no effect on HOMA index or other related variables.

Interaction analyses between D2 Thr92Ala and PPAR γ 2 Pro12Ala polymorphisms

Clinical and laboratory characteristics of DM2 patients carrying either the PPAR γ 2 Pro/Pro genotype or the PPAR γ 2 12Ala allele, stratified according to the D2 Thr92Ala polymorphism, are depicted in Table 3. As expected, D2 Ala/Ala carriers showed higher HOMA values as compared to patients with D2 Thr/Thr-Thr/Ala genotypes, and this result was independent of the PPAR γ 2 genotype ($P = 0.005$ in the PPAR γ 2 Pro/Pro group and $P = 0.017$ in the PPAR γ 2 12Ala group). However, a significant gene-gene interaction was observed between the D2 Thr92Ala and PPAR γ 2 Pro12Ala polymorphisms in modulating HOMA index (age-, BMI-, and gender-adjusted P value for interaction = 0.010): patients carrying both D2 Ala/Ala genotype and PPAR γ 2 12Ala allele showed a higher HOMA index (8.5 [28.2-1.3]) as compared to patients carrying other D2/PPAR γ 2 genotype combinations (4.0 [17.6-0.3] in the D2 Thr/Thr - PPAR γ 2 Pro/Pro group, 5.8 [35.2-0.9] in the D2 Ala/Ala - PPAR γ 2 Pro/Pro group, and 3.5 [17.2-0.5] in the D2 Thr/Thr - PPAR γ 2 12Ala group; (Table 3 and Figure 1).

Furthermore, among patients carrying the PPAR γ 2 12Ala allele, D2 Ala/Ala carriers had shorter DM2 duration than D2 Thr/Thr or Thr/Ala patients (age- and gender-adjusted P value for interaction = 0.006). No association was observed between both PPAR γ 2 Pro12Ala and D2 Thr92Ala polymorphisms and systolic or diastolic BP or other metabolic syndrome-related features (Table 3).

Discussion

The present study confirms a previous report by our group (10) and demonstrates that D2 Thr92Ala polymorphism is associated with insulin resistance in DM2 patients. Furthermore, we also observed a significant gene-gene interaction between D2 Thr92Ala and PPAR γ 2 Pro12Ala polymorphisms in modulating HOMA index, with patients carrying both D2 Ala/Ala genotype and PPAR γ 2 12Ala allele showing a higher HOMA index as compared to patients with other D2 Thr92Ala / PPAR γ 2 Pro12Ala genotype combinations.

The D2 Ala92 minor allele has been reported to be biologically less active than the common Thr92 variant (10). In humans, skeletal muscle and adipose tissue are the main sites of insulin-dependent glucose disposal (21). It has been hypothesized that, due to decreased D2 activity, carriers of the D2 Ala92 allele in homozygosis would have lower D2-generated T3 effect in skeletal muscle and adipocytes, which, consequently, could create a state of relative intracellular hypothyroidism, decreasing the expression of genes involved in energy use, such as GLUT4, and thus leading to insulin resistance (6, 7, 22). However, the mechanism of reduced D2 activity in D2 Ala/Ala subjects is not clear. Although, a decrease in D2 velocity has been associated with the Ala/Ala genotype, two studies failed to identify any significant changes in the biochemical

properties of the mutant D2 enzyme *in vitro*, suggesting that this polymorphism could be only a marker for abnormal *DIO2* gene expression (10, 23). Thus, it seems reasonable to speculate that the lower D2 activity is the result of linkage disequilibrium between the Thr92Ala polymorphism and a functional polymorphism elsewhere in the *DIO2* gene. It is worth mentioning that the D2 92Ala variant was also previously associated with an increased risk of symptomatic osteoarthritis (24), mental retardation in the iodine-deficient areas of China (25), Graves' disease (26), and arterial hypertension (27).

PPAR γ is member of a family of ligand-activated nuclear receptor and transcription factors, and it plays an important role in adipocyte differentiation, lipid storage and insulin sensitivity (28). It is also the target molecule for thiazolidinediones, agents that enhance sensitivity to insulin *in vivo* (28). The common Pro12Ala polymorphism is the result of a CCA to GCA mutation in codon 12 of exon B, which encodes the amino-terminal domain defining the adipocyte-specific PPAR γ 2 isoform (14, 15). The Pro12Ala polymorphism is a functional variant and exhibits *in vitro* reduced binding to DNA and modest impairment of transcriptional activity (16). The Ala12 minor allele is associated with a reduced risk of DM2 (14, 15, 29, 30), and it has been associated with lower insulin concentrations, a crude indication of greater insulin sensitivity (29). However, a recent meta-analysis of 57 studies containing data related to insulin resistance of cohorts with normal or impaired glucose tolerance revealed no significant effect of the Pro12Ala polymorphism on diabetes-related traits across all studies (31). Statistically significant effects were only detectable in selected groups. For example, in the Caucasian subgroup, BMI was greater in individuals carrying the Pro/Ala-Ala/Ala genotypes compared with the Pro/Pro genotype, and HOMA index was significantly higher in the Pro/Pro individuals compared with Pro/Ala-Ala/Ala

individuals of the obese subgroup of subjects, indicating greater insulin sensitivity in obese carriers of the Ala12 allele (31). Nevertheless, in our study, we did not observe any statistically significant association between the PPAR γ 2 Pro12Ala polymorphism and fasting plasma insulin levels, HOMA index, or other glycemic related variables.

Of interest, recently, Fiorito *et al.* (17) reported a significant interaction between the D2 Thr92Ala and PPAR γ 2 Pro12Ala polymorphisms on the modulation of metabolic syndrome. They also identified a putative peroxisome proliferator response element (PPRE) sequence at nucleotides -488 to -504 in the promoter region of human *DIO2* gene, which, similarly to the canonical PPRE motif, specifically binds to the PPAR γ 2/retinol X receptor- α complex, thus suggesting a potential role of PPAR γ 2 in the regulation of *DIO2* gene expression (17). A possible interaction between these two polymorphisms is further supported by the present study: in the presence of the PPAR γ 2 Ala12 allele, the D2 Ala/Ala genotype was associated with an impressive increase in HOMA index when compared to patients carrying other D2/PPAR γ 2 genotype combinations (Table 3 and Figure 1).

The mechanism by which the D2 Thr92Ala and PPAR γ 2 Pro12Ala polymorphisms interact is still not explained. But, since PPAR γ 2 is exclusively expressed in adipocytes, the mechanism through which the PPAR γ 2 Pro12Ala polymorphism interacts with the D2 Thr92Ala polymorphism, influencing the risk to insulin resistance, must originate in adipose tissue (32). It is worth mentioning that Grosovsky *et al.* (33) found that pioglitazone treatment led to a 1.6- to 1.9-fold increase (5 or 10 μ M, respectively) in primary human skeletal myocyte D2 activity, even in the absence of insulin, sustaining the possibility that endogenous or exogenous PPAR γ ligands could exert their metabolic effects in part by altering thyroid hormone signaling. This effect was also seen with other PPAR γ agonists, including ciglitazone and

troglitazone (\cong 1.6-fold increase for both). It remains to be determined whether the pioglitazone effect observed in this study is purely transcriptional or whether D2 activity is altered via a posttranscriptional mechanism, *e.g.* an effect on D2 ubiquitination (33).

Some factors unrelated to the D2 Thr92Ala and PPAR γ 2 polymorphisms could have interfered with the findings of the present study. First, medications for DM2 could have played a role because some are known to affect insulin sensitivity. However, we minimized such a possibility by excluding insulin-treated patients, and the proportion of patients on metformin and/or sulfonylureas was similar among different genotype groups. Furthermore, D2 Ala12 variant remained significantly associated with HOMA index in a linear regression model analysis that included use of medication as an independent variable. Second, insulin resistance was assessed by calculation of HOMA index rather than the reference method, the euglycemic-hyperinsulinemic clamp (19, 34). Although HOMA index is only an estimate of insulin resistance, it is simple to perform and shows a good correlation with the reference method (19, 34), the euglycemic clamp and, therefore, is considered a good approach for cohort and epidemiological studies (35). Third, we can not rule out the possibility of stratification bias in our sample, nevertheless we analyzed only self-defined white subjects, thus reducing the risk of false positive/negative associations due to this bias. Finally, our results could represent a type 1 error. However, the P values for HOMA index remain significant at the 0.01 level. This finding, along with the scientific plausibility of an association, provides evidence against type 1 error.

In conclusion, the D2 Thr92Ala and PPAR γ 2 Pro12Ala polymorphisms might interact in the modulation of insulin resistance in white DM2 patients. Possibly due to low levels of D2 activity in adipocytes and, consequently, a marked reduced T3

biological effect, patients with both D2 Ala/Ala genotype and PPAR γ 2 Ala12 allele showed the worst insulin resistance phenotype. This gene-gene interaction could explain part of the conflicting results reporting associations of the D2 Thr92Ala or PPAR γ 2 Pro12Ala polymorphism with insulin resistance. Although further *in vivo* and *in vitro* studies are needed to evaluate the functional and epidemiological importance of this interaction, these findings are exciting from both biological and clinical perspectives due to their potential target therapeutic implications.

Acknowledgements

This study was partially supported by grants from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), and Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos (FIPE) at Hospital de Clínicas de Porto Alegre. The authors thank Prof. Dr. Luis Henrique Canani and Prof. Dr. Jorge Luiz Gross for sharing with us the clinical data regarding the DM2 patients.

Disclosure: The authors have nothing to declare.

References

1. **American Diabetes Association** 2008 Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care* 31:S55-60
2. **Frojdo S, Vidal H, Pirola L** 2009 Alterations of insulin signaling in type 2 diabetes: a review of the current evidence from humans. *Biochim Biophys Acta* 1792:83-92
3. **Bianco AC, Salvatore D, Gereben B, Berry MJ, Larsen PR** 2002 Biochemistry, cellular and molecular biology, and physiological roles of the iodothyronine selenodeiodinases. *Endocr Rev* 23:38-89
4. **Croteau W, Davey JC, Galton VA, St Germain DL** 1996 Cloning of the mammalian type II iodothyronine deiodinase. A selenoprotein differentially expressed and regulated in human and rat brain and other tissues. *J Clin Invest* 98:405-417
5. **Salvatore D, Bartha T, Harney JW, Larsen PR** 1996 Molecular biological and biochemical characterization of the human type 2 selenodeiodinase. *Endocrinology* 137:3308-3315
6. **Weinstein SP, O'Boyle E, Haber RS** 1994 Thyroid hormone increases basal and insulin-stimulated glucose transport in skeletal muscle. The role of GLUT4 glucose transporter expression. *Diabetes* 43:1185-1189
7. **Torrance CJ, Devente JE, Jones JP, Dohm GL** 1997 Effects of thyroid hormone on GLUT4 glucose transporter gene expression and NIDDM in rats. *Endocrinology* 138:1204-1214
8. **Richardson JM, Pessin JE** 1993 Identification of a skeletal muscle-specific regulatory domain in the rat GLUT4/muscle-fat gene. *J Biol Chem* 268:21021-21027
9. **Mentuccia D, Proietti-Pannunzi L, Tanner K, Bacci V, Pollin TI, Poehlman ET, Shuldiner AR, Celi FS** 2002 Association between a novel variant of the human type 2 deiodinase gene Thr92Ala and insulin resistance: evidence of interaction with the Trp64Arg variant of the beta-3-adrenergic receptor. *Diabetes* 51:880-883
10. **Canani LH, Capp C, Dora JM, Meyer EL, Wagner MS, Harney JW, Larsen PR, Gross JL, Bianco AC, Maia AL** 2005 The type 2 deiodinase A/G (Thr92Ala) polymorphism is associated with decreased enzyme velocity and increased insulin resistance in patients with type 2 diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab* 90:3472-3478
11. **Grarup N, Andersen MK, Andreasen CH, Albrechtsen A, Borch-Johnsen K, Jorgensen T, Auwerx J, Schmitz O, Hansen T, Pedersen O** 2007 Studies of the common DIO2 Thr92Ala polymorphism and metabolic phenotypes in 7342 Danish white subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 92:363-366
12. **Maia AL, Dupuis J, Manning A, Liu C, Meigs JB, Cupples LA, Larsen PR, Fox CS** 2007 The type 2 deiodinase (DIO2) A/G polymorphism is not

associated with glycemic traits: the Framingham Heart Study. *Thyroid* 17:199-202

13. **Mentuccia D, Thomas MJ, Coppotelli G, Reinhart LJ, Mitchell BD, Shuldiner AR, Celi FS** 2005 The Thr92Ala deiodinase type 2 (DIO2) variant is not associated with type 2 diabetes or indices of insulin resistance in the old order of Amish. *Thyroid* 15:1223-1227
14. **Stumvoll M, Haring H** 2002 The peroxisome proliferator-activated receptor-gamma2 Pro12Ala polymorphism. *Diabetes* 51:2341-2347
15. **Altshuler D, Hirschhorn JN, Klannemark M, Lindgren CM, Vohl MC, Nemesh J, Lane CR, Schaffner SF, Bolk S, Brewer C, Tuomi T, Gaudet D, Hudson TJ, Daly M, Groop L, Lander ES** 2000 The common PPARgamma Pro12Ala polymorphism is associated with decreased risk of type 2 diabetes. *Nat Genet* 26:76-80
16. **Deeb SS, Fajas L, Nemoto M, Pihlajamaki J, Mykkanen L, Kuusisto J, Laakso M, Fujimoto W, Auwerx J** 1998 A Pro12Ala substitution in PPARgamma2 associated with decreased receptor activity, lower body mass index and improved insulin sensitivity. *Nat Genet* 20:284-287
17. **Fiorito M, Torrente I, De Cosmo S, Guida V, Colosimo A, Prudente S, Flex E, Menghini R, Miccoli R, Penno G, Pellegrini F, Tassi V, Federici M, Trischitta V, Dallapiccola B** 2007 Interaction of DIO2 T92A and PPARgamma2 P12A polymorphisms in the modulation of metabolic syndrome. *Obesity (Silver Spring)* 15:2889-2895
18. **Canani LH, Capp C, Ng DP, Choo SG, Maia AL, Nabinger GB, Santos K, Crispim D, Roisemberg I, Krolewski AS, Gross JL** 2005 The fatty acid-binding protein-2 A54T polymorphism is associated with renal disease in patients with type 2 diabetes. *Diabetes* 54:3326-3330
19. **Bonora E, Targher G, Alberiche M, Bonadonna RC, Saggiani F, Zenere MB, Monauni T, Muggeo M** 2000 Homeostasis model assessment closely mirrors the glucose clamp technique in the assessment of insulin sensitivity: studies in subjects with various degrees of glucose tolerance and insulin sensitivity. *Diabetes Care* 23:57-63
20. **Seligman BG, Biolo A, Polanczyk CA, Gross JL, Clausell N** 2000 Increased plasma levels of endothelin 1 and von Willebrand factor in patients with type 2 diabetes and dyslipidemia. *Diabetes Care* 23:1395-1400
21. **Muoio DM, Newgard CB** 2008 Mechanisms of disease: molecular and metabolic mechanisms of insulin resistance and beta-cell failure in type 2 diabetes. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9:193-205
22. **Weinstein SP, O'Boyle E, Fisher M, Haber RS** 1994 Regulation of GLUT2 glucose transporter expression in liver by thyroid hormone: evidence for hormonal regulation of the hepatic glucose transport system. *Endocrinology* 135:649-654
23. **Peeters RP, van Toor H, Klootwijk W, de Rijke YB, Kuiper GG, Uitterlinden AG, Visser TJ** 2003 Polymorphisms in thyroid hormone pathway genes are associated with plasma TSH and iodothyronine levels in healthy subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 88:2880-2888

24. **Meulenbelt I, Min JL, Bos S, Riyazi N, Houwing-Duistermaat JJ, van der Wijk HJ, Kroon HM, Nakajima M, Ikegawa S, Uitterlinden AG, van Meurs JB, van der Deure WM, Visser TJ, Seymour AB, Lakenberg N, van der Breggen R, Kremer D, van Duijn CM, Kloppenburg M, Loughlin J, Slagboom PE** 2008 Identification of DIO2 as a new susceptibility locus for symptomatic osteoarthritis. *Hum Mol Genet* 17:1867-1875
25. **Guo TW, Zhang FC, Yang MS, Gao XC, Bian L, Duan SW, Zheng ZJ, Gao JJ, Wang H, Li RL, Feng GY, St Clair D, He L** 2004 Positive association of the DIO2 (deiodinase type 2) gene with mental retardation in the iodine-deficient areas of China. *J Med Genet* 41:585-590
26. **Chistiakov DA, Savost'anov KV, Turakulov RI** 2004 Screening of SNPs at 18 positional candidate genes, located within the GD-1 locus on chromosome 14q23-q32, for susceptibility to Graves' disease: a TDT study. *Mol Genet Metab* 83:264-270
27. **Gumieniak O, Perlstein TS, Williams JS, Hopkins PN, Brown NJ, Raby BA, Williams GH** 2007 Ala92 type 2 deiodinase allele increases risk for the development of hypertension. *Hypertension* 49:461-466
28. **Ahmed W, Ziouzenkova O, Brown J, Devchand P, Francis S, Kadakia M, Kanda T, Orasanu G, Sharlach M, Zandbergen F, Plutzky J** 2007 PPARs and their metabolic modulation: new mechanisms for transcriptional regulation? *J Intern Med* 262:184-198
29. **Tonjes A, Stumvoll M** 2007 The role of the Pro12Ala polymorphism in peroxisome proliferator-activated receptor gamma in diabetes risk. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 10:410-414
30. **Lohmueller KE, Pearce CL, Pike M, Lander ES, Hirschhorn JN** 2003 Meta-analysis of genetic association studies supports a contribution of common variants to susceptibility to common disease. *Nat Genet* 33:177-182
31. **Tonjes A, Scholz M, Loeffler M, Stumvoll M** 2006 Association of Pro12Ala polymorphism in peroxisome proliferator-activated receptor gamma with Pre-diabetic phenotypes: meta-analysis of 57 studies on nondiabetic individuals. *Diabetes Care* 29:2489-2497
32. **Sharma AM, Staels B** 2007 Review: Peroxisome proliferator-activated receptor gamma and adipose tissue--understanding obesity-related changes in regulation of lipid and glucose metabolism. *J Clin Endocrinol Metab* 92:386-395
33. **Grozovsky R, Ribich S, Rosene ML, Mulcahey MA, Huang SA, Patti ME, Bianco AC, Kim BW** 2009 Type 2 deiodinase expression is induced by peroxisomal proliferator-activated receptor-gamma agonists in skeletal myocytes. *Endocrinology* 150:1976-1983
34. **Emoto M, Nishizawa Y, Maekawa K, Hiura Y, Kanda H, Kawagishi T, Shoji T, Okuno Y, Morii H** 1999 Homeostasis model assessment as a clinical index of insulin resistance in type 2 diabetic patients treated with sulfonylureas. *Diabetes Care* 22:818-822
35. **Wallace TM, Levy JC, Matthews DR** 2004 Use and abuse of HOMA modeling. *Diabetes Care* 27:1487-1495

TABLE 1. Clinical and laboratory characteristics of DM2 patients grouped according to D2 Thr92Ala genotype

	D2 Thr92Ala			P ^a
	Thr/Thr (n = 263)	Thr/Ala (n = 332)	Ala/Ala (n = 111)	
Age (years)	60.4 ± 9.4	60.9 ± 9.9	58.3 ± 9.4	0.076
Duration of diabetes (years) ^b	12.0 (47 – 1)	12.0 (56 – 1)	13.0 (31 – 1)	0.726
Gender (% males)	48.3	49.4	41.4	0.339
SU/Met/SU + Met (%)	32.4/33.0/13.2	29.6/34.0/13.5	34.2/35.5/17.0	0.969
Systolic BP (mm Hg)	143.1 ± 23.1	144.0 ± 25.0	141.1 ± 21.5	0.549
Diastolic BP (mm Hg)	84.3 ± 12.7	85.7 ± 13.0	85.3 ± 13.6	0.422
BMI (kg/m ²)	28.5 ± 4.4	29.0 ± 5.3	28.8 ± 4.9	0.478
WHR	0.97 ± 0.07	0.95 ± 0.08	0.95 ± 0.08	0.237
FPG (mg/dl) [(mmol/l)]	161.6 ± 60.7 [(9.0 ± 3.4)]	166.9 ± 63.8 [(9.3 ± 3.5)]	178.0 ± 70.0 [(9.9 ± 3.9)]	0.147
GHb (%)	6.85 ± 1.77	6.82 ± 1.89	7.18 ± 1.63	0.233
Total cholesterol (mg/dl) [(mmol/l)]	210.4 ± 8.0 [(5.4 ± 1.2)]	209.7 ± 45.8 [(5.4 ± 1.2)]	214.2 ± 53.7 [(5.5 ± 1.4)]	0.748
HDL cholesterol (mg/dl) [(mmol/l)]	45.4 ± 11.6 [(1.2 ± 0.3)]	45.5 ± 11.9 [(1.2 ± 0.3)]	44.5 ± 10.1 [(1.1 ± 0.3)]	0.744

Cont. TABLE 1

Triglycerides (mg/dl) [(mmol/l)] ^b	145 (496.0 – 27.0)	148 (572.0 – 47.0)	153 (573.0 – 45)	0.442
	[1.6 (5.6 – 0.3)]	[1.7 (6.4 – 0.5)]	[1.7 (6.5 – 0.5)]	
Serum creatinine (mg/dl) [(μmol/l)] ^b	0.9 (10.6 – 0.3)	0.9 (8.5 – 0.4)	0.9 (4.9 – 0.6)	0.464
	[79.6 (937.0 – 26.5)]	[80.4 (751.4 – 35.4)]	[79.6 (433.2 – 53)]	
Fasting insulin (μIU/ml) [(pmol/l)] ^{b,c}	11.0 (40.4 – 1.0)	11.3 (45.0 – 1.0)	16.4 (60.2 – 3.2)	0.015
	[66.0 (242.4 – 6.0)]	[68.0 (270.0 – 6.0)]	[98.4 (361.2 – 19.2)]	
HOMA index ^{b,c}	3.7 (17.6 – 0.3)	3.5 (14.0 – 0.3)	6.6 (35.2 – 0.9)	0.001

Data are mean ± SD, median (interquartile range) or %. SU, sulfonylureas; Met, metformin; BP, blood pressure; WHR, waist-to-hip ratio; FPG, fasting plasma glucose; GHb, glycated hemoglobin; HOMA, homeostasis model assessment. ^a P values were computed by χ^2 or ANOVA tests, as appropriate. ^b Variables which were logarithmically transformed before analyses. ^c For comparisons of fasting insulin and HOMA levels among D2 Thr92Ala genotypes we analyzed only 81 Thr/Thr, 89 Thr/Ala, and 45 Ala/Ala subjects.

TABLE 2. Clinical and laboratory characteristics of DM2 patients subdivided according to PPAR γ 2 Pro12Ala genotypes

	PPAR γ 2 Pro12Ala		P ^a
	Pro/Pro (n = 609)	Pro/Ala - Ala/Ala (n = 102)	
Age (years)	60.2 \pm 9.7	61.2 \pm 9.5	0.358
Duration of diabetes (years) ^b	12.0 (56 – 1)	14.5 (51 – 3)	0.036
Gender (% males)	46.0	59.8	0.013
SU/Met/SU + Met (%)	31.5/35.6/12.5	31.9/25.0/9.9	0.546
Systolic BP (mm Hg)	142.9 \pm 24.0	144.5 \pm 23.1	0.556
Diastolic BP (mm Hg)	84.8 \pm 13.1	86.4 \pm 12.1	0.277
BMI (kg/m ²)	28.9 \pm 5.0	28.1 \pm 4.5	0.181
WHR	0.93 \pm 0.11	0.96 \pm 0.07	0.277
FPG (mg/dl) [(mmol/l)]	165.9 \pm 64.7 [(9.2 \pm 3.6)]	172.9 \pm 64.6 [(9.6 \pm 3.6)]	0.357
GHb (%)	6.9 \pm 1.8	6.6 \pm 1.8	0.209
Total cholesterol (mg/dl) [(mmol/l)]	210.9 \pm 46.9 [(5.4 \pm 1.2)]	208.6 \pm 54.5 [(5.4 \pm 1.4)]	0.697
HDL cholesterol (mg/dl) [(mmol/l)]	45.3 \pm 11.4 [(1.2 \pm 0.3)]	45.1 \pm 12.1 [(1.2 \pm 0.3)]	0.899
Triglycerides (md/dl) [(mmol/l)] ^b	148 (573.0 – 27.0) [1.7 (6.5 – 0.3)]	143 (512 – 45) [1.6 (5.8 – 0.5)]	0.420

Cont. TABLE 2

Serum creatinine (mg/dl) [($\mu\text{mol/l}$)] ^b	0.9 (16.6 – 0.3)	1.0 (6.8 – 0.6)	0.626
	[79.6 (1467.4 – 26.5)]	[88.4 (601.1 – 53.0)]	
Fasting insulin ($\mu\text{IU/ml}$) [(pmol/l)] ^{b,d}	11.7 (50.2 – 1.0)	9.5 (60.2 – 1.0)	0.559
	[70.2 (301.2 – 6.0)]	[57.0 (361.2 – 6.0)]	
HOMA index ^{b,d}	4.0 (35.2 – 0.3)	3.9 (28.2 – 0.5)	0.548

Data are mean \pm SD, median (interquartile range) or %. SU, sulfonylureas; Met, metformin; BP, blood pressure; WHR, waist-to-hip ratio; FPG, fasting plasma glucose; GHb, glycated hemoglobin; HOMA, homeostasis model assessment. ^a P values were computed by χ^2 or Student's t tests, as appropriate. ^c Variables which were logarithmically transformed before analyses. ^d For comparisons of fasting insulin and HOMA levels among PPAR γ 2 Pro12Ala genotypes we analyzed only 176 Pro/Pro, and 39 Pro/Ala or Ala/Ala subjects.

TABLE 3. Interaction analyses between D2 Thr92Ala and PPAR γ 2 Pro12Ala polymorphisms

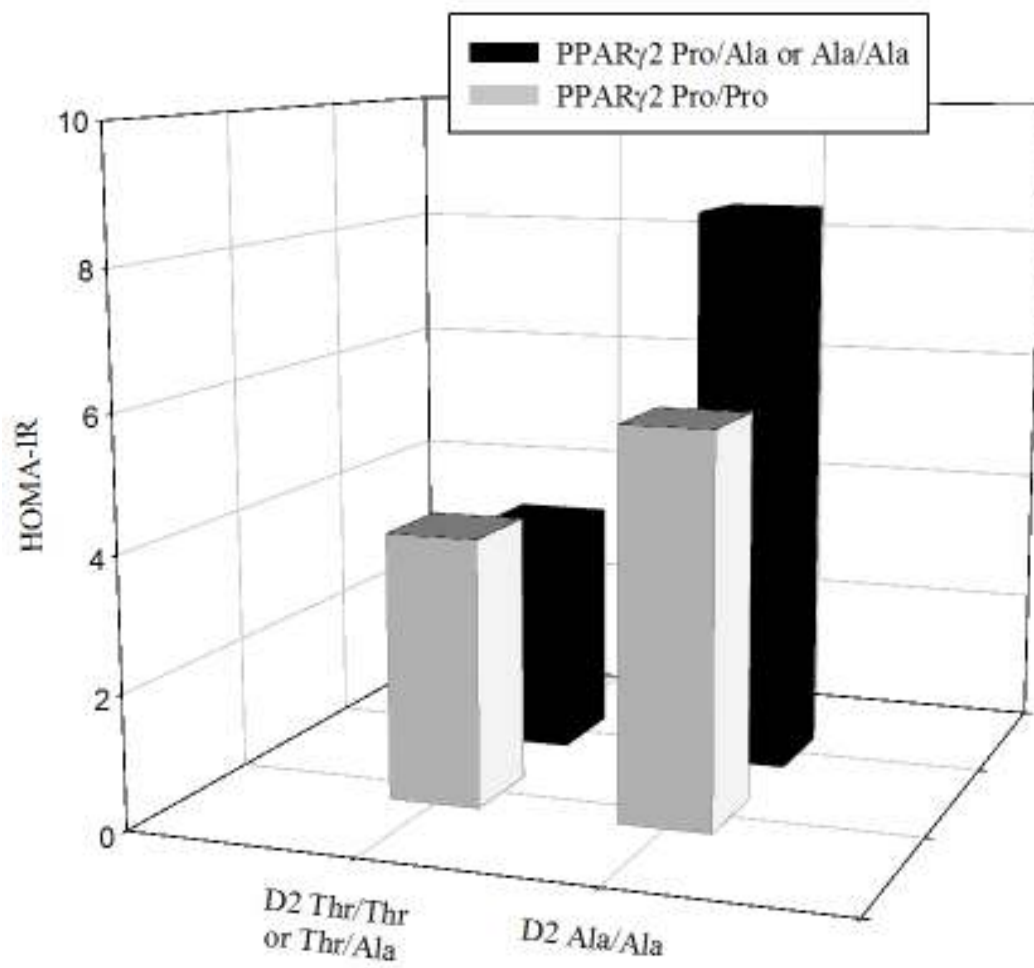
D2 Thr92Ala	PPAR γ 2 Pro12Pro			PPAR γ 2 12Ala		
	Thr/Thr-Thr/Ala (n = 510)	Ala/Ala (n = 99)	P ^a	Thr/Thr-Thr/Ala (n = 82)	Ala/Ala (n = 15)	P ^b
Age (years)	60.5 \pm 9.7	58.5 \pm 9.6	-	61.6 \pm 9.6	57.8 (9.1)	-
Duration of diabetes (years) ^b	11.5 (56 - 1)	13.5 (31 - 1)	0.985	16.0 (51 - 3)	11.0 (18 - 4)	0.006
Gender (% males)	47.4	39.4	-	58.5	54.5	-
Systolic BP (mm Hg)	144.0 \pm 24.5	144.1 \pm 22.7	0.840	146.4 \pm 24.9	132.3 \pm 11.9	0.099
Diastolic BP (mm Hg)	85.3 \pm 13.2	86.7 \pm 13.9	0.723	86.8 \pm 12.7	83.5 \pm 11.0	0.340
BMI (kg/m ²)	28.8 \pm 5.0	29.1 \pm 4.9	0.900	27.9 \pm 4.3	28.0 \pm 5.8	0.560
WHR	0.97 \pm 0.07	0.95 \pm 0.07	0.068	0.96 \pm 0.06	0.94 \pm 0.12	0.654
FPG (mg/dl) [(mmol/l)]	166.7 \pm 63.6[(9.2 \pm 3.5)]	180.0 \pm 71.9 [(10.0 \pm 4.0)]	0.094	170.5 \pm 65.3 [(9.5 \pm 3.6)]	187.2 \pm 58.4 [(10.4 \pm 3.2)]	0.459
						0.915

Cont. TABLE 3

GHb (%)	6.81 ± 1.87	7.17 ± 1.70	0.137	6.57 ± 1.87	7.17 ± 1.59	0.263	0.704
Total cholesterol (mg/dl)	210.6 ± 45.8	216.8 ± 55.4	0.351	210.9 ± 58.4	212.0 ± 54.9	0.762	0.679
[(mmol/l)]	[(5.4 ± 1.2)]	[(5.6 ± 1.4)]		[(5.4 ± 1.5)]	[(5.5 ± 1.4)]		
HDL cholesterol (mg/dl)	44.6 ± 11.6	43.5 ± 9.8	0.211	44.8 ± 12.3	45.8 ± 11.7	0.249	0.426
[(mmol/l)]	[(1.1 ± 0.3)]	[(1.1 ± 0.2)]		[(1.1 ± 0.3)]	[(1.2 ± 0.3)]		
Triglycerides (mg/dl)	148.0 (572.0 – 27.0)	151.5 (573.0 – 47.0)	0.248	143 (512.0 – 47.0)	167 (336.0 – 45.0)	0.790	0.818
[(mmol/l)] ^c	[1.7 (6.4 – 0.3)]	[1.7 (6.5 – 0.5)]		[1.6 (5.8 – 0.5)]	[1.9 (3.8 – 0.5)]		
Serum creatinine (mg/dl)	0.9 (10.6 – 0.3)	0.9 (4.9 – 0.6)	0.627	1.0 (6.8 – 0.6)	0.8 (1.3 – 0.6)	0.157	0.430
[(μmol/l)] ^c	[79.6 (937.0 – 6.5)]	[79.6 (433.2 – 3.0)]		[88.4 (601.1 – 53.0)]	[70.7 (115.0 – 53.0)]		
Fasting insulin (μIU/ml)	11.3 (45.0 – 1.0)	15.7 (50.2 – 3.8)	0.063	8.8 (40.4 – 1)	17.7 (60.2 – 3.2)	0.081	0.117
[(pmol/l)] ^{c,d}	[68.0 (270.0 – 6.0)]	[94.2 (301.2 – 3.0)]		[53.0 (242.4 – 6.0)]	[106.2 (361.2 19.2)]		
HOMA index ^{c,d}	4.0 (17.6 – 0.3)	5.8 (35.2 – 0.9)	0.005	3.5 (17.2 – 0.5)	8.5 (28.2 – 1.3)	0.017	0.010

Data are mean \pm SD, median (interquartile range) or %. BP, blood pressure; WHR, waist-to-hip ratio; FPG, fasting plasma glucose; GHb, glycated hemoglobin; HOMA, homeostasis model assessment. ^a Data were analyzed after adjusting for age and gender for most of the analyzed variables, with exception of fasting insulin and HOMA index, which were also adjusted for BMI. ^b P value for interaction, after adjusting for age and gender for most of the analyzed variables or age, gender and BMI for fasting insulin and HOMA index. ^c Variables which were logarithmically transformed before analyses. ^d For comparisons of fasting insulin and HOMA index among D2 Thr92Ala genotypes we analyzed only 146 Thr/Thr-Thr/Ala and 30 Ala/Ala subjects in the PPAR γ 2 Pro12Pro group, and 24 Thr/Thr-Thr/Ala and 12 Ala/Ala in the PPAR γ 2 12Ala group.

Figure 1: HOMA index, calculated as described in *Patients and Methods*, in DM2 patients according to D2 Thr92Ala and PPAR γ 2 Pro12Ala polymorphisms. Age-, BMI-, and gender-adjusted interaction P value (general linear model univariate analysis) = 0.010.



Anexo

FICHA CLÍNICA DE AVALIAÇÃO DO PACIENTE DIABÉTICO

DM n°: _____ Hospital: _____ Prontuário: _____ Data: ___/___/___

1. IDENTIFICAÇÃO

Nome: _____	
Fone 1: _____	Fone 2: _____
Sexo: <input type="checkbox"/> 1- masculino 2- feminino	
Data de nascimento: ___/___/___	Idade: _____
Estado civil: _____	
Endereço: _____	Bairro: _____
Cidade: _____	Estado: _____
CEP: _____	Entrevistador: _____

Grupo étnico (impressão do examinador): 1- caucasóide 2- negróide 3- outro

Entre as seguintes opções, como você se classifica em relação a cor da pele ?

1- branco 2- negro 3- mulato 4- oriental 5- índio 6- outros

Origem dos avós/bisavós (Europa, África, Ásia - se possível, especificar o país):

2. DADOS DE DIAGNÓSTICO

Qual sua idade quando descobriu o diabetes: ? ___ ou Data do diagnóstico: ___/___/___

Na ocasião do diagnóstico do DM, você foi internado? 1-sim 2-não

Motivo:

Qual o seu tratamento para o DM?

- 1- apenas dieta 4 - Glitazonas 5- sulf + metf 8- insulina
2- sulfoniluréia 6- sulfoniluréia + outros 9- agente + insulina
3- metformina 7- metformina + agente oral 10- outros

Se insulina, quanto tempo após o diagnóstico do DM? _____ anos _____ meses

Diagnóstico ou impressão do examinador: Tipo de DM

- 1- DM tipo 1 2- DM tipo 2 3- DMG 9 - Não classificável

Outros medicamentos (quais e tempo de uso):

Sr(a) fuma atualmente? 1- sim 2- não

Se **sim**, quantos cigarros por dia? ____ Com que idade começou a fumar? _____ anos

Tipo de fumo: 1- cigarro 2- charuto 3- cachimbo

Se não fuma, o Sr(a) já fumou? (fumo passado) 1- sim 2- não

Se **sim**, quantos cigarros por dia? _____ Com que idade começou a fumar? _____ anos

Há quanto tempo parou de fumar? _____ anos _____ meses

Tipo de fumo: 1- cigarro 2- charuto 3- cachimbo

FUMO 1- Nunca fumou 2- Ex-fumante 3- Fumante

Faz uso de bebidas alcoólicas? 1- sim 2- não

Em caso positivo, qual a frequência, a quantidade e o tipo de bebida (por semana)?

Se **Sim**, responda às perguntas abaixo (questionário CAGE):

1- Alguma vez você já sentiu que deveria parar de beber? 1- sim 2- não

2- Alguma vez as pessoas o incomodaram criticando seu jeito de beber? 1- sim 2- não

3- Alguma vez você se sentiu mal (ou culpado) a respeito da bebida? 1- sim 2- não

4- Alguma vez você bebeu logo ao acordar para acalmar os nervos ou se livrar de uma ressaca? 1- sim 2- não

Conclusão CAGE: 1- positivo (2 ou + respostas afirmativas às perguntas acima)
2 – negativo

Hepatite	1-sim 2-não	HIV	1- sim	2- não
Outras		doenças		(listar):

3. HÁBITOS ALIMENTARES

Uso de adoçantes: Não Sim Quantas gotas por dia?

Ingestão de refrigerantes: Não Sim Quanto por dia?

Ingestão de café: Não Sim Quantas xícaras pequenas por dia?

Ingestão de chá: Não Sim Quantas xícaras por dia? _____

Chimarrão: Não Sim Com que frequência?

Ingestão de frutas, verduras e legumes: Não Sim Com que frequência?

Ingestão de carne vermelha: Não Sim Quantas vezes por semana? -

Ingestão de carne branca: Não Sim Qual(is) e quantas vezes por semana?

Vacina(s) nos últimos doze meses (quais e quantas vezes):

Uso de vitamina(s) nos últimos seis meses (tipo, dose, frequência):

4. ATIVIDADES

Profissão (atividades nos últimos dez anos): _____

Exposição a raios-X nos últimos dez anos (quantas vezes?):

Exercício físico: Não Sim Tipo de atividade e frequência (se parou, incluir há quanto tempo): _____

5. HISTÓRIA FAMILIAR

(Avaliação de história familiar de diabetes, pressão alta, problemas cardíacos e problemas renais)

Definir como presença (SIM) quando:

- Diabetes: diagnóstico estabelecido ou tratamento com medicamentos específicos.
- Pressão alta: diagnóstico estabelecido ou tratamento com medicamentos específicos.
- Coração: história de infarto, angina ou morte súbita, relato médico/exames de isquemia ou procedimentos de revascularização miocárdica.
- Rins: história de diálise, ou tratamento para insuficiência renal em centro especializado, relato médico ou exames laboratoriais.
- Derrame: história e/ou seqüelas compatíveis.

5.1. INFORMAÇÃO DOS PAIS:

O pai e a mãe são vivos? PAI 1- sim 2- não MÃE 1- sim 2- não

Se falecidos, de que? PAI: _____ MÃE: _____

O seu pai e/ou mãe tem/tiveram?

	idade atual	diabete	derrame	coração	pressão alta	rim
pai						
mãe						

Outra(s) doença(s), qual(is)?

5.2. INFORMAÇÃO DOS IRMÃOS:

O Sr.(a) tem irmãos/irmãs? 1- sim 2- não Se sim, quantos? ___irmãos e ___ irmãs

Listar o nome dos irmãos, idade e perguntar: **O(s) seu(s) irmão(s) tem/tiveram?**

nome	Sexo	idade	vivo	diabetes	derrame	coração	Hipertensão	rim
1-								
2-								
3-								
4-								
5-								
6-								
7-								
8-								
9-								
10-								

5.3. OUTROS FAMILIARES DIABÉTICOS*:

Lado materno da família:

Avó 1-sim 2 -não 9- não sabe

Avô 1-sim 2-não 9- não sabe

Tia, tio(s) 1-sim 2 -não 0-não sabe (Se sim, quantas (os) com DM _____)

Lado paterno da família:

Avó 1-sim 2 -não 9- não sabe

Avô 1-sim 2-não 9- não sabe

Tia, tio(s) 1-sim 2 -não 0-não sabe (Se sim, quantas (os) com DM _____)

Outros: _____

Especificar tipo de diabetes, sexo e número de afetados em cada lado da família.

5.4. DEFICIÊNCIA AUDITIVA:

Probando: 1-sim 2- não Tempo? _____

Familiares*: Lado materno da família: _____

Lado paterno da família: _____

* especificar sexo, número de afetados e o tempo de surdez.

6. EXAME FÍSICO

Peso: _____ kg Altura: _____ m IMC: _____ kg/m²

Especificar qual era o peso no período em que o diabetes foi diagnosticado?

Cintura: _____ cm Quadril: _____ cm Relação C/Q: _____

Hipertensão: 1- sim 2- não Uso de anti-hipertensivos: 1- sim 2- não

Especificar medicamento(s), dose e tempo de uso: _____

Pressão 1: ___ / ___ mmHg Pressão 2: ___ / ___ mmHg Pressão 3: ___ / ___ mmHg

Palpação de pulsos periféricos: 1- palpável 2- não palpável

	MID	MIE
tibial posterior		
Pedioso		

7. AVALIAÇÃO LABORATORIAL

DATA(S)					
Glicose (mg/dl)					
Glico-hemoglobina (%)					
Frutosamina (mmol/L)					
Colesterol total (mg/dl)					
HDL (mg/dl)					
Triglicerídeos (mg/dl)					
LDL (mg/dl)					
Proteína C (mg/L)*					
Albumina (g/dl)*					
Peptídeo C (ng/ml)*					
Insulina (uUI/ml)*					
Uréia (mg/dl)					
Creatinina (mg/dl)					
Albuminúria- amostra (mg/L)					
exc urinária de album (ug/min)					
Uréia urinária (g/24h)*					
QUE hematúria					
QUE proteinúria					
QUE-leucócitos /campo					
Urocultura **					

* protocolos específicos ou quando indicados

** realizar apenas se EQU (qualitativo de urina) alterado

Ecografia de rins: (se disponível)

Laudo:

Data: ___ / ___ / ___

9. AVALIAÇÃO OFTALMOLÓGICA

DATA(s)						
oftalmoscopia direta/indireta ^c	OD OE					
angiografia ^d	OD OE					
fotocoagulação com laser ^e	OD OE					
examinador ^g						
Observações						

0- normal: 1-não proliferativa leve: 2-Não proliferativa grave 3:proliferativa

Obs: Descrição detalhada em anexo para o médico oftalmologista

10. AVALIAÇÃO DE NEUROPATIA PERIFÉRICA**Força muscular e exame físico específico:** presente = 0 ausente = 1

	direito	esquerdo
Reflexos profundos		
Aquileu		
Sensibilidade vibratória		
Hálux		
Index		
Pin-prick (agulha cabo/ponta)		
Hálux		
Index		
Monofilamente (10 g)		
Hálux		
Index		

Caminhar calcanhares		
-----------------------------	--	--

Escore de sinais de exame físico (somar os pontos dos itens acima) = **MID**

MIE

Neuropatia periférica presente se: somatório dos sinais de exame físico ≥ 3 tanto à DIREITA quanto à ESQUERDA **OU** apenas dificuldade de deambular nos calcanhares.

Conclusão: Diagnóstico de Neuropatia Periférica: 1- sim 2- não

Data: ___/___/___

11. AVALIAÇÃO CARDIOVASCULAR

11.1. QUESTIONÁRIO CARDIOVASCULAR (*Questionário Rose*):

A) Angina (dor no peito aos esforços)

1- Você teve **qualquer** tipo de dor ou desconforto no peito?

sim (1) não (2) **Se não, vá para o item C.**

A partir daqui, se a resposta escolhida estiver marcada com asterisco vá direto ao item “B”.

2- Tem dor quando **sobe escada/ lomba** ou caminha rápido?

sim (1) não (2)* Nunca se apressa ou sobe degraus (3)

3- Você tem dor no peito quando caminha a **passo normal em nível plano**? sim (1)
não (2)

4- **O que você faz** se tem a dor enquanto está caminhando?

- pára ou diminui a marcha (1) - continua caminhando igual (2)*

5- Se você permanece imóvel, o que acontece? - a dor alivia (1) - a dor não alivia (2)*

6- Quanto **tempo** leva? 10 minutos ou menos (1) mais de 10 minutos (2)*

7- **Pode me mostrar onde é a dor?**

esterno região superior ou média (1)

esterno na região inferior (2)

- tórax anterior esquerdo (3) braço esquerdo (4) - outra(s) (5)
- 8- Você sente mais alguma coisa? sim (1) não (2)

B) Possível IAM

- 9- Você já teve forte dor no peito por meia hora ou tempo mais prolongado? sim (1)
 não (2)

C) Claudicação intermitente

A partir daqui, se a resposta escolhida estiver **marcada com asterisco**, não prosseguir.

- 10- Você tem dores nas pernas ao caminhar? sim (1) **não (2)***

- 10) Em que perna? direita (1) esquerda (2)

- 11- Esta dor sempre inicia quando você está imóvel ou sentado? **sim (1)*** não (2)

- 12- Em que parte da sua perna você sente a dor?

- a dor inclui a panturrilha (1) - **a dor não inclui a panturrilha (2)***

se a panturrilha não for mencionada, perguntar: Algum outro local mais?

- 13- Tem dor quando sobe escada/lomba ou caminha rápido? sim (1) **não (2)***

- 14- Você sente a dor quando caminha a passo normal em nível plano? sim (1) não (2)

- 15- A dor sempre desaparece enquanto você está caminhando? sim (1)* não (2)

- 16- O que você faz se tem a dor enquanto está caminhando?

- pára ou diminui a marcha (1) - **continua caminhando igual (2)***

- 17- O que acontece com a dor se você permanece imóvel? - a dor alivia (1) - **a dor não alivia (2)***

- 18- Em quanto tempo? 10 minutos ou menos (1) mais de 10 minutos (2)

INTERPRETAÇÃO:

ANGINA PECTORIS (indivíduos que respondem a todas perguntas como segue):

- 1- sim 2- ou 3- sim 4- pára ou diminui 5- alivia 6- 10 minutos ou menos

7- esterno (superior, inferior ou médio) OU tórax anterior E braço esquerdo.

POSSÍVEL INFARTO (indivíduos que respondem como segue): 9- sim (1)

CONCLUSÃO QUESTIONÁRIO ROSE:

1- ausência de cardiopatia isquêmica 2- angina pectoris 3- possível infarto

CLAUDICAÇÃO INTERMITENTE (indivíduos que respondem a todas perguntas como segue):

3- sim 10- sim 11- não 12- inclui a panturrilha 13- ou 14- sim 15- não

16- pára ou diminui 17- alivia 18- 10 minutos ou menos

Claudicação intermitente 1-sim 2-nao

ACIDENTE VASCULAR CEREBRAL: 1- sim 2- não (história, seqüela ou imagem)

11.2. ELETROCARDIOGRAMA DE REPOUSO:

CÓDIGO MINNESOTA: Critérios diagnósticos de cardiopatia isquêmica (OMS)

0 - ausente 1 - presente

“PADRÕES Q E QS”

PAREDE ANTERO-LATERAL (derivações DI, aVL, V₆):

PAREDE POSTERIOR (INFERIOR) - derivações DII, DIII, aVF:

PAREDE ANTERIOR (derivações V₁, V₂, V₃, V₄ e V₅):

“ONDA T”

SÍTIO ANTERO-LATERAL (derivações DI, aVL, V₆):

PAREDE INFERIOR (derivações DII, DIII e aVF):

PAREDE ANTERIOR (derivações V₂, V₃, V₄ e V₅):

“SEGMENTO ST”

SÍTIO ANTERO-LATERAL (derivações DI, aVL e V₆):

PAREDE INFERIOR (derivações DII, DIII e aVF):

PAREDE INFERIOR (derivações DII, DIII e aVF):

“DEFEITO DE CONDUÇÃO VENTRICULAR”

BLOQUEIO COMPLETO DE RAMO ESQUERDO

CONCLUSÃO: **Data:** ____ / ____ / ____ **1- Normal 2- Anormal:**

2.1. provável infarto agudo do miocárdio: presença de onda Q (grande ou média) [1.1, 1.2] ou bloqueio completo de ramo esquerdo [7.1];

2.2. e/ou possível isquemia miocárdica: onda Q pequena [1.3] ou qualquer anormalidade no segmento ST [4.1, 4.2, 4.3] se acompanhadas por anormalidades da onda T [5.1 ou 5.2 ou 5.3].

11.3. ELETROCARDIOGRAMA DE ESFORÇO: 1- sim 2- não

Suspensão de fármacos que influenciem a frequência cardíaca: 1- sim 2- não

Listar fármacos suspensos:

Laudo:

Conclusão: _____ **Data:** ___/___/___

11.4. CINTILOGRAFIA MIOCÁRDIA COM ESTRESSE: 1- sim 2- não

Marcar o tipo de estudo: **Estresse físico** ou **farmacológico** (dipiridamol)

Suspensão de fármacos que influenciem a frequência cardíaca: 1- Sim 2- Não

Listar fármacos suspensos: _____

Fração de ejeção: _____

Observações: _____

Conclusão: 1- exame normal 2- alteração fixa (hipoperfusão em repouso e estresse) = necrose 3- alteração variável (hipoperfusão somente no estresse) = isquemia **DATA:**

11.5. ANGIOGRAFIA CORONARIANA: 1- sim 2- não

Laudo: _____ **Data:** ___/___/___

E81e Estivalet, Aline Albeche Farias

Estudo da interação entre os polimorfismos D2 Tre92Ala e PPAR γ 2 Pro12Ala em pacientes com diabetes mellitus tipo 2 / Aline Albeche Farias Estivalet ; orient. Daisy Crispim Moreira e Ana Luiza Maia – 2009.

65 f.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas: Endocrinologia. Porto Alegre, BR-RS, 2009.

1. Diabetes mellitus tipo 2 2. Polimorfismo genético 3. Resistência à insulina 4. Regulação da expressão gênica I. Moreira, Daisy Crispim II. Maia, Ana Luiza Silva III. Título.

NLM: WK 810

Catálogo Biblioteca FAMED/HCPA