



Universidade de Aveiro Departamento de Química
Ano 2013

Marisa Helena **Estudo da associação entre a Diabetes**
Lopes Ferreira **mellitus e o hipotiroidismo**



Universidade de Aveiro Departamento de Química
Ano 2013

Marisa Helena **Estudo da associação entre a Diabetes**
Lopes Ferreira **mellitus e o hipotiroidismo**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Bioquímica, ramo da Bioquímica Clínica, realizada sob a orientação científica pelo Dr. António Frederico Ramos de Moraes Cerveira, Assistente Graduado Sénior - Responsável da secção de Imunoquímica do Centro Hospitalar do Baixo Vouga, E.P.E. Aveiro, da Professora Doutora Rita Maria Pinho Ferreira, Professora Auxiliar Convidada do Departamento de Química da Universidade de Aveiro e da Professora Doutora Maria do Rosário Gonçalves dos Reis Marques Domingues, Professora Auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro.

Apoio financeiro da Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT, Portugal), da União Europeia, QREN, no âmbito do Programa Operacional Temático Fatores de Competitividade (COMPETE), à Unidade de investigação QOPNA (projeto PEst-C/QUI/UI0062/2013; FCOMP-01-0124-FEDER-037296).



O júri

Presidente

Doutor Pedro Miguel Dimas Neves Domingues

Professor auxiliar – Departamento de Química – Universidade de Aveiro

Doutor António Frederico Ramos de Morais Cerveira

Chefe de Serviço de Patologia Clínica – Serviço de Patologia Clínica
– Centro Hospitalar do Baixo Vouga, E.P.E.

Doutor Armando Caseiro

Professor Adjunto – Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Coimbra – Instituto Politécnico de Coimbra

Agradecimentos

Ao Dr. Frederico Cerveira e à Professora Rosário Domingues pela disponibilidade, motivação, confiança e paciência ao longo da realização deste trabalho.

À Professora Rita Ferreira pela orientação e disponibilidade ao longo da realização deste trabalho.

Ao Dr. Telmo Costa pela ajuda na recolha de dados e ao pessoal do laboratório pela orientação e ajuda.

Ao meu irmão e cunhada por me aguentarem e aos meus pais, apesar da distância, pelo amor incondicional, motivação constante e em especial por acreditarem em mim mesmo nas alturas mais difíceis.

Aos meus amigos, em especial à Soraia Gonçalves, Ana Rodrigues e Inês Correia pela amizade, motivação e paciência principalmente na parte final deste trabalho.

Palavras-chave: Diabetes mellitus, hiperglicemia, hipotireoidismo, fosfolípidos, espectrometria de massa

Resumo: A Diabetes mellitus (DM) é uma das doenças mais comuns a nível mundial e caracteriza-se por uma hiperglicemia crônica que quando não controlada induz diversas complicações. Nos últimos anos tem-se verificado um aumento no número de casos de hipotireoidismo na população diabética em comparação com a população geral, levando a considerar um possível impacto da DM na função da tireóide. Nesse sentido, este trabalho teve como objetivo avaliar a incidência do hipotireoidismo numa população diabética em comparação com uma população não diabética e avaliar a sua possível relação com o perfil fosfolipídico do plasma, em especial das três classes de fosfolípidos mais abundantes neste (fosfatidilcolina, lisofosfatidilcolina e fosfatidiletanolamina). Assim, observou-se uma incidência de 10,9% de casos de hipotireoidismo na população diabética comparativamente com 8,6% na população não diabética. Verificou-se ainda uma maior incidência no sexo feminino e, em 84,2% dos pacientes diabéticos, o diagnóstico de hipotireoidismo foi posterior ao diagnóstico de DM. Por outro lado, verificaram-se modificações nos perfis de fosfolípidos nos grupos DM e DM-HT em comparação com o grupo CTL, sendo estas modificações mais acentuadas no grupo DM-HT. Esta incidência do hipotireoidismo na população de indivíduos diabéticos em estudo apoiada pelo aumento do estado inflamatório dos indivíduos diabéticos com hipotireoidismo é concordante com a hipótese do hipotireoidismo ser uma possível complicação diabética. Estas constatações reforçam a importância da monitorização da função da tireóide em indivíduos diabéticos.

Keywords: Diabetes mellitus, hyperglycemia, hypothyroidism, phospholipids, mass spectrometry

Abstract: Diabetes mellitus (DM) is one of the most common diseases worldwide and is characterized by a chronic hyperglycemia. This hyperglycemia when uncontrolled induces various complications. In the last years it has been seen an increase in cases of hypothyroidism in the diabetic population compared with the general population, leading to consider a possible impact of diabetes to thyroid level. Thus, this study aimed to evaluate the incidence of hypothyroidism in a diabetic population compared with a non-diabetic population and evaluate their possible relationship to plasma phospholipid profile, in particular the three most abundant classes of phospholipids (phosphatidylcholine, lysophosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine). Thus, prevalence of hypothyroidism was 10.9% in the diabetic population compared with 8.6% in the non-diabetic population. It was also found a higher incidence in females and in 84.2% of the diabetic patients, the diagnosis of hypothyroidism was subsequent to the diagnosis of diabetes. On the other hand, it was found changes in the profiles of phospholipids in the DM and DM-HT groups compared to the CTL group, being these changes more pronounced in DM-HT group. This hypothyroidism incidence in the diabetic population studied supported by the increased inflammatory status of diabetic subjects with hypothyroidism is consistent with the hypothesis of hypothyroidism can be a diabetic complication. These findings emphasize the importance of monitoring thyroid function in diabetic patients.

Lista de siglas e abreviaturas

AC	- Acetil-CoA carboxilase
AGEs	- Produtos finais da glicação avançada (do inglês <i>advanced glycation end-products</i>)
ALT	-Alanina aminotransferase
AST	-Aspartato aminotransferase
CHBV	-Centro Hospitalar do Baixo Vouga
ChREBP	- Proteína de ligação ao elemento de resposta aos hidratos de carbono (do inglês <i>carbohydrate-responsive element-binding protein</i>)
CL	-Cardiolipina (do inglês <i>cardiolipin</i>)
CTL	-Pacientes não diabéticos
CTLA-4	- Proteína citotóxica associada ao linfócito T (do inglês <i>cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4</i>)
DM	-Diabetes Mellitus
DM-HT	-Diabetes mellitus com hipotireoidismo
DMPC	-Dimiristoilfosfatidilcolina
EI	- Impacto de electrões (do inglês <i>electron impact</i>)
ESI	- <i>Electrospray ionization</i>
FA	-Ácidos gordos (do inglês <i>fatty acid</i>)
FAB	- <i>Fast atom bombardment</i>
FAS	- Ácido gordo sintase (do inglês <i>fatty acid synthase</i>)
FT-ICR	- <i>Fourier transform ion cyclotron</i>
GC	-Cromatografia gasosa (do inglês <i>gas chromatography</i>)
GL	- Glicolípidos

GP	-Glicerofosfolípidos
HDL	- Lipoproteínas de alta densidade (do inglês <i>High Density Lipoprotein</i>)
HbA1c	- Hemoglobina glicada A1c
HIF-1 α	- Fator induzido por hipóxia 1 (do inglês <i>hypoxia-inducible factor-1α</i>)
HPLC	-Cromatografia líquida de alta resolução (do inglês <i>high performance liquid chromatography</i>)
IDF	- Federação Internacional da Diabetes (do inglês <i>International Diabetes Federation</i>)
IRS	- Substrato do receptor de insulina (do inglês <i>Insulin receptor substrate</i>)
IT	- <i>Ion trap</i>
LDL	- Lipoproteínas de baixa densidade (do inglês <i>Low Density Lipoprotein</i>)
LPC	-Lisofosfatidilcolina (do inglês <i>lyso phosphatidylcholine</i>)
MALDI	- <i>Matrix-assisted laser desorption/ionization</i>
MS	- Espectrometria de massa (do inglês <i>mass spectrometry</i>)
MS/MS	- Espectrometria de massa em tandem
OxPL	-Fosfolípidos oxidados (do inglês <i>oxidized phospholipids</i>)
PA	- Ácido fosfatídico (do inglês <i>phosphatidic acid</i>)
PC	- Fosfatidilcolina (do inglês <i>phosphatidylcholine</i>)
PCR	-Proteína C-reativa
PDK-1	- <i>Phosphoinositide-dependent kinase 1</i>
PE	- Fosfatidiletanolamina (do inglês <i>phosphatidylethanolamine</i>)
PG	- Fosfatidilglicerol (do inglês <i>phosphatidylglycerol</i>)
PI	- Fosfatidilinositol (do inglês <i>phosphatidylinositol</i>)
PI3K	- Fosfatidilinositol-3-cinase (do inglês <i>phosphoinositide-3-kinase</i>)
PIP3	- Fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (do inglês <i>phosphatidylinositol (3,4,5)-triphosphate</i>)
PK	- Poliquetídeos (do inglês <i>polyketids</i>)

PKC	- Proteína cinase C (do inglês <i>protein kinase C</i>)
PR	- Lípidos prenóis (do inglês <i>prenol lipids</i>)
PS	- Fosfatidilserina (do inglês <i>phosphatidylserine</i>)
PTGO	- Prova de tolerância à glucose oral
Q	-Quadrupolo
ROS	- Espécies reativas de oxigénio (do inglês <i>reactive oxygen species</i>)
SAM	-Sistema de Apoio ao Médico
SH2	- Homologia a Src 2 (do inglês <i>Src Homology 2</i>)
SL	- Sacarolípidos
SP	- Esfingolípidos (do inglês <i>sphingolipids</i>)
SPE	-Extração em fase líquida (do inglês <i>solid phase extraction</i>)
ST	- Lípidos esteróis (do inglês <i>sterol lipids</i>)
T3	- Triiodotironina
T4	-Tiroxina
Tg	-Tiroglobulina
T _h 1	- Células T helper 1
T3L	- Triiodotironina livre
T4L	- Tiroxina livre
TLC	- Cromatografia de camada fina (do inglês <i>thin-layer chromatography</i>)
TOF	-Tempo de voo (do inglês <i>time of flight</i>)
TRH	- Hormona libertadora de tirotropina (do inglês <i>thyrotropin-releasing hormone</i>)
TSH	- Hormona estimuladora da tiróide/Tirotropina (do inglês <i>thyroid-stimulating hormone</i>)
VS	-Velocidade de sedimentação

Índice

<i>Lista de siglas e abreviaturas</i>	xiii
<i>Índice de Figuras</i>	xix
<i>Índice de Tabelas</i>	xxi
I. Introdução.....	1
1. Diabetes mellitus: caracterização e complicações.....	2
2. A regulação do metabolismo da glucose	6
2.1. O efeito da Diabetes mellitus na regulação da tiróide.....	7
3. Hipotiroidismo: considerações gerais e sua possível relação com a DM.....	8
3.1. Hipotiroidismo e o agravamento das complicações diabéticas.....	12
4. Lípidos e o perfil do lípido plasmático	13
4.1. Stress oxidativo e peroxidação lipídica	14
4.2. Perfil fosfolípido da DM e do hipotiroidismo	16
5. Lipidómica.....	17
II. Objetivos.....	23
III. Materiais e métodos.....	25
A. <i>Caracterização da população diabética e da população não diabética – estudo retrospectivo</i>	25
1. Seleção e caracterização da população	25
2. Análise estatística	27
B. <i>Procedimento experimental da extração e quantificação de fosfolípidos no soro humano</i>	28
1. Amostras biológicas.....	28
2. Extração de fosfolípidos	28

3.	Instrumentação HPLC.....	28
4.	Condições da espectrometria de massa por electrospray	29
5.	Análise estatística	29
IV.	Resultados e Discussão.....	31
A.	<i>Caracterização da população diabética e da população não diabética – estudo retrospectivo</i>	31
1.	Caracterização dos dados clínico-laboratoriais.....	31
2.	Avaliação da relação entre a Diabetes mellitus e o hipotiroidismo na população em estudo.....	36
3.	Discussão dos resultados obtidos.....	40
B.	<i>Extração e quantificação de fosfolípidos no soro humano</i>	44
1.	Análise dos fosfolípidos por HPLC-MS	44
2.	Discussão dos resultados obtidos.....	55
V.	Conclusão	57
VI.	Bibliografia.....	59

Índice de Figuras

Figura 1. O diagnóstico diferencial do hipotireoidismo efetua-se através dos testes de medição da tirotropina (TSH) e T4 total ou livre. A TSH encontra-se aumentada no hipotireoidismo primário enquanto no central encontra-se normal ou diminuída. O T4 livre encontra-se diminuído tanto no primário como no central (adaptado[58]).	10
Figura 2. Estrutura dos glicerofosfolípidos. R ₁ e R ₂ representam os ácidos gordos esterificados nas posições <i>sn</i> -1 e <i>sn</i> -2. Fosfatidil, plasménil e plasmanil representam diferentes subclasses de acordo com o tipo de ligação com a cadeia de hidrocarbonos na posição <i>sn</i> -1.	14
Figura 3. Representação esquemática dos principais constituintes da HPLC.	19
Figura 4. Representação esquemática dos principais componentes de um espectrómetro de massa.	20
Figura 5. Distribuição dos doentes diabéticos de acordo com o tipo de DM.	31
Figura 6. Distribuição dos controlos (CTL) e doentes DM1 e DM2 de acordo com o sexo.	32
Figura 7. Distribuição dos pacientes DM1 e DM2 de acordo com a Pressão Arterial.	32
Figura 8. Distribuição dos pacientes diabéticos de acordo com: a concentração da hemoglobina glicada (A) e a concentração de glucose (B).	33
Figura 9. Distribuição dos controlos e dos pacientes diabéticos de acordo com a presença de hipotireoidismo.	36
Figura 10. Distribuição dos controlos com hipotireoidismo e dos pacientes diabéticos com hipotireoidismo de acordo com o sexo.	37
Figura 11. Distribuição da TSH de acordo com os controlos com hipotireoidismo e com os pacientes diabéticos com hipotireoidismo.	37
Figura 12. Cromatograma no modo positivo, mostrando o sítio de eluição das classes fosfolipídicas.	44
Figura 13. Estrutura geral da diacil-PC; espectros HPLC-MS das PCs no modo positivo com formação dos iões [M + H] ⁺ , nos controlos (CTL), diabéticos sem hipotireoidismo (DM) e diabéticos com hipotireoidismo (DM-HT). O ião <i>m/z</i> 678,4 corresponde ao padrão interno (PC 14:0/14:0) e o ião <i>m/z</i> 737,4 ao solvente.	46

Figura 14. Quantidade normalizada pelo padrão interno PC (14:0/14:0) das diferentes espécies da classe fosfatidilcolina nos controlos (CTL), diabéticos sem hipotiroidismo (DM) e diabéticos com hipotiroidismo (DM-HT). * $p < 0.05$ versus controlo; n=3 experiências independentes. 48

Figura 15. Estrutura geral da LPC; espectros HPLC-MS das LPCs no modo positivo com formação dos iões $[M + H]^+$, nos controlos (CTL), diabéticos sem hipotiroidismo (DM) e diabéticos com hipotiroidismo (DM-HT)..... 49

Figura 16. Quantidade normalizada pelo padrão interno PC (14:0/14:0) das diferentes espécies da classe lisofosfatidilcolina nos controlos (CTL), diabéticos sem hipotiroidismo (DM) e diabéticos com hipotiroidismo (DM-HT). * $p < 0.05$ versus controlo; n=3 experiências independentes. 51

Figura 17. Estrutura geral das PEs; espectros HPLC-MS das PEs no modo positivo com formação dos iões $[M + H]^+$, nos controlos (CTL), diabéticos sem hipotiroidismo (DM) e diabéticos com hipotiroidismo (DM-HT)..... 52

Figura 18. Quantidade normalizada pelo padrão interno PC (14:0/14:0) das diferentes espécies da classe fosfatidiletanolamina nos controlos (CTL), diabéticos sem hipotiroidismo (DM) e diabéticos com hipotiroidismo (DM-HT). * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ versus controlo; n=3 experiências independentes. 54

Índice de Tabelas

Tabela 1. Critérios para diagnóstico da Diabetes mellitus (adaptado de [12]).	3
Tabela 2. Critérios para o diagnóstico da DM gestacional (adaptado de [13]).	3
Tabela 3. Parâmetros laboratoriais e respectivos valores de referência.	26
Tabela 4. Apresentação, em percentagem dos valores diminuídos, normais e elevados das concentrações de albumina, proteína C reativa, velocidade de sedimentação, colesterol total, HDL e LDL.	34
Tabela 5. Apresentação, em percentagem dos valores diminuídos, normais e elevados das concentrações de triglicérides, creatina cinase, aspartato aminotransferase e alanina aminotransferase.	35
Tabela 6. Caracterização dos pacientes diabéticos com hipotireoidismo A) diagnosticados anteriormente e B) diagnosticados posteriormente à seleção da população em estudo, de acordo com: tipo de DM, idade, sexo, TSH (valores de referência: 0,35-5,5 mU/L), T4L (valores de referência: 0,8-1,8 ng/dL) e T3L (valores de referência: 2,3-4,2 pg/dL).	38
Tabela 7. Indicação do ano referente ao diagnóstico da DM e do Hipotireoidismo.	39
Tabela 8. Identificação dos iões $[M + H]^+$ observados no espectro MS da PC. Os fosfolípidos estão designados como: diacil 32:1 PC, onde 32 indica a soma do número de átomos de carbono em ambas as posições <i>sn</i> -1 e <i>sn</i> -2 e 1 indica a soma do número de duplas ligações em ambas as posições.	47
Tabela 9. Identificação dos iões $[M + H]^+$ observados no espectro MS da LPC; p – <i>sn</i> -1 éter vinil (alquenil-). As lisofosfatidilcolinas estão designados como: acil 18:1 LPC, onde 18 indica o número de átomos de carbono na posição <i>sn</i> -1 e 1 indica o número de duplas ligações nessa posição.	50
Tabela 10. Identificação dos iões $[M + H]^+$ observados no espectro MS da PE. Os fosfolípidos estão designados como: diacil 34:2 PE, onde 34 indica a soma do número de átomos de carbono em ambas as posições <i>sn</i> -1 e <i>sn</i> -2 e 2 indica a soma do número de duplas ligações em ambas as posições.	53

I. Introdução

A Diabetes mellitus (DM) é uma das desordens metabólicas endócrinas mais comum a nível mundial, sendo que 80% da população com DM reside nos países em desenvolvimento [1, 2]. No ano de 2011, a DM afetou 366 milhões de indivíduos e causou cerca de 4,6 milhões de mortes, e estima-se que por volta do ano de 2030 cerca de 552 milhões de indivíduos sejam afetados pela DM a nível mundial. Contudo, cerca de 183 milhões de pessoas (~50%) com DM não estão diagnosticadas [1, 2]. Segundo a Federação Internacional da Diabetes (do inglês *International Diabetes Federation*): “A DM é, um dos problemas de saúde mais desafiadores do século 21” [1]. Esta doença tem um grande impacto económico para as famílias, para os sistemas de saúde e económico dos países [1, 2]. Sabe-se que, são as complicações micro e macrovasculares associadas à DM as causadoras das elevadas taxas de morbilidade e mortalidade nos pacientes com DM, com principal incidência para hipertensão, retinopatia e nefropatia diabética [3, 4]. Curiosamente, nos últimos anos tem-se verificado um aumento no número de casos de hipotiroidismo na população diabética em comparação com a população geral [5, 6], o que leva a considerar um possível impacto da DM a nível da tiróide e que possa ter como consequência um quadro de hipotiroidismo colocando a hipótese de este ser uma possível complicação diabética [7]. Assim, é de grande importância a compreensão da relação entre a DM e o hipotiroidismo.

1. Diabetes mellitus: caracterização e complicações

A DM caracteriza-se por uma hiperglicemia crônica resultante da diminuição da sensibilidade dos tecidos à ação da insulina (resistência à insulina), da insuficiente secreção de insulina pelas células β do pâncreas ou de ambas [3]. Estes défices na secreção e ação da insulina devem-se a interações entre fatores genéticos e ambientais [8]. Atendendo à sua etiologia, a DM pode ser classificada em quatro grupos: 1) DM tipo 1, subdividido em auto-imune (tipo 1-A) e idiopática (tipo 1-B); 2) DM tipo 2; 3) DM gestacional; 4) outros tipos específicos de DM. A DM tipo 1, anteriormente designada de DM insulino-dependente ou diabetes juvenil, ocorre como consequência de défices na secreção de insulina devido a lesões das células β pancreáticas [8]. Na maioria dos casos esta lesão das células β está associada a um processo auto-imune, DM tipo 1 auto-imune. Numa minoria dos casos, a etiologia auto-imune está ausente correspondendo à DM tipo 1 idiopática em que a causa é desconhecida [9]. A DM tipo 2 ou DM não insulino-dependente é a forma mais comum desta desordem, sendo responsável por ~90%-95% dos casos de DM. O seu desenvolvimento está associado à combinação da resistência da ação da insulina por parte dos tecidos e uma inadequada resposta compensatória da secreção da mesma. Ocorre preferencialmente numa faixa etária mais elevada, contudo tem-se verificado um aumento dos casos de DM tipo 2 em crianças, devido à crescente obesidade em crianças e jovens [3]. A DM gestacional surge nas mulheres durante a gravidez, sendo definida pela Associação Americana de Diabetes como qualquer grau de intolerância à glucose, com aparecimento ou primeiro reconhecimento durante a gravidez, independentemente se a condição persiste ou não após a gravidez [10]. Os outros tipos específicos de DM estão classificados como defeitos genéticos das células β , defeitos genéticos na ação da insulina, doenças do pâncreas exócrino, endocrinopatias, induzidos por fármacos, infeções e síndromes genéticas associadas com diabetes [3, 8].

Os métodos usuais para diagnóstico/avaliação e monitorização da DM baseiam-se em vários testes químicos ao sangue e/ou à urina [11], que avaliam os seguintes parâmetros: a) glicemia após um jejum de 8h; ou b) prova de tolerância à glucose oral (PTGO) usando geralmente uma carga de 75g de glucose; ou c) hemoglobina glicada A1c

(HbA1c); ou d) sintomas clássicos + glicemia ocasional. Estes parâmetros e os seus respectivos valores plasmáticos de glucose expectáveis num paciente diabético encontram-se resumidos na Tabela 1.

Tabela 1. Critérios para diagnóstico da Diabetes mellitus (adaptado de [12]).

Glicemia de jejum ≥ 126 mg/dL (ou $\geq 7,0$ mmol/L)
ou
Glicemia ocasional ≥ 200 mg/dL (ou $\geq 11,1$ mmol/L)
ou
PTGO ≥ 200 mg/dL (ou $\geq 11,1$ mmol/L)
ou
Hemoglobina glicada A1c (HbA1c) $\geq 6,5\%$

O diagnóstico da DM gestacional envolve duas fases temporais distintas: avaliação da glicemia em jejum na primeira consulta pré-natal e prova de tolerância à glucose oral (PTGO) às 24-28 semanas de gestação. Os valores plasmáticos da glucose utilizados para se estabelecer o diagnóstico de diabetes gestacional estão indicados na Tabela 2.

Tabela 2. Critérios para o diagnóstico da DM gestacional (adaptado de [13]).

Se glicemia de jejum ≥ 92 mg/dL e < 126 mg/dL \rightarrow DM gestacional	
Se glicemia de jejum < 92 mg/dL (ou $< 5,1$ mmol/L):	
PTGO	
24-28s	Jejum: ≥ 92 mg/dL (ou $\geq 5,1$ mmol/L)
	e
	1h: ≥ 180 mg/dL (ou $\geq 10,0$ mmol/L)
	e
	2h: ≥ 153 mg/dL (ou $\geq 8,5$ mmol/L)

A alteração dos níveis de glucose pode ser assintomática, no entanto, na presença de uma hiperglicémia evidente (≥ 200 mg/dL) surgem um conjunto de sintomas característicos tais como, polidipsia, poliúria e perda de peso. O tratamento varia de acordo com o tipo de DM existente no paciente. Num indivíduo com DM tipo 1 administra-se uma

única dose de insulina de longa duração a cada dia permitindo aumentar o metabolismo dos hidratos de carbono. Adicionalmente administram-se quantidades regulares de insulina durante o dia quando os níveis de glicemia atingem um pico máximo. Em indivíduos com DM tipo 2, a hiperglicémia pode ser controlada através da prática de uma atividade física e de uma dieta equilibrada prevenindo outros fatores de risco associados ao sedentarismo como a obesidade e a hipertensão arterial. Se isto não for suficiente, administram-se fármacos de maneira a aumentar a sensibilidade à insulina ou a estimular o aumento de produção de insulina pelo pâncreas. Contudo, em muitos indivíduos, é necessário recorrer à insulina exógena de forma a regular a glicémia [11].

Porém, quando não controlada a hiperglicémia induz diversas complicações, destacando-se as complicações microvasculares como nefropatia, retinopatia com potencial perda de visão e neuropatia [3]. Podem ainda surgir doenças macrovasculares com consequências a vários níveis, tais como insuficiência renal, úlcera do pé diabético, alterações cardiovasculares, gastrointestinais, genitourinários e disfunção sexual [3, 4]. A DM também acelera a ocorrência de arteriosclerose, aumentando o risco de enfarte do miocárdio, hipertensão, enfarte cerebral e doença arterial oclusiva dos membros inferiores, [8]. A presença de nefropatia em pacientes diabéticos aumenta o risco de doenças macrovasculares, conseqüentemente, muitos pacientes acabam por sucumbir a uma doença cardíaca coronária fatal. O termo microalbuminúria é um indicador de nefropatia mas também um importante fator de risco para a arteriosclerose [14]. Também a retinopatia diabética promove uma associação entre as complicações microvasculares e macrovasculares. A retinopatia está relacionada com a mortalidade por doença cardiovascular, mais especificamente, relacionada com o risco de doença cardíaca coronária em mulheres [15]. Na neuropatia diabética, sabe-se que pacientes com úlceras do pé diabético em estado avançado têm taxas de mortalidade aumentadas [16]. Sendo estas complicações diabéticas as principais causas de morbidade e mortalidade nos pacientes com DM. Em casos severos, desenvolvem-se descompensações metabólicas como a cetoacidose metabólica ou o estado hiperglicémico-hiperosmolar. Estas descompensações podem levar a distúrbios de consciência, coma e até à morte se não existir um tratamento apropriado [8].

Vários mecanismos como, a via dos polióis, a ativação da proteína cinase C (PKC), o aumento da produção dos produtos finais da glicação avançada (AGEs) através da

glicação não-enzimática das proteínas e o aumento do stress oxidativo resultante do aumento dos radicais livres e de uma defesa antioxidante debilitada, têm sido propostos para explicar o papel da hiperglicémia nas complicações diabéticas [17]. Em células onde o transporte da glucose é insulino-independente, como células da retina, renais e neurónios, a hiperglicémia conduz a um aumento da concentração da glucose intracelular. Nestas células, a glucose intracelular em excesso é convertida em sorbitol na reação catalisada pela enzima aldose-redutase e o sorbitol oxidado a frutose pela enzima sorbitol desidrogenase [18]. A via dos polióis potencia a glucotoxicidade através de diferentes mecanismos: a acumulação de sorbitol e frutose na célula que conduz a uma hiperosmolaridade com conseqüente influxo de água, tendo um elevado impacto na homeostasia celular; o aumento da produção de espécies reativas de oxigénio, devido à diminuição da regeneração da glutathione reduzida e à diminuição da prostaciclina, um potente vasodilatador endógeno sintetizado no endotélio vascular, conduzindo à vasoconstrição e à agregação plaquetária [19, 20]. Em relação à via da PKC, sabe-se que níveis elevados de glucose intracelular ativam esta cinase, estando associada a diversas anomalias vasculares na DM [20]. A PKC regula diversos processos vasculares, tais como a permeabilidade vascular, a vasoconstrição, a proliferação celular, a síntese da matriz extracelular e a ativação de várias citocinas e hormonas [21]. Alguns estudos focam-se nos inibidores desta cinase, que exibem potenciais benefícios na abordagem terapêutica nas complicações diabéticas, preferencialmente na nefropatia e na retinopatia diabética [22]. Outro mecanismo proposto na patogénese das complicações vasculares associadas à hiperglicémia é a glicação não-enzimática. A hiperglicémia é o evento iniciador da formação dos produtos finais da glicação avançada (AGEs), isto é, em condições de hiperglicémia, a glucose reage com o grupo amina terminal de proteínas comprometendo a sua função [23]. De entre os efeitos dos AGEs tem sido sugerido que promovem o influxo de células mononucleares, uma interação anormal entre proteínas da matriz, um aumento da permeabilidade vascular e induzem a produção de fatores de crescimento e citocinas [19, 24]. O estudo dos mecanismos dos AGEs conduziu à identificação de recetores de superfície celular, designados de recetores de produtos finais da glicação avançada (RAGEs) [20]. Este recetor é expresso pelos macrófagos, associando-se a uma reação inflamatória quando em níveis elevados, pelas células endoteliais, levando a um aumento da permeabilidade endotelial e pelas células musculares lisas, verificando-se um aumento

da atividade proliferativa [23, 25]. A ligação dos AGEs a este recetor também resulta num aumento do stress oxidativo intracelular, mais especificamente, resulta numa depleção dos mecanismos de defesa antioxidante e numa produção de ROS, que por sua vez acelera a formação de AGEs [26].

2. A regulação do metabolismo da glucose

A glucose é usada como a principal fonte de energia das células e está inserida em diferentes vias metabólicas, tais como, glicólise, gluconeogénese, glicogénese e glicogenólise. A insulina, secretada pelos ilhéus de Langerhans das células β no pâncreas endócrino, atua como um regulador da concentração sanguínea da glucose nas células. Mais especificamente, promove o aumento da captação da glucose nas células do músculo-esquelético e do tecido adiposo e inibe a produção hepática da glucose [27]. No fígado, músculo-esquelético e tecido adiposo estimula também o crescimento e diferenciação celular através tanto da estimulação da lipogénese, gluconeogénese e síntese proteica como da inibição da lipólise e glicogenólise [28]. A insulina aumenta a captação da glucose nas células estimulando a translocação do Glut4 das vesículas intracelulares para a membrana plasmática [29], mediando estas ações através da ligação a um recetor de membrana do tipo tirosina cinase, da célula-alvo. Após estimulação pela insulina, as proteínas *insulin receptor substrate*, IRS, ativam proteínas contendo domínios com homologia a Src 2, SH2, como por exemplo a fosfatidilinositol-3-cinase, PI3K, que por sua vez produz o fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato, PIP3. Esta molécula regula serina-treonina cinases, como, a *phosphoinositide-dependent kinase 1*, PDK-1. Estas cinases iniciam uma cascata de fosforilação, resultando na ativação da Akt e da PKC. Consequentemente estas moléculas permitem a translocação do Glut4 das vesículas intracelulares para a membrana plasmática [30].

Evidências biológicas indicam que as hormonas da tiróide e a insulina podem ter tanto efeitos sinérgicos como efeitos antagonistas na regulação do metabolismo da glucose [31, 32]. As hormonas tiroxina (T4) e triiodotironina (T3) são produzidas pela tiróide, glândula endócrina, e reguladas por um mecanismo de feedback negativo. Cerca de 90% da produção é T4 sendo a maioria da T3 resultado da deiodinação da T4, através da enzima 5'-deiodinase [11]. A produção destas hormonas é regulada pela concentração de iodo

dentro da glândula e pela tirotropina (hormona estimuladora da tiróide; TSH) produzida e libertada pela pituitária anterior. Esta por sua vez é regulada pelas concentrações das hormonas da tiróide circulantes e pela hormona libertadora de tirotropina, TRH, produzida e libertada pelo hipotálamo [33].

As hormonas da tiróide, principalmente a T3, têm um importante papel na expressão das principais enzimas envolvidas nas vias metabólicas da glicólise [32, 34] e da gluconeogénese [35-37]. As hormonas da tiróide podem induzir o aumento da produção de glucose através do aumento da expressão dos transportadores Glut4 e Glut2 [31, 38]. Sabe-se também que a hormona da tiróide, T3, induz a lipogénese através da ativação da enzima málica, ácido gordo sintase (FAS) e acetil-CoA carboxilase (AC), envolvidas na síntese dos ácidos gordos [36, 39]. É possível que através da estimulação das enzimas lipogénicas a T3 possa agravar a desregulação da glucose no fígado [40]. Mais especificamente, a proteína de ligação ao elemento de resposta aos hidratos de carbono (ChREBP), é um importante fator de transcrição que medeia a ativação de várias enzimas reguladoras da glicólise e da lipogénese, sendo um alvo direto das hormonas da tiróide no fígado e no tecido adiposo unilocular [41, 42]. No músculo-esquelético, as hormonas da tiróide estimulam as enzimas transmembranares tais como a K^+/Na^+ e a Ca^{2+} ATPase, resultando na sua ativação e num aumento da captação e utilização da glucose [43, 44]. Apesar de não serem tão metabolicamente ativos como as células hepáticas, os fibroblastos da pele também são estimulados pelas hormonas da tiróide. Observou-se que o mRNA do fator de transcrição que regula a expressão do fator induzido pela hipóxia 1 (HIF-1 α), um mediador chave da glicólise, aumenta em resposta à hormona T3 [45]. Mais recentemente observou-se que a T3 é um estimulador da proliferação celular do ácino pancreático em roedores [46]. As concentrações séricas da T3 estão positivamente associadas com as secreções séricas da insulina e que a T3 tem um papel importante nas secreções de insulina independentemente da sensibilidade da insulina em indivíduos com uma normal função da tiróide [47].

2.1. O efeito da Diabetes mellitus na regulação da tiróide

Estudos realizados em pacientes com DM tipo 1 e tipo 2 sugerem que a sensibilidade à insulina influencia os mecanismos moleculares da tiróide ainda num estado

eutiroideu, evoluindo depois para um estado de baixo funcionamento da tiróide [48, 49]. Noutro estudo observou-se uma relação entre uma diminuição na sensibilidade à insulina por parte dos tecidos e uma diminuição dos níveis das hormonas da tiróide [50]. Consequentemente, esta diminuição conduz a um aumento da TSH por feedback negativo. Por sua vez, a TSH aumenta a proliferação celular na glândula da tiróide podendo resultar em manifestações clínicas como o bócio (aumento do volume da tiróide) e a formação de nódulos [51]. A avaliação dos níveis noturnos da TSH em pacientes diabéticos num estado eutiroideu permitiu verificar uma secreção debilitada da TSH, podendo até verificar-se a perda do pico normal durante a noite [7]. A capacidade de resposta da TSH deverá normalizar aquando de uma melhoria do estado glicémico, contudo, um estudo envolvendo pacientes com DM tipo 1 com uma melhoria no controlo glicémico verificou a não reposição do pico normal da TSH durante a noite [52]. A diminuição na conversão periférica da tiroxina, T4, a triiodotironina, T3, via reação 5' deiodinação conduz à redução dos níveis da hormona da tiróide T3. Alguns estudos sugerem que a DM não controlada é determinante nessa redução, tendo sido observada em pacientes diabéticos, tanto com DM tipo 1 como tipo 2 [53-55]. Os resultados obtidos num outro estudo realizado em ratos com DM tipo 1 induzida por injeção de estreptozotocina, indicaram uma diminuição da atividade da 5-deiodinase, resultando, após algum tempo, numa diminuição da produção da T3 nos tecidos periféricos [56]. A diminuição da estimulação da tiróide conduz a uma reduzida produção de hormonas da tiróide que conjunto com uma diminuída atividade da 5-deiodinase, resulta em níveis baixos das hormonas da tiróide. Consequentemente a produção de TSH é exacerbada devido a mecanismos de feedback negativo. Assim, esta produção diminuída da TSH durante a noite alternada com produções exarcebadas da TSH poderá conduzir a uma desregulação da tiróide e consequentemente a um quadro de hipotiroidismo.

3. Hipotiroidismo: considerações gerais e sua possível relação com a DM

As patologias mais comuns da tiróide dividem-se em Hipotiroidismo, produção insuficiente das hormonas da tiróide e Hipertiroidismo, produção exacerbada das hormonas da tiróide. O hipotiroidismo caracteriza-se por níveis aumentados da tirotropina, TSH, níveis diminuídos da tiroxina, T4, ou tiroxina livre, T4L, podendo os níveis de

triodotironina, T3, apresentar-se normais [57]. Esta doença apresenta uma maior incidência nas mulheres e aumenta com a idade, podendo ser classificado em congênito ou adquirido, primário ou secundário (também chamado de central) ou evidente/clínico ou leve/subclínico [58]. O hipotireoidismo congênito constitui uma das causas mais comuns do atraso mental. No entanto, o desenvolvimento neurológico do recém-nascido pode ser normal se o diagnóstico e tratamento começarem nas primeiras semanas após o nascimento [59]. O hipotireoidismo adquirido primário pode resultar de uma lesão da tireóide por cirurgia, irradiação [60] ou terapia com iodo radiativo [58]. Mas a sua causa mais comum é a tireoidite auto-imune (também designada de tireoidite de Hashimoto) [61]. O hipotireoidismo central é adquirido na presença de adenomas da pituitária, tumores no hipotálamo e após cirurgias e/ou radioterapias [62]. O hipotireoidismo subclínico caracteriza-se por níveis aumentados da TSH mas níveis normais da T4 [63]. Normalmente os sintomas e sinais estão relacionados com a duração e severidade da doença. Existe uma grande variedade de sintomas e sinais, dos quais se destacam o bócio, fraqueza muscular, pele seca, apatia, edema das pálpebras, intolerância ao frio, diminuição da memória, obstipação, aumento de peso, queda de cabelo, aumento do colesterol no sangue, depressão e bradicardia [64]. Em relação ao diagnóstico, a medição da TSH no soro constitui um dos primeiros testes a serem efetuados. As determinações de T4 livre e T4 total devem ser os testes de eleição quando existe suspeita de hipotireoidismo central, complementado com ressonância magnética à pituitária e um teste de estimulação à hormona libertadora da tirotrópina. A Figura 1 exemplifica um diagnóstico diferencial a partir das medições da TSH e T4 ou FT4 no soro. O tratamento de eleição para o hipotireoidismo é a administração de T4. Quando administrado nas quantidades certas, existe um alto grau de eficácia e um baixo risco de reações adversas. Não existem vantagens na administração combinada de T4 e T3 [57].

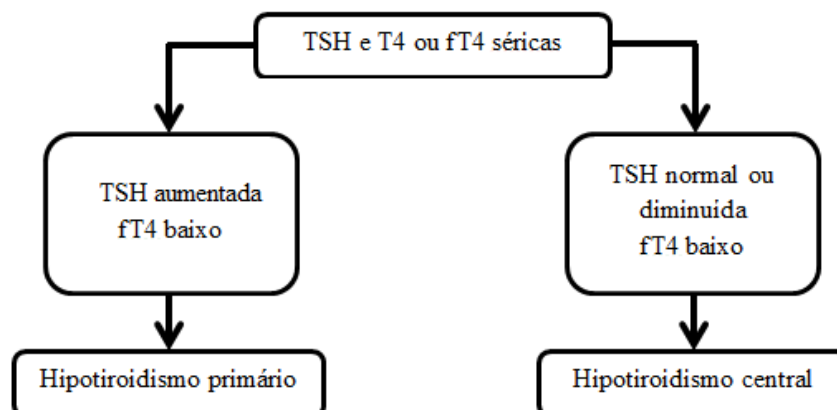


Figura 1. O diagnóstico diferencial do hipotiroidismo efetua-se através dos testes de medição da tirotropina (TSH) e T4 total ou livre. A TSH encontra-se aumentada no hipotiroidismo primário enquanto no central encontra-se normal ou diminuída. O T4 livre encontra-se diminuído tanto no primário como no central (adaptado[58]).

No fim da década de 70, o inquérito Whickam, conduzido no norte de Inglaterra, revelou uma prevalência de 6,6% das patologias da tiróide na população geral adulta, sendo o hipotiroidismo a patologia mais comum. Num estudo sobre a Prevalência da Doença da Tiróide no Colorado, envolvendo 25862 participantes, estimou-se que a prevalência para a disfunção da tiróide era de 6 %. O inquérito NHANES III com 17353 Americanos concluiu que 4,6% apresentavam níveis de tirotropina elevados, 0,3% apresentavam hipotiroidismo evidente, 4,3% apresentavam hipotiroidismo leve e 1,3% apresentavam hipertiroidismo [65]. Nos pacientes diabéticos tem-se verificado um aumento na incidência das patologias da tiróide com ~46,5% em 2007 em contraste com os ~10,8% em 2000, observando-se situações de hipotiroidismo na maioria dos casos [5, 6]. Mais especificamente, a prevalência do hipotiroidismo parece ser maior na população feminina de diabéticos [66, 67]. Estes números parecem variar com a etnia, tendo-se registado uma incidência de hipotiroidismo em 12,1% de pacientes com DM tipo 2 na Índia [68], em 16% de pacientes com DM tipo 2 na Arábia Saudita [69], em 12,5% dos pacientes com DM tipo 2 na Jordânia [70] e em 12,3% em pacientes com DM tipo 2 na Grécia [67].

Apesar das evidências epidemiológicas sugerirem uma maior associação entre o hipotiroidismo e a DM tipo 2, a caracterização da associação entre estas doenças é quase exclusivamente direcionada para a associação entre o hipotiroidismo e a DM tipo 1 [71]. O hipotiroidismo auto-imune (tiroidite de Hashimoto) demonstra uma maior incidência em

indivíduos com DM tipo 1 [71], partilhando uma origem auto-imune. A tiroidite de Hashimoto ocorre em 17%-30% dos indivíduos com DM tipo 1-A [72, 73], existindo uma maior frequência em jovens adultos do que em crianças [74-76]. Mais especificamente os pacientes com diabetes tipo 1-A têm concentrações anormais de TSH no sangue [76, 77] e a frequência dos autoanticorpos da tiróide em crianças e adolescentes varia entre 25%-63% [71, 75, 76]. O acompanhamento a longo-termo dos pacientes diabéticos tipo 1-A sugere que a presença de autoanticorpos da tiroide levará ao desenvolvimento do hipotiroidismo [73, 78].

Para uma melhor compreensão do processo auto-imune associado à DM tipo 1 e ao hipotiroidismo vários estudos tem vindo a ser realizados e numerosas hipóteses apresentadas. Consistentemente, as células T têm sido apontadas como sendo críticas na patogénese destas doenças [79], dependente sobretudo das células T $CD4^+$ e $CD8^+$ autoreativas [80, 81]. Uma infiltração das células T resulta na disfunção do órgão alvo (ilhéus β pancreáticos na T1-A e tiróide no hipotiroidismo) [82, 83]. A tiroidite de Hashimoto é caracterizada pela infiltração das células T helper 1 (T_h1), induzindo a apoptose das células foliculares da tiróide [84].

Vários estudos têm vindo a ser realizados na tentativa de identificar fatores de risco genéticos com o potencial para desenvolvimento de ferramentas para uma melhor compreensão da etiologia da doença, principalmente durante a fase pré-clínica [85]. A maior evidência da componente genética é apresentada através dos estudos dos genes HLA [86-88], proteína citotóxica associada ao linfócito T (CTLA-4) [83, 89] e PTPN22 [85, 90] nas duas doenças e em específico através do estudo do gene da insulina na DM tipo 1 [91] e do gene específico da tiróide, a tiroglobulina (Tg), no hipotiroidismo [92]. A DM tipo 1-A e a tiroidite de Hashimoto são consideradas desordens multifatoriais, onde não só os defeitos genéticos contribuem para uma maior suscetibilidade mas também os factores ambientais tem um importante papel [93]. Entre esses fatores de risco, o papel das toxinas, dos antigénios alimentares (ex: proteínas do leite de vaca, cereais ou glúten) e especialmente o das infeções virais (enterovirose humanas, incluindo coxsackie A e B, echovirose e poliovirose) parecem ser os mais importantes na DM tipo 1 [94-96]. Já no caso do hipotiroidismo, alguns dos fatores ambientais apontados na suscetibilidade do seu desenvolvimento são o excesso de iodo [97], alergias [98], drogas [99, 100] e infeções por *Yersinia enterocolitica* [101].

3.1. Hipotiroidismo e o agravamento das complicações diabéticas

A desregulação da tiróide conduz a um agravamento da DM. No hipotiroidismo observa-se uma absorção diminuída da glucose no trato gastrointestinal, uma produção de glucose hepática diminuída e redução da disponibilidade da glucose nos tecidos periféricos [71]. Estudos realizados em ratos com hipotiroidismo permitiram verificar deficiências na capacidade da insulina em aumentar a utilização da glucose nos tecidos periféricos, principalmente no músculo-esquelético, induzindo resistência à insulina [102] e que o metabolismo da glucose está diminuído nos adipócitos e no músculo-esquelético [103]. Em indivíduos com hipotiroidismo avaliou-se a ação da insulina ao nível do metabolismo da glucose, tendo-se observado uma diminuição da disponibilidade da glucose nos tecidos periféricos [104] e uma diminuição da secreção da insulina [105].

Indivíduos com diabetes tipo 1 com hipotiroidismo subclínico sofreram com maior frequência episódios de hipoglicemia durante os primeiros doze meses após o diagnóstico do que diabéticos eutiroideos [106]. Alguns estudos sugerem ainda uma maior probabilidade de complicações micro e macrovasculares da DM em doentes com hipotiroidismo [107, 108]. Além disso, o hipotiroidismo pode aumentar o risco de doenças cardiovasculares, quando associadas a outros fatores de risco como a hiperlipidemia e a hipertensão [109] ou por associação com dislipidemia, resistência à insulina e disfunção endotelial vascular [110]. O risco de desenvolver nefropatia aumenta em pacientes com DM tipo 2 com hipotiroidismo subclínico. Este risco pode ser explicado pela diminuição do débito cardíaco e pelo aumento da resistência vascular periférica quando na presença do hipotiroidismo e também pela diminuição do fluxo renal e da taxa de filtração glomerular daí resultante [111]. Em 2005, foi observado que o tratamento do hipotiroidismo melhora a função renal em pacientes diabéticos [112]. Em relação à retinopatia foi recentemente demonstrado que pacientes diabéticos com hipotiroidismo subclínico sofrem de retinopatias mais severas do que pacientes diabéticos eutiroideos [113]. Sabendo que as complicações vasculares associadas à DM são responsáveis pela elevada morbidade e mortalidade em pacientes diabéticos, o agravamento destas complicações em pacientes diabéticos com hipotiroidismo sugere que se efetuem rastreios para o hipotiroidismo em pacientes com DM.

4. Lípidos e o perfil do lípido plasmático

Para além de serem elementos constituintes das membranas e moléculas de armazenamento energético, os lípidos tem outras e variadas funções fisiológicas, tais como mediadores da transdução do sinal, facilitadores na modificação proteica, precursores de hormonas e na manutenção dos gradientes eletroquímicos [114, 115]. Uma classificação que divide os lípidos em 8 categorias e que contem subcategorias que permitem classificá-los de acordo com a sua estrutura e funções foi proposta por Fahy e colegas [116]. Estas 8 principais categorias incluem ácidos gordos (FA), glicerofosfolípidos (GP), glicolípidos (GL), esfingolípidos (SP), lípidos esteróis (ST), lípidos prenóis (PR), sacarolípidos (SL) e poliquetídeos (PK) [114, 115, 117]. No plasma, os lípidos mais abundantes são os glicerofosfolípidos, colesterol, ésteres de colesterol, glicerolípidos (triglicéridos) e os ácidos gordos não esterificados [118]. Por serem insolúveis em água, no plasma os lípidos encontram-se associados a proteínas, formando as lipoproteínas. Os glicerofosfolípidos (também chamados de fosfolípidos) são os principais constituintes da membrana celular e de lipoproteínas plasmáticas [119]. Relativamente à sua estrutura, os fosfolípidos são constituídos por um esqueleto de glicerol com três possíveis sítios de ligação, *sn-1*, *sn-2* e *sn-3*. Diferentes combinações de ácidos gordos saturados, monoinsaturados e/ou polinsaturados estão ligadas nas posições *sn-1*, *sn-2*, formando o domínio não polar dos GP. Esta diversidade de ácidos gordos promove uma grande variedade de fosfolípidos [117, 120]. Na posição *sn-3* está presente um grupo fosfato, ao qual diferentes moléculas polares se ligam, tais como, colina, etanolamina, glicerol, inositol e serina. A ligação entre o grupo fosfato a uma destas moléculas polares ou a um hidrogénio, gera a cabeça polar dos fosfolípidos, e conduzindo ao aparecimento de diferentes classes de GPs: fosfatidilcolina (PC), fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilserina (PS), fosfatidilglicerol (PG), fosfatidilinositol (PI) e ácido fosfatídico (PA) [121, 122]. A posição *sn-1* permite diferentes ligações como éster, vinil éter e alquil éter, originando 3 subclasses, fosfatidil, plasmanil e plasmenil, respetivamente. Nas células eucarióticas, as ligações éter ocorrem principalmente nas PCs, e nas PEs, onde a subclasse plasmanil é característica das PCs e a subclasse plasmenil corresponde às PEs [122, 123]. Quando uma das posições *sn-1* ou *sn-2* não têm ácidos gordos esterificados, estamos perante outro tipo de classes de

Glicerofosfolípidos, as liso-GP, que podem ser liso-PC, liso-PE ou outra classe consoante a estrutura da cabeça polar [123]. Dentro dos glicerofosfolípidos, as PCs e PEs constituem as classes mais abundantes de GPs nas lipoproteínas do plasma humano [118].

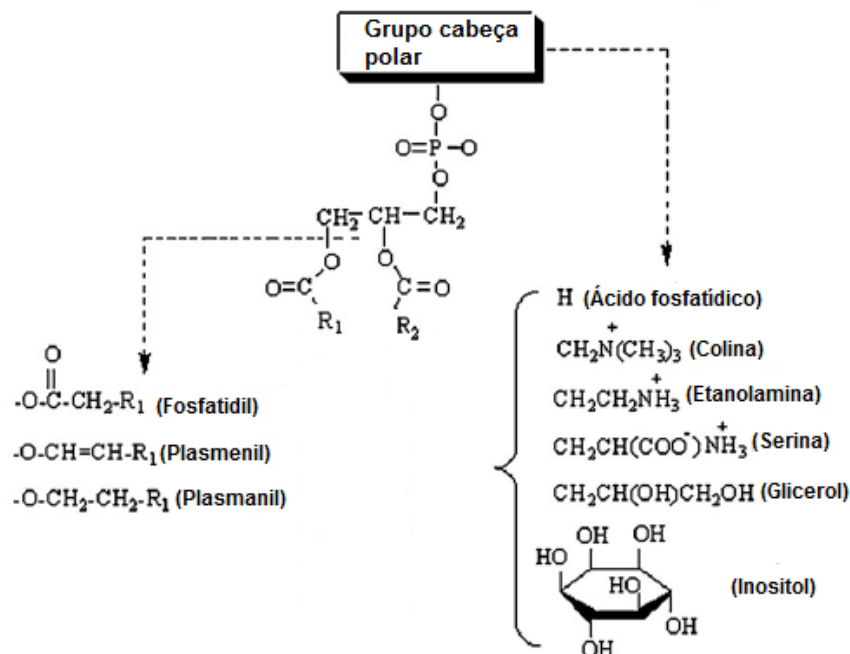


Figura 2. Estrutura dos glicerofosfolípidos. R₁ e R₂ representam os ácidos gordos esterificados nas posições *sn*-1 e *sn*-2. Fosfatidil, plasmênil e plasmanil representam diferentes subclasses de acordo com o tipo de ligação com a cadeia de hidrocarbonos na posição *sn*-1.

Perante distúrbios nos sistemas biológicos, os lípidos podem sofrer reações de oxidação, levando a alterações nas suas funções e consequentemente comprometer as funções celulares.

4.1. Stress oxidativo e peroxidação lipídica

O oxigénio é a molécula mais abundante num sistema biológico, sendo considerado o principal fornecedor de espécies reativas de oxigénio (ROS). Através de reações de oxidação-redução, o oxigénio molecular (O₂) leva à formação do radical superóxido (O₂^{•-}), que pode participar em outras reações, que conduzem à formação dos radicais hidroxilo (HO[•]). O radical hidroxilo é o ROS mais reativo sendo responsável por alterações de

biomoléculas, entre os quais os lípidos. A adição de um eletrão e de dois iões de hidrogénio ao radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$) origina a formação de peróxido de hidrogénio (H_2O_2). Este último pode levar à formação do radical hidroxilo através da reação de Fenton ($Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^3 + OH^- + OH\bullet$). Também pela reação de Haber-Weiss, o superóxido reage com o peróxido de hidrogénio formando o radical hidroxilo e oxigénio molecular ($O_2^{\bullet-} + H_2O_2 \rightarrow O_2 + OH^- + OH\bullet$) [124].

Quando a produção das ROS, excede a capacidade das defesas antioxidantes, representando um desequilíbrio entre a produção dos radicais livres e a capacidade dos sistemas biológicos de detoxificar estes radicais, ocorre o stress oxidativo [125]. Uma produção em excesso das ROS danifica todos os componentes celulares, desde proteínas, lípidos e ácidos nucleicos, e eventualmente culminando na morte celular [126]. A reação dos radicais livres com os ácidos gordos insaturados, existentes nos lípidos das membranas celulares e nas lipoproteínas, conduz a uma reação designada de peroxidação lipídica, que está associada às alterações na estrutura destas biomoléculas e consequentemente associada a uma diminuição das suas funções celulares [19].

O processo de peroxidação lipídica consiste em 3 passos: iniciação, propagação e terminação. Este processo inicia-se pela abstração de um átomo de hidrogénio das cadeias de ácidos gordos insaturados por parte de um radical livre produzindo um radical lipídico ($L\bullet$), que reage com um oxigénio para formar um radical peroxil ($LOO\bullet$). Este radical na presença de outro lípido (LH) ou outro dador de eletrões forma um hidroperóxido lipídico ($LOOH$) e um outro radical lipídico ($L\bullet$). O radical lipídico ($L\bullet$) sendo reativo pode conduzir à formação de novos radicais livres. Já o hidroperóxido lipídico ($LOOH$) pode sofrer degradação catalisada por metais de transição e produzir ainda mais radicais reativos, como o radical peroxil ($LOO\bullet$) ou o radical alcóxil ($LO\bullet$) [125]. Estes podem dar origem a derivados lipídicos com grupos hidroperóxidos e hidróxidos nos ácidos gordos insaturados.

Uma outra alteração estrutural dos fosfolípidos pode envolver a quebra da ligação éster, originando lisofosfolípidos, como por exemplo a lisofosfatidilcolina (LPC) se o fosfolípido oxidado for uma PC [119]. Por outro lado, os fosfolípidos oxidados nos ácidos gordos são muitas vezes, *in vivo*, sujeitos à ação de fosfolipases, especialmente a fosfolipase A2 (PLA2), que induzem a quebra de ligações ésteres com formação de lisofosfolípidos.

Os fosfolípidos oxidados em lipoproteínas, particularmente em LDL oxidadas, estão relacionados com os processos de inflamação, induzindo a ativação e adesão dos monócitos e a produção de citocinas e de outros mediadores da inflamação nos macrófagos, contudo, os mecanismos pelos quais os fosfolípidos oxidados (OxPL) induzem estes processos inflamatórios ainda não estão totalmente compreendidos [127]. Evidências indicam que o processo de peroxidação lipídica e a formação dos fosfolípidos oxidados estão envolvidos em doenças de inflamação crónica como as doenças cardiovasculares, a DM e as suas complicações [119]. O estudo dos lípidos nas amostras biológicas para uma melhor compreensão do seu papel no sistema biológico é realizado através da lipidómica.

4.2. Perfil fosfolípido da DM e do hipotiroidismo

Alguns estudos permitem demonstrar que a DM e o hipotiroidismo estão relacionados com alterações no perfil lipídico [128-135]. Na DM, um estudo para determinar a composição dos ácidos gordos nas frações lipídicas no soro verificou que a microalbuminúria em pacientes com DM tipo 2 está associada a uma diminuição dos ácidos gordos polinsaturados na fração dos triglicéridos no soro [128]. No hipotiroidismo, num estudo efetuado no músculo-esquelético de ratos observou-se uma significativa diminuição das insaturações dos ácidos gordos nas classes PC e PE [131].

Tanto na DM como no hipotiroidismo, o estudo do perfil dos fosfolípidos é efetuado maioritariamente em órgãos de animais. No caso do hipotiroidismo, os estudos efetuados no coração e fígado de ratos mostraram concordância na diminuição da concentração das PCs [132, 133]. Mais especificamente, o estudo realizado ao coração imaturo dos ratos verificou uma diminuição de concentração das PEs e PGs, sugerindo que um estado de hipotiroidismo conduz ao atraso na maturação das células cardíacas [132] enquanto no estudo em que avaliaram o perfil em fosfolípidos de fígado verificaram uma diminuição na concentração de cardiolípidos, CLs [133]. Já no caso da DM os estudos efetuados no fígado e miocárdio de ratos mostram concordância na diminuição da concentração das PEs [129, 130]. Mais especificamente, o estudo ao conteúdo dos fosfolípidos no núcleo do fígado de rato, para além da diminuição da concentração das PEs, verificou uma diminuição da concentração das restantes classes exceto na CL,

sugerindo que a insulina está envolvida na regulação do conteúdo dos fosfolípidos no núcleo [129]. Apesar da maioria dos estudos serem efetuados em animais, foram realizados estudos no plasma e soro humano com o intuito de avaliar a variação do perfil fosfolipídico da DM tipo 2. A identificação da variação do perfil entre a DM2 e os controlos, permitiu concluir que as principais diferenças se verificaram nas PEs e Liso-PCs. Mais especificamente, no modo positivo, na classe das PEs encontram-se iões $[M + Na]^+$ em m/z 786,6 (C16:0/22:6) e 788,5 (C18:0/20:4) e na classe das Liso-PC encontram-se iões $[M + H]^+$ em m/z 496,4 (C16:0) e 524,4 (C18:0), não indicando se estas diferenças se devem a um aumento ou diminuição do conteúdo fosfolipídico [134]. No perfil dos fosfolípidos do soro observou-se um aumento das diacil-PCs (C32:1; C36:1; C38:3; C40:5) e uma diminuição das acil-alquil-PCs (C34:3; C40:6; C42:5; C44:4; C44:5) e liso-PC (C18:2) em pacientes com DM2 [135].

Apesar de tanto a DM como o hipotiroidismo estarem relacionados com alterações no perfil fosfolipídico, o estudo do perfil fosfolipídico na DM com hipotiroidismo não foi realizado. Assim, fomos comparar o perfil fosfolipídico de pacientes diabéticos e pacientes diabéticos com hipotiroidismo.

5. Lipidómica

A lipidómica, um ramo da metabolómica, dedica-se ao estudo de todos os lípidos, das interações entre lípidos e lípidos com outras moléculas e das funções destes dentro do sistema biológico. Esta abordagem permite uma análise compreensiva das mudanças biológicas dos lípidos no sistema biológico e fornecerá uma poderosa ferramenta na compreensão dos mecanismos que ocorrem durante as alterações fisiopatológicas [117, 136]. O desenvolvimento da lipidómica é alcançado através da união de técnicas como a espectrometria de massa (MS) e a cromatografia e normalmente envolve alguns passos: extração, separação e análise [123]. A extração dos lípidos dos sistemas biológicos explora a elevada solubilidade destes compostos em solventes orgânicos. Os métodos cromatográficos permitem a separação e a identificação das diferentes classes de fosfolípidos. Por último, a análise é levada a cabo através da espectrometria de massa [115].

O passo da extração é importante na análise dos lípidos, uma vez que a sua baixa solubilidade em água torna possível a sua separação das proteínas e ácidos nucleicos. Sendo solúveis em solventes orgânicos, o uso de diferentes combinações destes solventes permite a extração dos lípidos de interesse. Os solventes não-polares podem ser usados na extração de lípidos neutros (ex: ésteres de ácidos gordos e acilgliceróis). No caso dos lípidos mais polares, como os fosfolípidos, é recomendado o uso de solventes mais polares, como o metanol e o acetonitrilo [117]. Existem vários métodos para extração dos lípidos das amostras biológicas, incluindo a extração líquido-líquido (LLE) e a extração em fase sólida (SPE). Os métodos de extração LLE mais comuns são o método de Folch e posteriormente o método de Bligh e Dyer. O método SPE foi proposto para um isolamento dos fosfolípidos no soro humano usando uma coluna de aminopropil, HybridSPE-PL da Supelco (Bellefonte, PA, USA) e este será o método usado no nosso estudo. Estas colunas possuem um disco (*frit*) que atua como um filtro para remoção das proteínas precipitadas permitindo a passagem dos analitos de interesse [137].

A separação das diferentes classes de fosfolípidos pode ser realizada por métodos cromatográficos, incluindo a cromatografia de camada fina e a cromatografia líquida. A cromatografia de camada fina, TLC, era o método de separação mais utilizado na análise de lípidos e fosfolípidos, contudo, nos últimos anos a cromatografia líquida de alta resolução, HPLC, tem vindo a ganhar destaque. A HPLC tem boa reprodutibilidade e uma elevada resolução [136]. A HPLC é uma técnica automatizada, onde a capacidade, eficiência, seletividade e resolução são importantes. A capacidade e resolução da coluna são variáveis e dependentes do fabricante da coluna. A coluna precisa de ter a capacidade de reter os solutos e deve ter a seletividade apropriada para resolver os analitos de interesse [138]. Um sistema de HPLC consiste numa bomba, um injetor, uma coluna, um detetor e um sistema de processamento de dados (Figura 3).

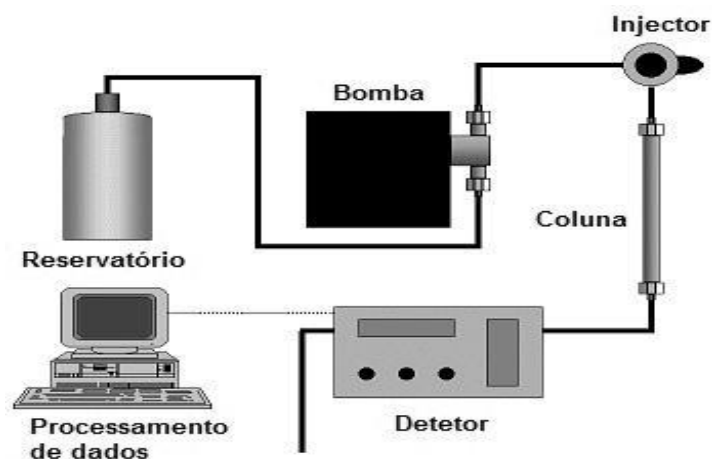


Figura 3. Representação esquemática dos principais constituintes da HPLC.

A HPLC acoplada com MS permite a separação das diferentes classes de fosfolípidos e a análise dos componentes moleculares destas resultantes. Esta separação é geralmente feita utilizando colunas de HPLC de fase normal. A eluição das espécies de fosfolípidos depende de variados fatores, como, propriedades químicas, o grupo cabeça, o comprimento e o grau de insaturação das cadeias acil [121]. A análise por HPLC-MS aumenta a sensibilidade dos componentes minoritários, quando comparada com a análise direta das amostras [139].

A espectrometria de massa é uma técnica analítica com elevada sensibilidade, seletividade, especificidade e rapidez. A detecção dos iões, pelo espectrómetro, após a sua separação é representada pela razão massa (m) e carga do ião (z), m/z . Os dados são apresentados num espectro, onde a razão massa/carga (m/z) encontra-se no eixo do x e a abundância relativa do ião (tal como a intensidade relativa) no eixo do y, após a normalização comparativa ao ião mais abundante [120]. Um espectrómetro de massa é constituído por 4 componentes principais: um sistema para introdução da amostra; a fonte de ionização; o analisador (ou conjunto de analisadores) e o detector. A amostra pode ser introduzida na fonte de ionização através de injeção direta ou através de outros aparelhos, como o HPLC e a cromatografia gasosa, GC. Na fonte de ionização, as moléculas são ionizadas, produzindo um feixe de iões em fase gasosa. As fontes de ionização mais comuns são ionização em eletrospray, ESI e *matrix-assisted laser desorption/ionization*, MALDI. No analisador, os iões resultantes são selecionados e separados de acordo com a sua razão m/z . Por fim, no detetor os iões são coletados e caracterizados através da produção

de um sinal, no qual a intensidade está relacionada com o número de íões detetados. A partir de um computador toda a informação recebida é integrada e transformada num espectro de massa. [117, 120]. Os espectrómetros de massa têm uma característica muito importante, o elevado vácuo presente no instrumento (10^{-5} a 10^{-7} Torr), que aumenta o espaço livre dos íões [120]. Nos últimos anos, espectrometria de massa tem vindo a ser commumente utilizada na lipidómica, uma vez que a seletividade, especificidade, sensibilidade e rapidez permitem que esta seja a técnica ideal na análise de lípidos e fosfolípidos [120].

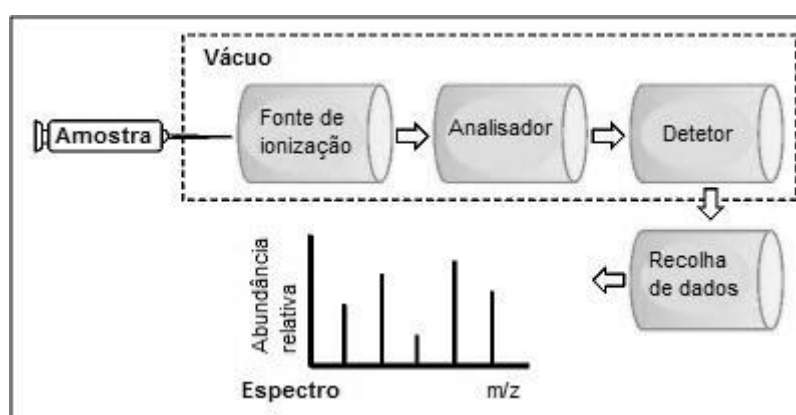


Figura 4. Representação esquemática dos principais componentes de um espectrómetro de massa.

O primeiro método de ionização desenvolvido foi o impacto de electrões, EI, o qual só se aplica a compostos voláteis e termoestáveis, seguindo-se o *fast atom bombardment*, FAB, permitindo a análise de composto não voláteis e termicamente instáveis. Mais recentemente, os métodos ESI e MALDI foram desenvolvidos permitindo a análise de moléculas não voláteis e termoestáveis, como os fosfolípidos [120]. O método de ionização ESI foi inicialmente desenvolvido por Fenn e colegas em 1989, e tem sido extensivamente usado em diversas aplicações. Os analitos de interesse são introduzidos na fonte de ionização através de um tubo capilar. Um forte campo elétrico é aplicado à solução enquanto esta passa pelo tubo capilar num fluxo lento. O campo elétrico induz acumulação de carga na superfície da solução no final do tubo capilar de maneira a pulverizar a fase móvel em gotículas altamente carregadas. Durante a corrida, estas gotículas passam através de um gás inerte aquecido para dessolvatação antes da análise dos espectros de massa das espécies iónicas individuais [120, 140]. Dependendo das propriedades químicas dos compostos, estes podem ser ionizados no modo positivo ou negativo. As maiores

vantagens do método ESI-MS são a elevada exatidão, sensibilidade, reprodutibilidade e aplicabilidade para com soluções fosfolípídicas complexas sem prévia derivatização [120, 140]. As fontes de ionização ESI podem ser combinadas com diferentes analisadores de massa, tais como, *ion trap*, IT, quadrupolo, Q, tempo de voo, TOF, orbitrap e *Fourier transform ion cyclotron*, FT-ICR [117, 120].

No analisador os iões formados são separados de acordo com a sua razão m/z . Todos os analisadores diferem na sua precisão (o erro na determinação da massa exata comparado com o valor teórico); na sua resolução (o valor da massa m dividido pela diferença da massa entre perfis de 2 iões com a diferença da menor massa); no alcance dinâmico e na sua capacidade de realizar espectrometria de massa em tandem. Existem diversos analisadores que são usualmente utilizados na análise dos fosfolípidos em espectrometria de massa: quadrupolo (Q), *ion trap* (IT), tempo de voo (TOF) e orbitrap [120]. O *linear ion trap* utilizado durante este estudo é um multipolo, onde os iões estão confinados a uma dimensão radial através um campo quadrupolo e a uma dimensão axial por meio de um campo eléctrico na extremidade da armadilha [117].

Os métodos de ionização ESI e MALDI têm como principal vantagem a ausência de fragmentações nos espectros de MS, permitindo uma rigorosa determinação da massa molecular dos componentes da amostra. Contudo, essa ausência não permite a obtenção de informação estrutural das moléculas em estudo. Assim, é necessário proceder à fragmentação dos iões através da dissociação dos iões formados inicialmente. Esta técnica é chamada de espectrometria de massa em tandem ou MS/MS [120]. Para realizar análises de MS/MS utilizam-se tradicionalmente espectrómetros de massa constituídos por dois analisadores separados por uma câmara de colisão. Esta técnica envolve vários passos: seleção e isolamento dos iões de interesse; fragmentação numa célula de colisão por interação com um gás; separação dos iões produto pela sua razão m/z e caracterização através de um segundo analisador. No entanto os espectrómetros de massa com analisadores *ion trap* já fazem esta análise em apenas um analisador. Por outro lado, os números de passos num espectrómetro de massa *ion trap* podem aumentar permitindo obter espectros de MSⁿ e podendo-se assim seguir as fragmentações dos iões em estudo e ter mais informação detalhada (o n representa o número de gerações de iões a ser analisados) [141].

A espectrometria de massa permite a identificação dos fosfolípidos em diferentes amostras. O espectro de MS obtido após a primeira análise permite obter a informação acerca do peso molecular de cada espécie lipídica através da razão m/z . O espectro de MS/MS permite confirmar os detalhes estruturais dos fosfolípidos, como a estrutura da cabeça e saber quais os ácidos gordos presentes no lípido [142]. Cada classe de fosfolípidos, dependendo do grupo cabeça polar, tem a capacidade de formar iões positivos e/ou negativos [120]. As PCs, PSs e PEs podem ser analisados no modo positivo, formando iões $[M + H]^+$ ou iões $[M + X]^+$ ($X=Na, Li$ e K), enquanto as PGs, PIs, PAs, PSs e PEs podem ser analisados no modo negativo, formando iões $[M - H]^-$ [141].

As PCs caracterizam-se pela presença de um nitrogénio quaternário, com carga positiva, formando o ião $[M + H]^+$. O espectro M/MS do ião $[M + H]^+$ de uma PC mostra um ião abundante no m/z 184, correspondente à cabeça polar da PC $[H_2PO_4(CH_2)_2N(CH_3)_3]^+$. Outros iões produto com baixa abundância relativa podem ser formados de acordo com a perda das cadeias de ácidos gordos localizadas na posição *sn*-1 (R_1COOH e $R_1=C=O$) e na posição *sn*-2 (R_2COOH e $R_2=C=O$). Os ácidos gordos podem ser identificados pela formação do ião $[M + H - R_2 = C = O]^+$ com maior abundância que a formação do ião $[M + H - R_1 = C = O]^+$, o que permite a distinção da posição de certo ácido gordo no esqueleto do glicerol. No modo positivo, as PCs podem também ionizar como $[M + Na]^+$, formando iões produto devido à perda -59 Da (NCH_3)₃, -183 Da $HPO_4(CH_2)_2N(CH_3)_3$, -205 Da $NaHPO_4(CH_2)_2N(CH_3)_3$ e à perda dos ácidos gordos presentes nas posições *sn*-1 e *sn*-2 do esqueleto do glicerol [122].

No modo positivo, as PEs formam os iões $[M + H]^+$ e $[M + Na]^+$ enquanto no modo negativo formam o ião $[M - H]^-$. O espectro MS/MS dos iões $[M + H]^+$ e $[M + Na]^+$ mostra um ião devido à perda de 141 Da, correspondente à perda da cabeça polar $[H_2PO_4(CH_2)_2NH_3]_3$. A fragmentação dos iões $[M - H]^-$ leva à formação de aniões carboxilatos ($RCCO^-$), permitindo a identificação dos ácidos gordos nas posições *sn*-1 (R^1CCO^-) e posições *sn*-2 (R^2COO^-), sendo a abundância relativa do ião R^2COO^- maior do que a abundância relativa do ião R^1CCO^- [122, 141].

II. Objetivos

O presente trabalho teve como objetivo geral avaliar a associação entre a DM e o hipotireoidismo, colocando a hipótese do hipotireoidismo ser uma complicação diabética. Nesse sentido o trabalho foi desenvolvido em 2 vertentes:

- a) Avaliar a incidência de hipotireoidismo numa população diabética em comparação com uma população não diabética diagnosticados no Centro Hospitalar do Baixo Vouga, E.P.E. - Aveiro (CHBV) e selecionados entre Dezembro de 2012 e Abril de 2013.

- b) Avaliar alterações no perfil de três classes de fosfolípidos (PC, LPC e PE) do soro de pacientes diabéticos e de pacientes diabéticos com hipotireoidismo.

III. Materiais e métodos

O presente trabalho foi desenvolvido em duas vertentes, a primeira foi uma análise dos dados de uma população diabética em comparação com uma população não diabética e a segunda um trabalho laboratorial. A realização do primeiro estudo foi aprovada pela Comissão de Ética do Centro Hospitalar do Baixo Vouga, E.P.E. – Aveiro.

A. *Caracterização da população diabética e da população não diabética – estudo retrospectivo*

1. Seleção e caracterização da população

Na elaboração da presente tese de mestrado realizou-se um estudo retrospectivo que inclui indivíduos com e sem Diabetes mellitus diagnosticados no Centro Hospitalar do Baixo Vouga, CHBV. Os pacientes incluídos foram divididos em dois grupos: pacientes com Diabetes mellitus (DM) tipo 1 e tipo 2 – DM1 e DM2 e pacientes não diabéticos – CTL. A seleção dos pacientes com DM foi efetuada entre Dezembro de 2012 e Janeiro de 2013 através dos registos do exame laboratorial de hemoglobina glicada (Hb1Ac), realizados pelo Serviço de Química Clínica por suspeita de Diabetes mellitus. Através do sistema Appolo (Sistema de informação para o laboratório de análises clínicas) foram obtidos dados clínico-laboratoriais tais como: os valores séricos da glucose, albumina, proteína C reativa, velocidade de sedimentação, colesterol total, triglicérides, HDL, LDL, creatina cinase, aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), TSH, T4L e T3L. Posteriormente, através do SAM, Sistema de Apoio ao Médico, foram obtidos dados clínico-laboratoriais tais como: a idade e o sexo dos pacientes, tipo de diabetes mellitus e respetiva data de diagnóstico, presença de hipertensão e potencial diagnóstico de hipotiroidismo e respetiva data de diagnóstico.

A seleção do grupo CTL foi efetuada entre Janeiro e Abril de 2013 através dos registos do exame laboratorial de Hb1Ac realizados pelo Serviço de Química Clínica. Posteriormente, através do SAM, Sistema de Apoio ao Médico, foram selecionados os

pacientes não diabéticos. Os valores de referência dos diferentes parâmetros considerados no presente estudo foram os sugeridos pelo fabricante dos aparelhos automáticos utilizados, como apresentados na Tabela 3.

Tabela 3. Parâmetros laboratoriais e respectivos valores de referência.

Parâmetros	Valores de referência
Glucose	< 126 mg/dL - Normal
HbA1c	< 6,5 %
TSH	0,35-5,5 mU/L
T4L	0,8-1,8 ng/dL
T3L	2,3-4,2 pg/dL
Albumina	3,5-5,2 g/dL
PCR	< 0,5 mg/dL
VS	< 15 Sexo Masculino < 20 Sexo Feminino
Colesterol total	< 200 mg/dL
Triglicerídeos	< 150 mg/dL
HDL	35-60 mg/dL
LDL	0-130 mg/dL
Creatina cinase	21-232 U/L
AST	10-37 U/L
ALT	30-65 U/L

2. Análise estatística

A análise estatística dos dados clínico-laboratoriais foi realizada utilizando os programas Excel® 2010 (Microsoft Corporation, USA) e o GraphPad Prism 5® (GraphPad Software Inc, USA). Os resultados são apresentados como média \pm desvio padrão.

B. Procedimento experimental da extração e quantificação de fosfolípidos no soro humano

1. Amostras biológicas

Para a avaliação do perfil fosfolípido foram recolhidos soros de indivíduos incluídos em três grupos: controlo (de voluntários saudáveis), diabéticos e diabéticos com hipotireoidismo. Foram analisadas três amostras de cada grupo.

2. Extração de fosfolípidos

Dissolveu-se o padrão dimiristoil-fosfatidilcolina (DMPC) (PC 14:0/14:0) em clorofórmio, retirando-se 5 µL para eppendorfs, seguido de secagem sob fluxo de nitrogénio. Posteriormente adicionou-se 100 µL de soro e 900 µL de acetonitrilo:1% ácido fórmico, seguidos de agitação no vórtex durante 30 segundos para precipitação das proteínas. A mistura foi centrifugada a 5000 rpm durante 3 minutos, à temperatura ambiente (centrífuga Mixtasel Centrifuge (Selecta)). O sobrenadante obtido foi posteriormente submetido à extração em fase sólida (SPE). Numa coluna HybridSPE-PL adicionou-se 1 mL de acetonitrilo, seguindo-se a adição de 950 µL do sobrenadante resultante, de 1 mL de acetonitrilo:1% ácido fórmico, e de 1 mL de acetonitrilo. Posteriormente eluiu-se a coluna duas vezes com 1 mL de acetonitrilo:5% hidróxido de amónio, recolhendo os extratos lipídicos para um frasco de recolha. Os extratos foram submetidos a secagem sob fluxo de nitrogénio e armazenados a -20°C, para subsequente análise.

3. Instrumentação HPLC

De maneira a identificar as espécies moleculares e as alterações do perfil de fosfolípidos dos soros dos pacientes diabéticos com e sem hipotireoidismo, o extrato

lipídico obtido por SPE foi analisado por HILIC-LC-MS, usando-se para o efeito um sistema HPLC (Waters Alliance 2690) acoplado a um espectrómetro de massa *linear ion trap* (ThermoFinnigan, San Jose, CA, USA). A fase móvel A consistiu em 10% água e 55% acetonitrilo com 35% (v/v) de metanol. A fase móvel B consiste em acetonitrilo 60%, metanol 40% com 10 mM de acetato de amónio. 15 µL do extrato lipídico total foi diluído na fase móvel B e a mistura reacional foi introduzida numa coluna Ascentis Si HPLC Pore (15 cm×1.0 mm, 3 µm) (Sigma-Aldrich). O gradiente do solvente foi programado da seguinte maneira: 0% de A com um aumento linear de A durante 20 minutos, e mantido isocriticamente durante 35 minutos, retomando as condições iniciais em 5 minutos. A taxa de fluxo através da coluna foi de 16 µL/min, obtida usando uma *pre-column split* (Acurate, LC Packings, USA). O LC-MS foi realizado com um padrão interno para confirmar e quantificar as variações dos iões observadas no espectro, de acordo com os métodos Lipid Maps [139]. O padrão de PL usado foi PC (14:0/14:0), que foi adicionado ao soro antes da extração com SPE.

4. Condições da espectrometria de massa por electrospray

A análise dos fosfolípidos foi efetuada em no modo positivo no espectrómetro de massa *linear ion trap* (ThermoFinnigan, San Jose, CA, USA). As condições ESI no espectrómetro de massa foram as seguintes: a voltagem do electrospray no modo positivo foi de 5kV; a temperatura capilar de 275°C e o fluxo de gás foi de 25 unidades. Uma largura de isolamento de 0,5 Da foi usada com um tempo de ativação de 30 ms para experimentos MS/MS. Os espectros MS e MS/MS foram adquiridos com um tempo máximo de ionização de 50 ms e 200 ms, respetivamente. A energia de colisão utilizada variou entre 17 e 20 (unidades arbitrárias) para MS/MS. Para a aquisição e visualização dos dados utilizou-se o programa *Xcalibur data system* (V2.0).

5. Análise estatística

A análise estatística dos dados foi realizada utilizando os programas Excel® 2010 (Microsoft Corporation, USA) e o GraphPad Prism 5® (GraphPad Software Inc, USA).

Os resultados são apresentados como média \pm desvio padrão. As diferenças entre os diferentes grupos experimentais foram determinadas pelo teste t-student. Considerou-se diferenças significativas valores de p-value $< 0,05$ (com um nível de confiança de 95%).

IV. Resultados e Discussão

A. Caracterização da população diabética e da população não diabética – estudo retrospectivo

1. Caracterização dos dados clínico-laboratoriais

Neste estudo foram selecionados 175 pacientes diabéticos acompanhados no CHBV no tempo compreendido entre Dezembro de 2012 e Janeiro de 2013 e 175 utentes sem Diabetes mellitus (incluídos no grupo controlo) no tempo compreendido entre Janeiro e Abril de 2013. No grupo CTL, as idades dos indivíduos variaram entre os 16 e 96 anos, sendo a média de $65,3 \pm 17,5$. Em relação ao sexo, 64,0% eram do sexo feminino e 36,0% eram do sexo masculino. No grupo DM, o diagnóstico de DM foi efetuado entre 1992 e 2013, embora na maioria dos casos o diagnóstico foi realizado nos últimos 5 anos (66,9%). A idade dos pacientes incluídos neste grupo variou entre 13 e 93 anos com uma média de $67,1 \pm 16,6$, sendo 53,7% do sexo feminino e 46,3% do sexo masculino. De entre estes, 4,6% dos pacientes apresentavam DM1, dos quais 37,5% eram do sexo feminino e 62,5% do sexo masculino e 95,4% dos pacientes apresentavam DM2, sendo 54,5% do sexo feminino e 45,5% do sexo masculino (Figura 6).

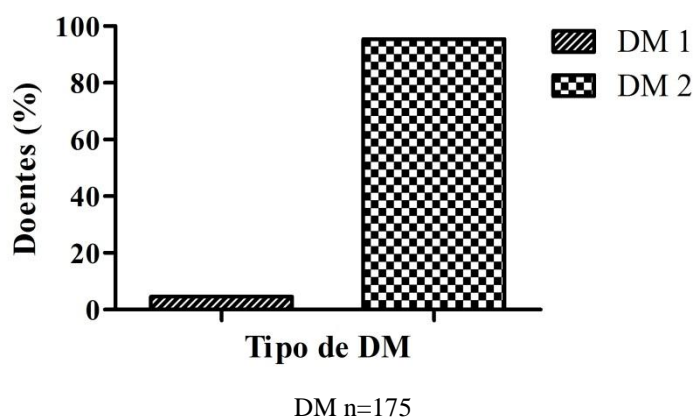
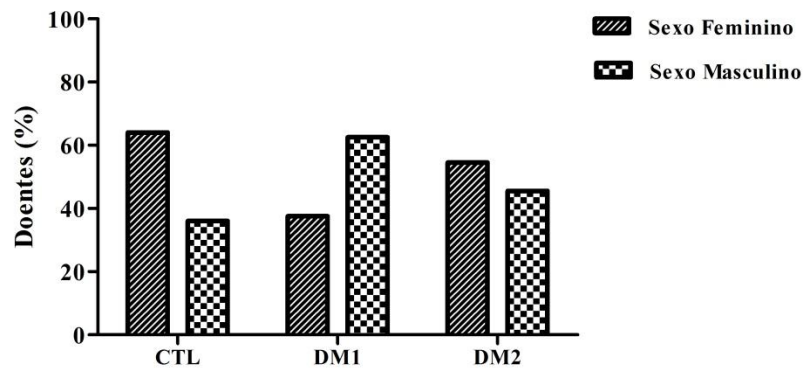


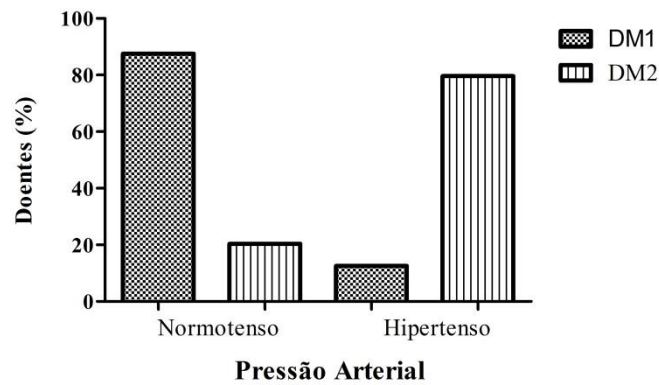
Figura 5. Distribuição dos doentes diabéticos de acordo com o tipo de DM.



A, CTL, DM1 & DM2 n=175, (p=0,13)

Figura 6. Distribuição dos controlos (CTL) e doentes DM1 e DM2 de acordo com o sexo.

A análise dos processos clínicos revelou que o número de casos de hipertensão nos pacientes diabéticos era elevado (76,6%), verificando-se uma maior incidência nos pacientes com DM2 (Figura 7). Uma elevada prevalência de hipertensão está associada à DM [4].



DM1 n=8 & DM2 n=167

Figura 7. Distribuição dos pacientes DM1 e DM2 de acordo com a Pressão Arterial.

Os pacientes diabéticos foram analisados com base na hemoglobina glicada superior a 6,5%. A sua concentração variou entre 6,5% e 11,9% e a média foi de $7,8 \pm 1,2$. A concentração da glucose em jejum variou entre 67,7 e 428,7 mg/dL e a média foi de $163,5 \pm 57,7$, sendo que 85,7% dos pacientes apresentaram hiperglicémia ([glucose em jejum] >126 mg/dL) (Figura 8).

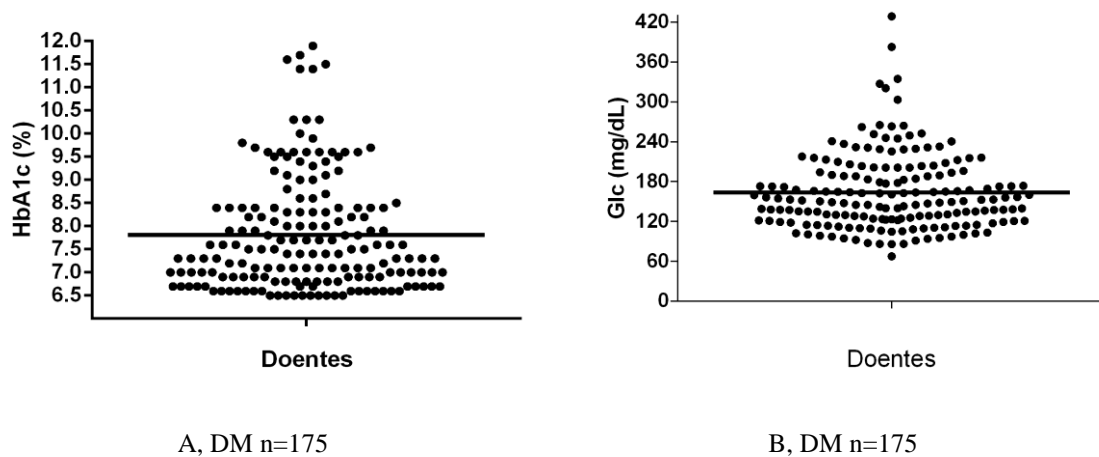


Figura 8. Distribuição dos pacientes diabéticos de acordo com: a concentração da hemoglobina glicada (A) e a concentração de glicose (B).

Uma vez que a DM está associada ao desenvolvimento de diversas complicações, para além da avaliação da glicose e da HbA1c, avaliaram-se outros parâmetros, tais como, albumina, proteína C-reativa, velocidade de sedimentação, colesterol total, HDL, LDL, triglicerídeos, creatina cinase, AST e ALT.

A concentração de albumina variou entre 1,7 e 5,0 g/dL e a média foi de $3,7 \pm 0,8$, sendo que 27,3% dos pacientes apresentaram valores inferiores a $\leq 3,5$ g/dL. A diminuição da albumina sérica tem sido associada à DM [143]. A concentração da proteína C reativa variou entre 0,1 e 31,5 mg/dL e a média foi de $2,2 \pm 4,3$, sendo que 65,6% dos pacientes apresentaram um valor elevado ([Proteína C reativa] $> 0,5$ mg/dL). O aumento da concentração da proteína C-reativa está associado à DM, indicando um estado inflamatório nos pacientes diabéticos [144]. A velocidade de sedimentação no sexo feminino variou entre 2 e 94 mm/h, sendo que 74,4% dos pacientes do sexo feminino apresentaram valores elevados (velocidade de sedimentação > 20 mm/h). Por outro lado, a velocidade de sedimentação no sexo masculino variou entre 4 e 120 mm/h, sendo que 80,8% dos pacientes do sexo masculino apresentaram valores elevados (velocidade de sedimentação > 15 mm/h) (Tabela 4). A média total da velocidade de sedimentação foi de $35,5 \pm 20,5$. À semelhança da proteína C-reativa, os valores aumentados de velocidade de sedimentação evidenciam uma resposta inflamatória nos pacientes diabéticos [145].

O perfil lipídico foi avaliado para todos os pacientes selecionados. A concentração do colesterol total variou entre 83 e 364 mg/dL e a média foi de $177,8 \pm 42,3$, sendo que 25,9% dos pacientes apresentaram hipercolesterolemia ([colesterol] > 200 mg/dL). A concentração de HDL variou entre 6,4 e 111 mg/dL e a média foi de $47,3 \pm 17,3$, sendo que 17,3% dos pacientes apresentaram valores baixos ([HDL] < 35 mg/dL) e 20,4% dos pacientes apresentaram valores elevados ([HDL] > 60 mg/dL). A concentração de LDL variou entre 35 e 272 mg/dL e a média foi de $103,9 \pm 36,2$, sendo que 17,5% dos pacientes apresentaram valores elevados ([LDL] > 130 mg/dL) (Tabela 4). Efetivamente, o perfil lipídico dos pacientes diabéticos é caracterizado por concentrações elevadas de LDL e de triglicéridos e por baixas concentrações de HDL [146].

Tabela 4. Apresentação, em percentagem dos valores diminuídos, normais e elevados das concentrações de albumina, proteína C reativa, velocidade de sedimentação, colesterol total, HDL e LDL.

Valor	Albumina (%)	Proteína C-Reativa (%)	Velocidade de Sedimentação (%)	Colesterol Total (%)	HDL (%)	LDL (%)
Diminuído	27,3	-	-	-	17,3	-
Normal	72,7	34,4	23,1	74,1	62,3	82,5
Aumentado	-	65,6	76,9	25,9	20,4	17,5

A concentração de triglicéridos variou entre 26 e 502 mg/dL e a média foi de $129,8 \pm 71,2$, sendo que 33,1% dos pacientes apresentaram hipertrigliceridemia ([triglicéridos] > 150 mg/dL). A concentração da creatina cinase variou entre 16 e 713 U/L e a sua média foi de $103 \pm 100,4$, sendo que 6,7% dos pacientes apresentaram valores baixos ([creatina cinase] < 21 U/L) e 7,6% dos pacientes apresentaram valores elevados ([creatina cinase] > 232 U/L). O aumento da concentração de creatina cinase ocorre em consequência de alterações cardiovasculares, pelo que níveis elevados deste parâmetro em pacientes diabéticos pode sugerir a ocorrência de complicações cardiovasculares [147]. A concentração do aspartato aminotransferase variou entre 5 e 215 U/L e a média foi de $30,6 \pm 26,7$, sendo que 19,9% dos pacientes apresentaram valores elevados ([AST] > 37 U/L). A concentração da alanina aminotransferase variou entre 19 e 352 U/L e a média foi de $51,7 \pm 39,8$, sendo que 16,6% dos pacientes apresentaram valores elevados ([ALT] > 65

U/L) (Tabela 5). A AST e a ALT são dois dos parâmetros mais comumente analisados para avaliação da função hepática, encontrando-se elevadas em pacientes diabéticos [148].

Tabela 5. Apresentação, em percentagem dos valores diminuídos, normais e elevados das concentrações de triglicerídeos, creatina cinase, aspartato aminotransferase e alanina aminotransferase.

Valor	Triglicerídeos (%)	Creatina cinase (%)	AST (%)	ALT (%)
Diminuído	-	6,7	0,7	9,9
Normal	66,9	85,7	79,5	73,5
Aumentado	33,1	7,6	19,9	16,6

2. Avaliação da relação entre a Diabetes mellitus e o hipotireoidismo na população em estudo

Para avaliar a incidência do hipotireoidismo numa população diabética em comparação com uma população não diabética, analisou-se os processos clínicos e o valor da TSH nestas populações. Na população não diabética, verificou-se uma incidência de 8,6% de casos de hipotireoidismo. Já na população diabética a incidência desta doença foi de 10,9% de casos de hipotireoidismo, verificando-se um pequeno aumento no número de casos em relação à população não diabética (Figura 9).

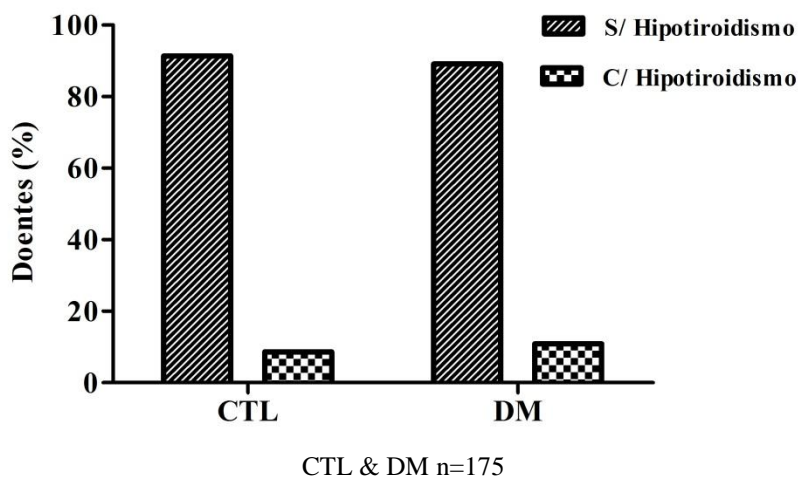
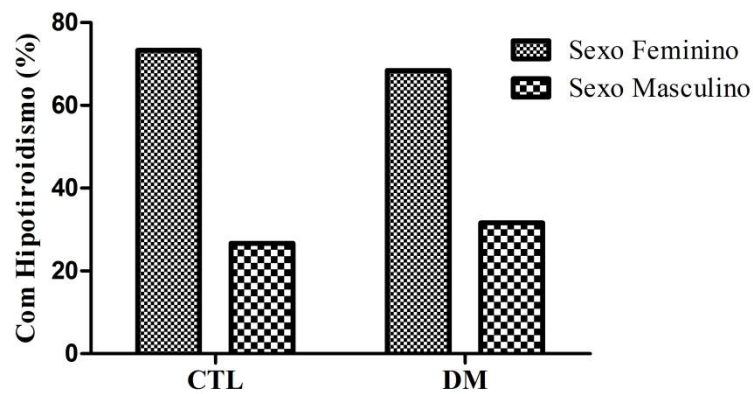


Figura 9. Distribuição dos controles e dos pacientes diabéticos de acordo com a presença de hipotireoidismo.

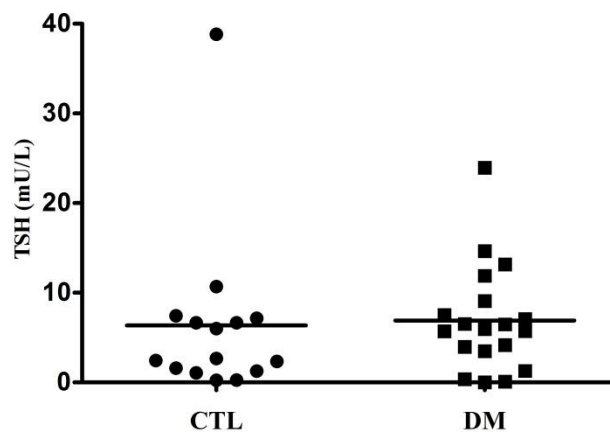
Na população de 175 pacientes diabéticos, a incidência de 10,9% de hipotireoidismo corresponde a 19 pacientes diabéticos com hipotireoidismo. Estes indivíduos foram analisados em relação ao tipo de DM, idade e sexo. Apenas se verificaram casos de hipotireoidismo em pacientes com DM tipo 2 e a idade variou entre 33 e 89 anos, com uma média de $71,5 \pm 14,5$. Em relação ao sexo, 31,6% dos indivíduos eram do sexo masculino e 68,4% do sexo feminino. Também na população não diabética a maioria dos indivíduos com hipotireoidismo era do sexo feminino (73,3%) e a média da idade foi de $68,1 \pm 11,7$, variando entre os 50 e os 85 anos (Figura 10).



CTL n=15 & DM n=19

Figura 10. Distribuição dos controles com hipotiroidismo e dos pacientes diabéticos com hipotiroidismo de acordo com o sexo.

A média da concentração da TSH apresenta valores próximos entre a população diabética com hipotiroidismo, com uma média de $6,9 \pm 5,9$ e a população não diabética com hipotiroidismo, com uma média de $6,4 \pm 9,5$ (Figura 11). Contudo, na população não diabética com hipotiroidismo a concentração da TSH variou entre 0,23 e 38,83 mU/L, verificando uma menor variação na população diabética com hipotiroidismo, variando entre 0,01 e 23,98 mU/L.



CTL n=15 & DM n=19

Figura 11. Distribuição da TSH de acordo com os controles com hipotiroidismo e com os pacientes diabéticos com hipotiroidismo.

Apesar dos dados clínicos laboratoriais para o diagnóstico de hipotiroidismo estarem disponíveis nos processos clínicos, apenas 11 dos 19 casos, ou seja, 57,9% dos casos de hipotiroidismo nos pacientes diabéticos estavam diagnosticados antes da seleção

da população em estudo, tendo sido os restantes diagnosticados posteriormente. A maioria dos pacientes diabéticos evidenciou hipotireoidismo primário (78,9%), contudo em alguns dos pacientes o hipotireoidismo primário encontrava-se sob tratamento, apresentando valores de TSH inferiores a 5,5 mU/L e valores de T4L e T3L normais. Na maioria dos pacientes diabéticos com hipotireoidismo, as concentrações da T4L e/ou da T3L encontraram-se dentro dos valores de referência mas próximas do limite inferior. A concentração da T4L variou entre 0,79 e 1,74 ng/dL e a média foi de $1,2 \pm 0,2$. A concentração da T3L variou entre 1,58 e 3,49 pg/dL e a média foi de $2,8 \pm 0,5$ (Tabela 6).

Tabela 6. Caracterização dos pacientes diabéticos com hipotireoidismo A) diagnosticados anteriormente e B) diagnosticados posteriormente à seleção da população em estudo, de acordo com: tipo de DM, idade, sexo, TSH (valores de referência: 0,35-5,5 mU/L), T4L (valores de referência: 0,8-1,8 ng/dL) e T3L (valores de referência: 2,3-4,2 pg/dL).

	Tipo de DM	Idade	Sexo	TSH (mU/L)	T4L (ng/dL)	T3L (pg/dL)
A	Tipo 2	82	M	23,95	0,79	1,85
	Tipo 2	64	F	11,88	1,19	2,46
	Tipo 2	76	F	9,09	1,15	1,58
	Tipo 2	33	F	5,73	1,35	2,7
	Tipo 2	77	F	4,17	1,13	3
	Tipo 2	62	F	3,96	1,08	3,26
	Tipo 2	56	F	3,5	0,88	2,79
	Tipo 2	78	M	1,29	1,43	3,01
	Tipo 2	49	F	0,36	1,26	2,97
	Tipo 2	84	F	0,1	1,14	2,16
	Tipo 2	88	F	0,01	1,74	2,35
B	Tipo 2	81	F	14,66	0,97	2,9
	Tipo 2	74	M	13,17	1,24	3,1
	Tipo 2	89	F	7,54	1,19	3,1
	Tipo 2	83	F	7,09	1,33	3,36
	Tipo 2	82	M	6,52	1,32	2,45
	Tipo 2	66	M	6,48	1,3	3,34
	Tipo 2	61	M	5,96	0,99	3,49
	Tipo 2	73	F	5,7	1,19	3,44

A Tabela 7 indica o ano referente ao diagnóstico da DM e do hipotireoidismo nos 19 pacientes diabéticos com hipotireoidismo, verificando-se que para a maioria dos pacientes o diagnóstico inicial foi de DM, sendo o hipotireoidismo diagnosticado posteriormente. O diagnóstico de hipotireoidismo como diagnóstico inicial foi realizado em apenas dois casos. Por sua vez, o caso em que o diagnóstico de DM e hipotireoidismo foi efetuado no mesmo ano, não indica qual das doenças foi diagnosticada primeiro ou se foram diagnosticadas simultaneamente.

Tabela 7. Indicação do ano referente ao diagnóstico da DM e do Hipotireoidismo.

Diagnóstico Inicial	Diagnóstico DM (Ano)	Diagnóstico Hipotireoidismo (Ano)	Sexo
DM	2003	2008	Feminino
	2003	2013	Masculino
	2003	2013	Masculino
	2005	2012	Feminino
	2007	2013	Masculino
	2008	2012	Feminino
	2010	2011	Feminino
	2010	2013	Masculino
	2011	2013	Feminino
	2011	2013	Feminino
	2011	2013	Feminino
	2012	2013	Feminino
	2012	2013	Feminino
	2012	2013	Feminino
	2012	2013	Feminino
	2012	2013	Masculino
Hipotireoidismo	2011	2005	Feminino
	2012	2006	Masculino
DM e Hipotireoidismo	2013	2013	Feminino

3. Discussão dos resultados obtidos

A Diabetes mellitus (DM) é uma das desordens metabólicas endócrinas mais comuns a nível mundial, sendo a DM tipo 2 responsável por 90% a 95% dos casos de DM. A hiperglicémia, característica da DM, quando não controlada conduz frequentemente ao desenvolvimento de complicações micro e macrovasculares [3, 4]. Nos últimos anos, tem-se vindo a verificar um aumento no número de casos de hipotiroidismo na população diabética em comparação com a população geral. A DM parece influenciar a regulação da tiróide através da diminuição da conversão da T4L a T3L e influenciando a capacidade de resposta da TSH durante a noite, e por consequência, contribuir para o aparecimento de um quadro de hipotiroidismo [5, 7]. Neste sentido, tem-se colocado a hipótese de o hipotiroidismo ser uma possível complicação diabética. Contudo os mecanismos patogénicos subjacentes à associação entre estas condições clínicas permanecem pouco claros, sendo importante aprofundar a relação entre o hipotiroidismo e a DM e verificar se é benéfica a monitorização da função da tiróide nos pacientes diabéticos. Neste contexto, este trabalho teve como objetivo avaliar a incidência de hipotiroidismo numa população de indivíduos diabéticos em comparação com uma população de indivíduos não diabéticos acompanhados clinicamente no Centro Hospitalar do Baixo Vouga, E.P.E. - Aveiro (CHBV).

Neste estudo foram incluídos 175 pacientes diabéticos e 175 utentes controlo, selecionados entre Dezembro de 2012 e Abril de 2013 no CHBV, E.P.E. As idades variaram entre 16 e 96 anos e 13 e 93 anos, nos grupos CTL e DM, respetivamente. Em relação ao sexo, tanto no grupo CTL como no grupo DM a percentagem de indivíduos do sexo feminino foi maior, com 64% no grupo CTL e 53,7% no grupo DM. O grupo DM incluiu maioritariamente pacientes com DM tipo 2, com 95,4% dos casos. Dentro do grupo DM, os pacientes com DM tipo 1 são preferencialmente homens (62,5%) enquanto os pacientes com DM tipo 2 são 54,5% do sexo feminino e 45,5% do sexo masculino.

A DM conduz ao desenvolvimento de diversas complicações micro e macrovasculares, incluindo a hipertensão. Neste estudo a análise aos processos clínicos indicou uma elevada incidência de 76,6% de casos de hipertensão nos pacientes diabéticos. Um estudo anterior efetuado com o objetivo de avaliar a prevalência de algumas

complicações numa população de diabéticos com diagnóstico recente evidenciou uma prevalência de 58,50% de casos de hipertensão nessa população diabética [4], demonstrando uma associação entre estas duas doenças. O diagnóstico e monitorização da DM são realizados através da avaliação de diversos parâmetros. A seleção da população de pacientes diabéticos foi feita com base no parâmetro da HbA1c $\geq 6,5\%$, uma vez que este é um parâmetro mais estável, onde o indivíduo não necessita de estar em jejum e as amostras podem ser obtidas a qualquer hora do dia e mais sensível, havendo muito pouca variabilidade biológica [3]. Assim, no grupo DM a concentração da HbA1c variou entre 6,5 e 11,9%. A concentração da glucose em jejum variou entre 67,7 e 428,7 mg/dL e 85,7% do grupo DM apresentou hiperglicémia ([glucose em jejum] >110 mg/dL), dado que existem casos de hiperglicémia controlada devido a tratamento. A albumina sérica tem sido reconhecida como um indicador para avaliar a progressão e severidade das doenças, estando baixas concentrações de albumina sérica associadas à DM [143]. Nesta população 27,3% dos pacientes apresentaram concentrações de albumina sérica inferiores a $\leq 3,5$ g/dL. Um estudo com o objetivo de determinar a associação entre a DM tipo 2 e a albumina sérica, evidenciou baixas concentrações da albumina sérica em 16% a 23% da população de diabéticos [143]. A proteína C-reativa é um marcador da resposta inflamatória, estando o aumento dos seus níveis associada a doenças crónicas como a DM [144]. Neste sentido, a maioria dos pacientes do grupo DM apresentaram um aumento da proteína C-reativa (65,6%), indicando um estado inflamatório nos pacientes diabéticos. Outro parâmetro de avaliação da resposta inflamatória é a velocidade de sedimentação [145]. Tal como na proteína C-reativa, a grande maioria dos pacientes do grupo DM apresentou um aumento da velocidade de sedimentação (74,4% no sexo feminino e 80,8% no sexo masculino) corroborando a presença de inflamação. Alterações do perfil lipídico como dislipidemias ou hiperlipidemias estão muitas vezes associadas à DM [3]. Os pacientes diabéticos são caracterizados por concentrações elevadas de LDL e de triglicéridos e por baixas concentrações de HDL [146]. Nesta população o perfil lipídico foi avaliado, observando-se que 25,9% dos pacientes apresentaram hipercolesterolemia ([colesterol] > 200 mg/dL), 33,1% evidenciaram hipertrigliceridemia ([triglicéridos] > 150 mg/dL), 17,5% apresentaram um aumento da concentração de LDL ([LDL] >130 mg/dL) e 17,3% evidenciaram uma diminuição da concentração de HDL ([HDL] < 35 mg/dL). Este perfil está concordante com o descrito anteriormente num estudo efetuado

com uma população de diabéticos tipo 2, que revelou a presença de hiperlipidemia em 73,5% dos pacientes, dos quais 25,3% apresentavam hipercolesterolemia, 33,3% hipertrigliceridemia e 41,5% apresentavam tanto hipercolesterolemia e hipertrigliceridemia [4]. A creatina cinase é uma enzima presente no tecido muscular estriado, observando-se uma elevação dos níveis sanguíneos da creatina cinase na presença de uma lesão nos músculos esqueléticos ou no músculo cardíaco [147]. Na população em estudo apenas 6,7% dos pacientes diabéticos apresentaram uma diminuição da creatina cinase. Nos tecidos musculares, o desequilíbrio na regulação do metabolismo da glucose e do metabolismo dos lípidos presente na DM, favorece o aparecimento de complicações, tais como as alterações cardiovasculares [147]. A AST e a ALT são dois parâmetros utilizados para avaliação da função hepática, servindo de marcadores na lesão hepática [148]. Na população em estudo 19,9% dos pacientes diabéticos apresentam um aumento da concentração da AST e 16,6% apresentam um aumento da concentração da ALT. Assim, o aumento da ALT e da AST indicam uma lesão hepática nestes pacientes diabéticos.

No grupo DM verificou-se uma incidência de 10,9% de casos de hipotireoidismo, um pequeno aumento quando comparado com a incidência 8,6% de casos de hipotireoidismo no grupo CTL. No grupo DM apenas se verificaram casos de hipotireoidismo em pacientes com DM tipo 2. Esta incidência de 10,9% na DM tipo 2 está em concordância com a incidência de hipotireoidismo em pacientes diabéticos tipo 2 verificadas em estudos anteriores [67-70]. Alguns estudos realizados com indivíduos diabéticos tipo 2, evidenciaram que o hipotireoidismo está presente: em 12,06% da população diabética na Índia [68]; em 16% da população diabética na Arábia Saudita [69]; em 12,5% da população na Jordânia [70] e em 12,3% da população diabética na Grécia [67]. No grupo DM, observou-se uma maior incidência do hipotireoidismo no sexo feminino com 68,4% dos casos. Efetivamente, tem sido sugerido que o hipotireoidismo é mais prevalente nas mulheres diabéticas. Num estudo com um grupo de 1310 adultos diabéticos a prevalência de hipotireoidismo foi de 10,9% nas mulheres e 6,9% nos homens [66]. Na análise da incidência do hipotireoidismo numa população diabética na Grécia observou-se uma maior prevalência no sexo feminino com 78,4% dos casos [67].

A determinação da incidência do hipotireoidismo na população de diabéticos e na população de indivíduos não diabéticos foi realizada com base na informação dos processos clínicos e na avaliação da TSH (>5,5 mU/L). Assim, as concentrações da TSH

apresentaram médias muito próximas entre os indivíduos diabéticos (6,9 mU/L) e não diabéticos (6,4 mU/L). Como resultado deste estudo, novos casos de hipotireoidismo foram diagnosticados, isto é, dos 19 casos de hipotireoidismo (incidência de 10,9% de casos de hipotireoidismo) apenas 11 casos (57,9% dos casos) estavam diagnosticados, tendo sido os restantes diagnosticados posteriormente. Esta constatação demonstra que é importante a monitorização da função da tireóide em pacientes diabéticos, principalmente quando se verifica que a presença de hipotireoidismo conduz a um agravamento das complicações diabéticas [107, 108]. Nos pacientes diabéticos com hipotireoidismo, as concentrações de TSH encontraram-se elevadas mas as concentrações da T4L e T3L encontraram-se dentro dos valores de referência mas próximas do limite inferior. Isto deve-se ao facto de que por um lado, a hiperglicémia influencia a diminuição da conversão da T4L a T3L conduzindo ao aumento da TSH por feedback negativo mas por outro lado a hiperglicémia também contribui para uma diminuição da capacidade de resposta da TSH durante a noite. Assim, esta alternância na produção da TSH poderá permitir a desregulação da tireóide verificando-se assim a diminuição nas concentrações das hormonas da tireóide mas ainda dentro dos valores de referência. A continuação desta alternância poderá conduzir a uma maior desregulação da tireóide e a níveis mais baixos das hormonas da tireóide. Ainda nos 19 casos de hipotireoidismo analisados verificou-se que em 84,2% dos pacientes o diagnóstico de DM foi efetuado antes do de hipotireoidismo. O aparecimento de um quadro de hipotireoidismo posterior ao aparecimento da DM nesta população em estudo permite reforçar a hipótese de o hipotireoidismo poder ser visto como uma complicação da DM.

B. Extração e quantificação de fosfolípidos no soro humano

1. Análise dos fosfolípidos por HPLC-MS

Uma vez que neste trabalho se colocou a hipótese de o hipotireoidismo ser uma complicação da Diabetes mellitus e de estar demonstrado na literatura que tanto a DM como o hipotireoidismo estão relacionados com alterações no perfil lipídico, considerou-se relevante investigar o efeito destas doenças nas alterações do perfil fosfolípido do soro. Mais ainda que a presença de um estado inflamatório confirmado nos pacientes com DM em estudo, tinham um quadro clínico de inflamação, e como a inflamação está associada ao aumento de stress oxidativo e oxidação de lípidos, esta alteração pode levar a uma modificação do perfil de fosfolípidos. Isto porque os fosfolípidos estão presentes em maior percentagem nas LDL, que são geralmente oxidadas em condições oxidativas.

Com o intuito de avaliar estas alterações os fosfolípidos foram extraídos a partir do soro de indivíduos saudáveis (CTL), pacientes diabéticos com hipotireoidismo (DM-HT) e pacientes diabéticos sem hipotireoidismo (DM). A análise por HPLC-MS foi feita no modo positivo uma vez que no plasma as espécies mais abundantes são as fosfatidilcolinas (PCs) e as fosfatidiletanolaminas (PEs) [118]. Na Figura 12 mostramos o cromatograma obtido para um dos casos. Assim podemos ver que as fosfatidiletanolaminas (PEs) eluem primeiro, seguidas das fosfatidilcolinas (PCs) e por fim, as lisofosfatidilcolinas (LPCs).

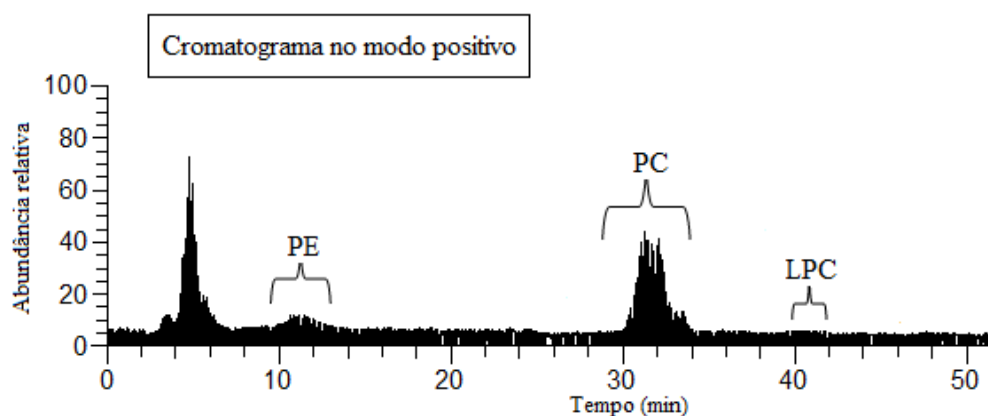
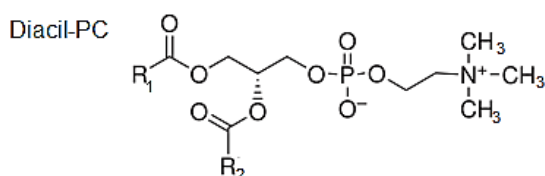


Figura 12. Cromatograma no modo positivo, mostrando o sítio de eluição das classes fosfolípicas.

Fomos analisar todas as espécies moleculares destas 3 classes principais e fazer a quantificação relativa de cada espécie em comparação com o fosfolípido padrão (DMPC 14:0/14:0) adicionado à amostra antes da extração. Os dados obtidos foram tratados estatisticamente.

1.1. Perfil da Fosfatidilcolina

As PCs ionizam preferencialmente no modo positivo, formando iões $[M + H]^+$. Na análise das PCs do soro apenas se identificou um grupo das espécies moleculares: as diacilfosfatidilcolinas. A Figura 13 apresenta a estrutura geral das diacilfosfatidilcolinas e a comparação dos espectros obtidos na zona de eluição da PC para os casos de CTL, DM e DM-HT.



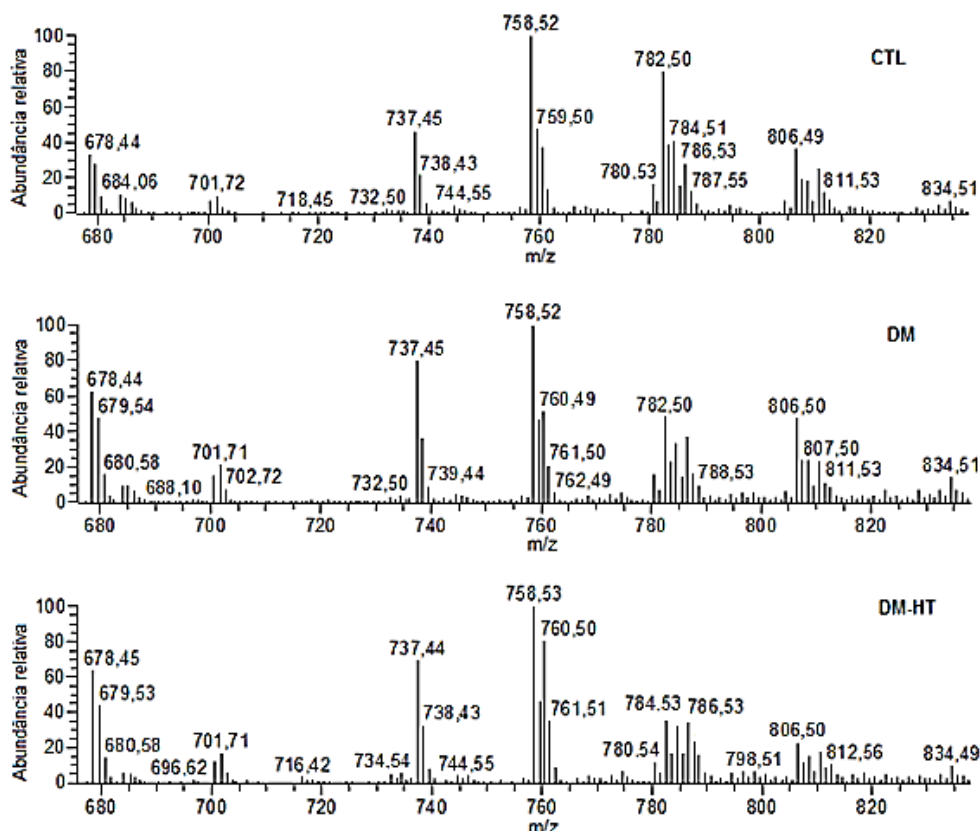


Figura 13. Estrutura geral da diacil-PC; espectros HPLC-MS das PCs no modo positivo com formação dos iões $[M + H]^+$, nos controlos (CTL), diabéticos sem hipotireoidismo (DM) e diabéticos com hipotireoidismo (DM-HT). O ião m/z 678,4 corresponde ao padrão interno (PC 14:0/14:0) e o ião m/z 737,4 ao solvente.

Ao analisar os espectro de MS podemos observar que existem alterações no perfil das PCs, ou seja uma menor abundância relativa da PC de m/z 782,5 (PC 16:0/20:4), no caso do grupo DM e essa diminuição é maior no caso do grupo DM-HT. Por outro lado, a PC de m/z 760,5 (PC16:0/18:1) aumenta no grupo DM e este aumento é maior no grupo DM-HT. Este facto parece sugerir uma diminuição da percentagem das PCs insaturadas. Este aumento da PC de m/z 760,5 pode também ser devido à diminuição da PC de m/z 758,5 (PC 16:0/18:2). Se assim for, a diminuição de PCs com ácido linoleico (18:2), e ácido araquidónico (20:4), pode significar a sua degradação por oxidação.

As espécies PCs mais abundantes no soro foram identificadas e estão apresentadas na Tabela 8. A análise MS/MS de cada espécie foi realizada para confirmar a composição dos ácidos gordos que os constituem.

Tabela 8. Identificação dos iões $[M + H]^+$ observados no espectro MS da PC. Os fosfolípidos estão designados como: diacil 32:1 PC, onde 32 indica a soma do número de átomos de carbono em ambas as posições *sn*-1 e *sn*-2 e 1 indica a soma do número de duplas ligações em ambas as posições.

Classe	$m/z [M + H]^+$	C:N	Espécies Diacil
PC	758,5	34:2	16:0/18:2
	760,5	34:1	16:0/18:1
	780,5	36:5	16:0/20:5
	782,5	36:4	16:0/20:4
	784,5	36:3	16:0/20:3
	786,5	36:2	16:0/20:2
	806,5	38:6	16:0/22:6
	810,5	38:4	18:0/20:4
	834,5	40:6	18:0/22:6

Ao analisar a quantidade de cada espécie de PC, observou-se que na DM há uma diminuição de quase todas as espécies, com exceção para os iões m/z 786,5 e 834,5, comparando com o grupo CTL. Contudo, apenas a diminuição em m/z 806,5 é estatisticamente significativa. Observou-se que na DM-HT há uma diminuição de quase todas as espécies, com exceção para o ião m/z 760,5, comparando com o grupo CTL e com o grupo DM. Contudo, apenas a diminuição em m/z 810,5 é estatisticamente significativa. Assim, na maioria das espécies verificou-se uma diminuição das espécies nos grupos DM e DM-HT em comparação com o grupo CTL, sendo essa diminuição mais acentuada nas espécies do grupo DM-HT (Figura 14).

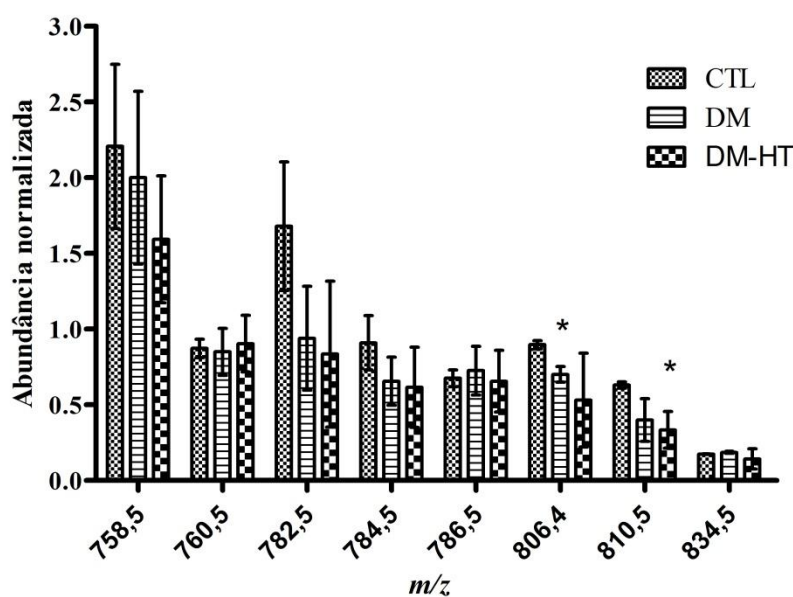
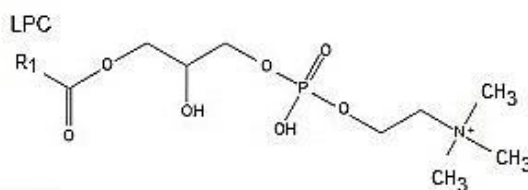


Figura 14. Quantidade normalizada pelo padrão interno PC (14:0/14:0) das diferentes espécies da classe fosfatidilcolina nos controles (CTL), diabéticos sem hipotireoidismo (DM) e diabéticos com hipotireoidismo (DM-HT). * $p < 0.05$ versus controle; $n=3$ experiências independentes.

1.2. Perfil da Lisofosfatidilcolina

As LPCs são o resultado da oxidação e fragmentação dos resíduos da fosfatidilcolina em *sn*-2, resultante da atividade da fosfolipase-A2. Foram analisadas no modo positivo, formando íons $[M + H]^+$ e a análise MS/MS mostra um íon fragmento em m/z 184. Nas LPCs identificaram-se dois grupos das espécies moleculares: as acil-lisofosfatidilcolinas e as alquenil-lisofosfatidilcolinas. A Figura 15 apresenta a estrutura geral das lisofosfatidilcolinas e a comparação dos espectros obtidos na zona de eluição da LPC para os casos de CTL, DM e DM-HT.



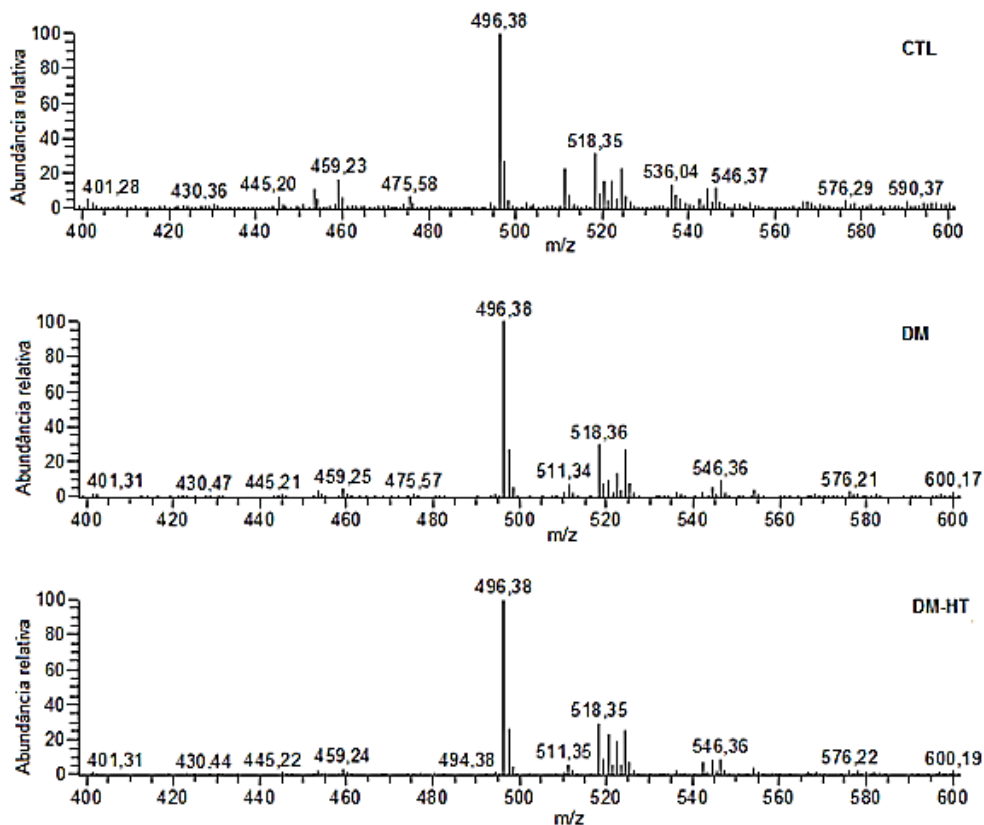


Figura 15. Estrutura geral da LPC; espectros HPLC-MS das LPCs no modo positivo com formação dos iões $[M + H]^+$, nos controlos (CTL), diabéticos sem hipotireoidismo (DM) e diabéticos com hipotireoidismo (DM-HT).

As espécies LPCs mais abundantes no soro foram identificadas e estão apresentadas na Tabela 9. A análise MS/MS de cada espécie foi realizada para confirmar a composição dos ácidos gordos que os constituem.

Tabela 9. Identificação dos iões $[M + H]^+$ observados no espectro MS da LPC; p – sn-1 éter vinil (alquenil-). As lisofosfatidilcolinas estão designados como: acil 18:1 LPC, onde 18 indica o número de átomos de carbono na posição sn-1 e 1 indica o número de duplas ligações nessa posição.

Classe	Espécies Acil		Espécies Alquenil	
	m/z $[M + H]^+$	C:N	m/z $[M + H]^+$	C:N
LPC	496,4	16:0	542,3	20:2p
	518,4	18:3	544,4	20:1p
	520,4	18:2	546,4	20:0p
	522,4	18:1		
	524,4	18:0		

Ao analisar a quantidade de cada espécie de LPC, observou-se que na DM há um aumento de quase todas as espécies, com exceção para os iões m/z 542,4 e 544,4, comparando com o grupo CTL. Contudo, apenas o aumento em m/z 524,4 é estatisticamente significativa. Observou-se que na DM-HT há um aumento de quase todas as espécies, com exceção para os iões m/z 542,4 e 544,4, comparando com o grupo CTL e uma diminuição de quase todas as espécies, com exceção para os iões m/z 542,4 e 544,4, comparando com o grupo DM. Assim, na maioria das espécies verificou-se um aumento das espécies nos grupos DM e DM-HT em comparação com o grupo CTL, sendo esse aumento mais acentuado nas espécies do grupo DM (Figura 16).

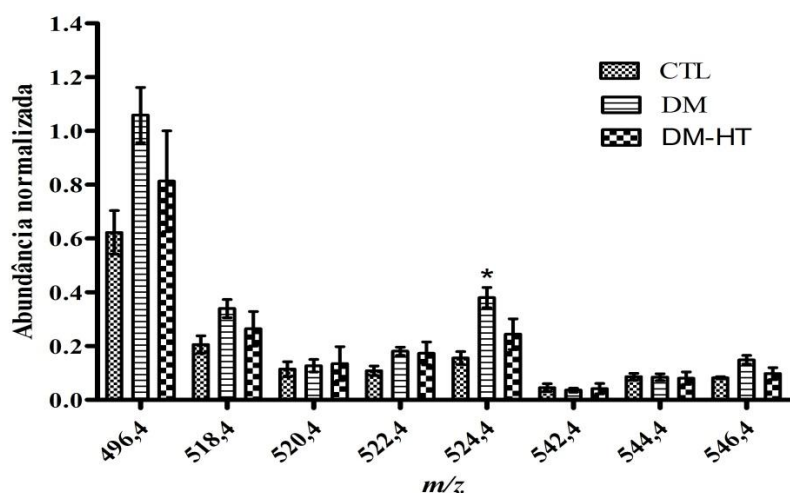


Figura 16. Quantidade normalizada pelo padrão interno PC (14:0/14:0) das diferentes espécies da classe lisofosfatidilcolina nos controles (CTL), diabéticos sem hipotireoidismo (DM) e diabéticos com hipotireoidismo (DM-HT). * $p < 0.05$ versus controle; $n=3$ experiências independentes.

De facto, mais especificamente o aumento do ião de m/z 496,4 está em concordância com a diminuição das PC (16:0/18:2) e PC (16:0/20:4), que por serem oxidadas podem sofrer a ação da fosfolipase-A2 (PLA2) e assim originar as LisoPCs (16:0). O mesmo raciocínio se pode fazer para as outras LisoPCs.

1.3. Perfil das Fosfatidiletanolaminas

As PEs foram analisadas no modo positivo, formando iões $[M + H]^+$ e a análise MS/MS mostra um ião fragmento em m/z 141. Nas PEs identificaram-se dois grupos das espécies moleculares: as diacil-fosfatidiletanolaminas e as alquenil-fosfatidiletanolaminas. A Figura 17 apresenta a estrutura geral das fosfatidiletanolaminas e a comparação dos espectros de CTL, DM e DM-HT relativamente à classe das PEs.

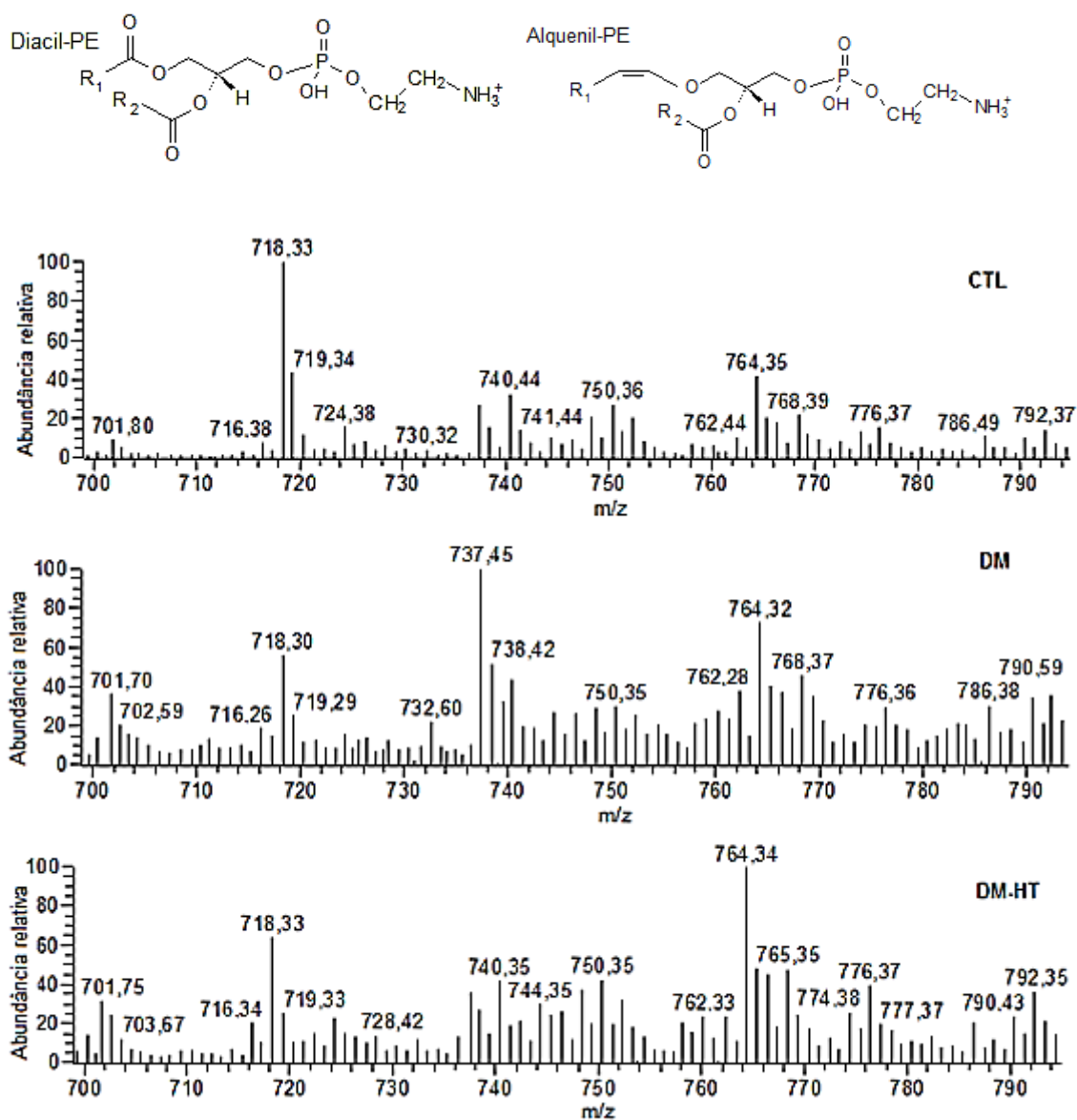


Figura 17. Estrutura geral das PEs; espectros HPLC-MS das PEs no modo positivo com formação dos iões $[M + H]^+$, nos controlos (CTL), diabéticos sem hipotiroidismo (DM) e diabéticos com hipotiroidismo (DM-HT).

As espécies PEs mais abundantes no soro foram identificadas e estão apresentadas na Tabela 10. A análise MS/MS de cada espécie foi realizada para confirmar a composição dos ácidos gordos que os constituem.

Tabela 10. Identificação dos iões $[M + H]^+$ observados no espectro MS da PE. Os fosfolípidos estão designados como: diacil 34:2 PE, onde 34 indica a soma do número de átomos de carbono em ambas as posições *sn*-1 e *sn*-2 e 2 indica a soma do número de duplas ligações em ambas as posições.

Classe	m/z [MH] ⁺	C:N	Espécies Diacil	m/z [MH] ⁺	C:N	Espécies Alquenil
PE	716,4	34:2	16:0/18:2	724,4	36:4p	16:0p/20:4
	718,4	34:1	16:0/18:1	750,4	38:5p	18:1p/20:4
	740,4	36:4	16:0/20:4	752,4	38:4p	18:0p/20:4
	744,4	36:2	16:0/20:2	776,4	40:6p	18:0p/22:6
	748,4	36:0	16:0/20:0	786,4	40:1p	18:1p/22:0
	764,4	38:6	16:0/22:6			
	768,4	38:4	18:0/20:4			
	790,4	40:7	18:1/22:6			
	792,4	40:6	18:0/22:6			

Ao analisar a quantidade de cada espécie de PE, observou-se que na DM há uma diminuição de todas as espécies, comparando com o grupo CTL. Sendo as diminuições em m/z 718,4; 740,4 e 776,4 estatisticamente significativas. Observou-se que na DM-HT há uma diminuição de quase todas as espécies, com exceção para o ião m/z 744,4, comparando com o grupo CTL. Sendo as diminuições em m/z 718,4; 724,4; 740,4; 748,4; 750,4; 752,4 e 776,4 estatisticamente significativas. Também na DM-HT observou-se uma diminuição de quase todas as espécies, com exceção para os iões m/z 716,4; 718,4; 744,4 e 764,4, comparando com o grupo DM.

Assim, na maioria das espécies verificou-se uma diminuição das espécies nos grupos DM e DM-HT em comparação com o grupo CTL.

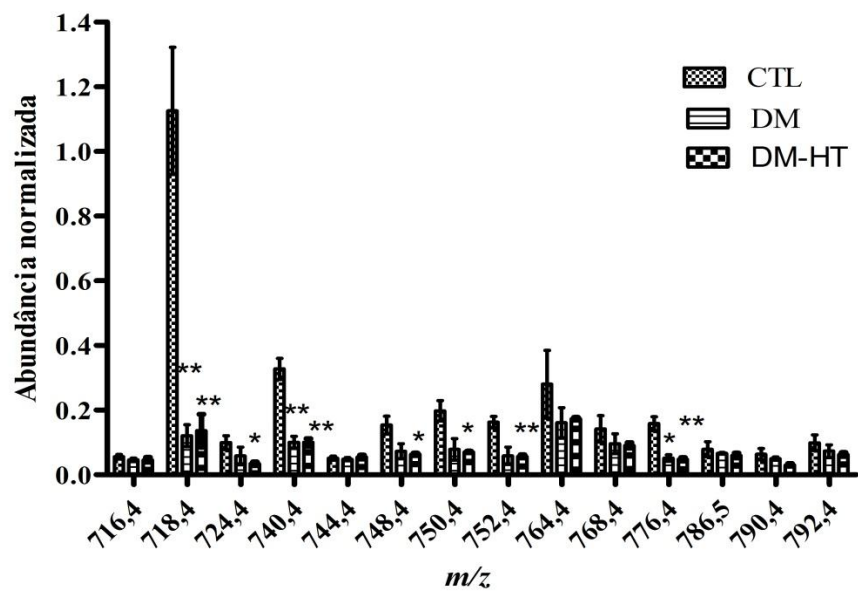


Figura 18. Quantidade normalizada pelo padrão interno PC (14:0/14:0) das diferentes espécies da classe fosfatidiletanolamina nos controles (CTL), diabéticos sem hipotireoidismo (DM) e diabéticos com hipotireoidismo (DM-HT). * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ versus controle; n=3 experiências independentes.

2. Discussão dos resultados obtidos

Nos últimos anos tem-se vindo a demonstrar que tanto a DM como o hipotiroidismo estão relacionados com alterações no perfil lipídico [128-135]. A maioria dos estudos que caracterizaram as alterações lipídicas focaram-se nos fosfolípidos, uma vez que são uma das classes de lípidos mais abundantes no plasma e na maioria das células animais [117]. No hipotiroidismo estes estudos foram efetuados em tecido e não em fluidos. Na DM, conhecem-se alguns estudos de análises de fosfolípidos do plasma ou soro humano. Contudo, o estudo do perfil de fosfolípidos em indivíduos com DM e com hipotiroidismo nunca foi realizado. Assim, achou-se relevante comparar o perfil de fosfolípidos de pacientes diabéticos e pacientes diabéticos com hipotiroidismo. Para a elaboração do perfil de fosfolípidos (PL) foram considerados três grupos: controlo, com indivíduos saudáveis, diabéticos e diabéticos com hipotiroidismo. De entre os fosfolípidos do plasma, maior foco foi dado às PCs e PEs dado que constituem as principais classes de PLs no plasma humano [118]. As espécies moleculares das classes PC, LPC e PE foram analisadas e determinou-se o conteúdo relativo de cada espécie em comparação com o fosfolípido padrão DMPC (14:0/14:0).

Na maioria das espécies moleculares da classe PC verificou-se uma diminuição da sua abundância, sendo estatisticamente significativa a diminuição da PC (16:0/22:6) do grupo DM e da PC (18:0/20:4) do DM-HT em comparação com o grupo CTL. A diminuição da abundância é mais acentuada nas espécies moleculares do grupo DM-HT. Esta diminuição do teor das espécies moleculares observada na classe PC é concordante com a diminuição na classe PC verificada tanto no estudo efetuado em fígado de ratos diabéticos como no estudo efetuado em coração de ratos com hipotiroidismo [129, 132]. Por outro lado, na maioria das espécies moleculares da classe LPC verificou-se um aumento da sua abundância nos grupos DM e DM-HT em comparação com o grupo CTL, sendo estatisticamente significativo o aumento da LPC (18:0) do grupo DM. Também o estudo efetuado para identificação da variação do perfil entre a DM tipo 2 e os controlos verificou uma diferença na LPC (18:0), contudo não indica se essa diferença é um aumento ou diminuição do conteúdo da LPC [134]. Já na classe PE verificou-se uma diminuição da abundância de todas as espécies moleculares do grupo DM, sendo as PEs (16:0/18:1), (16:0/20:4) e (18:0p/22:6) estatisticamente significativas e uma diminuição da abundância de quase todas as espécies moleculares do grupo DM-HT, sendo quase todas estas

diminuições estatisticamente significativas. Esta diminuição do teor das espécies moleculares da classe PE foi descrita tanto no estudo efetuado no miocárdio de ratos diabéticos como no estudo efetuado em fígado de ratos com hipotireoidismo [130, 133]. Também na classe PE se verificou uma maior diminuição nas espécies do grupo DM-HT, apesar de não tão acentuada como na classe PC.

Esta modificação do perfil de fosfolípidos, isto é, a diminuição da abundância da PC e da PE e o aumento da abundância da LPC, parece estar relacionada com o estado inflamatório presente nos pacientes com DM em estudo. Uma vez que a inflamação está associada ao aumento do stress oxidativo e ao aumento da oxidação de lípidos, estes poderão ter conduzido à oxidação da PCs e das PEs. Uma vez oxidadas poderão ter sofrido ação por parte da fosfolipase-A2 o que levou à observada diminuição de algumas espécies moleculares destas classes. Por outro lado, sabe-se que a ação da fosfolipase-A2 em fosfolípidos oxidados origina lisofosfolípidos, assim a ação da fosfolipase-A2 nas PCs oxidadas poderá ter originado as LPCs, verificando-se uma diminuição de algumas espécies moleculares da classe PC e um aumento de algumas espécies moleculares da classe LPC.

As alterações do perfil de fosfolípidos foram mais acentuadas no grupo dos indivíduos diabéticos com hipotireoidismo (DM-HT) sugerindo um aumento do stress oxidativo e do estado de inflamação. Isto é, sabendo que as hormonas da tiróide influenciam o metabolismo da glucose, na presença de um quadro de hipotireoidismo, estas hormonas poderão contribuir para o exacerbar da DM e assim conduzir a estes aumentos de stress oxidativo e inflamação.

Em síntese, os resultados evidenciaram diferenças entre os perfis de fosfolípidos dos indivíduos saudáveis e dos pacientes diabéticos sem e com hipotireoidismo, tendo sido mais acentuadas nos diabéticos com hipotireoidismo.

V. Conclusão

No sentido de avaliar se o hipotiroidismo pode ser uma complicação diabética, avaliou-se a incidência de hipotiroidismo numa população diabética em comparação com uma população não diabética diagnosticados no Centro Hospitalar do Baixo Vouga, E.P.E. - Aveiro (CHBV) e avaliou-se as alterações no perfil de três classes de fosfolípidos (PC, LPC e PE) do soro de pacientes diabéticos e de pacientes diabéticos com hipotiroidismo, com os principais resultados:

- i) No grupo DM verificou-se uma incidência de 10,9% de casos de hipotiroidismo, um pequeno aumento quando comparado com a incidência de 8,6% de casos de hipotiroidismo no grupo CTL;
- ii) No grupo DM apenas se verificaram casos de hipotiroidismo em pacientes com DM tipo 2, sendo a maioria do sexo feminino e onde a idade variou entre 33 e 89 anos;
- iii) Após a seleção da população em estudo novos casos de hipotiroidismo foram diagnosticados. Assim, apenas 57,9% dos casos estavam diagnosticados, tendo sido os restantes diagnosticados posteriormente;
- iv) Em 84,2% dos pacientes o diagnóstico de hipotiroidismo foi posterior ao diagnóstico de DM;
- v) Nos grupos DM e DM-HT em comparação com o grupo CTL verificou-se uma diminuição na maioria e em todas as espécies moleculares nas classes PC e PE, respetivamente, enquanto na classe LPC verificou-se um aumento da maioria das espécies moleculares;
- vi) As modificações do perfil de fosfolípidos foram mais acentuadas no grupo dos indivíduos diabéticos com hipotiroidismo.

Assim, o aumento no número de casos de hipotireoidismo na população diabética em comparação com a população geral observada nos últimos anos juntamente com o facto de a DM parecer influenciar a regulação da tiróide através da diminuição da conversão da T4L a T3L e influenciando a capacidade de resposta da TSH durante a noite permitiu colocar a hipótese de a DM contribuir para um quadro de hipotireoidismo e portanto o hipotireoidismo ser uma possível complicação da DM. A concordância entre a incidência do hipotireoidismo na população de indivíduos diabéticos observada neste estudo (10,9%) e a incidência verificada em estudos anteriores e o aparecimento de um quadro de hipotireoidismo posterior ao aparecimento da DM nesta população permitem reforçar a hipótese de o hipotireoidismo poder ser visto como uma complicação da DM. Também a maior acentuação das modificações observadas no perfil de fosfolípidos dos pacientes diabéticos com hipotireoidismo vem apoiar esta hipótese, uma vez que, sugere um aumento do stress oxidativo e do estado de inflamação como um processo subjacente à alteração da função da tiróide.

De uma maneira geral, a incidência do hipotireoidismo na população de indivíduos diabéticos em estudo apoiada pelo aumento do estado inflamatório dos indivíduos diabéticos com hipotireoidismo reforça a hipótese do hipotireoidismo ser uma possível complicação diabética e assim sendo, reforça a ideia da importância da monitorização da função da tiróide em pacientes diabéticos.

Contudo, seria importante tanto realizar estudos envolvendo uma maior população diabética como realizar um estudo abrangendo uma população maior de indivíduos com DM com e sem hipotireoidismo para identificar inequivocamente as alterações de PLs decorrentes da doença e qual o potencial impacto fisiológico.

VI. Bibliografia

1. Federation, I.D. *Diabetes atlas*. [cited 2012 21/09]; Fifth:[Available from: <http://www.eatlas.idf.org/>].
2. Organisation, W.H. *Diabetes*. 2012 [cited 2012 22/09]; Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/en/index.html>.
3. Association, A.D., *Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus*. Diabetes Care, 2012. **35**(1).
4. Heydari, I., V. Radi, and S. Razmjou, *Chronic complications of diabetes mellitus in newly diagnosed patients*. International Journal of Diabetes Mellitus, 2010. **2**(1): p. 61-63.
5. Udiong, C.E.J., A.E. Udoh, and M.E. Etukudoh, *Evaluation of thyroid function in diabetes mellitus in Calabar, Nigeria*. Indian Journal of Clinical Biochemistry, 2007. **22**(2): p. 74-78.
6. Wu, P., *Thyroid disease and diabetes*. Clinical Diabetes, 2000. **18**: p. 38-39.
7. Gursoy, N.T. and E. Tuncel, *The relationship between the glycemic control and the hypothalamus-pituitary-thyroid axis in diabetic patients*. Turkish Journal of Endocrinology and Metabolism, 1999. **4**: p. 163-168.
8. Kuzuya, T., S. Nakagawa, and J. Satoh, *Report of the Committee on the classification and diagnostic criteria of diabetes mellitus*. Diabetes Research and Clinical Practice, 2002. **55**: p. 65-85.
9. Graves, P.M. and G.S. Eisenbarth, *Pathogenesis, prediction and trials for the prevention of insulin-dependent (type 1) diabetes mellitus*. Advanced Drug Delivery Reviews, 1999. **35**(2-3): p. 143-156.
10. Association, A.D., *Gestational Diabetes Mellitus*. Diabetes Care, 2002. **25**(1).
11. Guyton, A.C. and J.E. Hall, *Textbook of Medical Physiology* eleventh ed2006, Pennsylvania: Elsevier-Saunders.
12. Boavida, J.M., A. Duarte, L.F. Vicente, M.A. Ruas, and P.C. Melo, *Diagnóstico e Classificação da Diabetes Mellitus*. Norma da Direcção-Geral da Saúde, 2011.
13. Association, A.D., *Standards of Medical Care in Diabetes-2012*. Diabetes Care, 2012. **35**(1).

14. Molitch, M.E., R.A. DeFronzo, M.J. Franz, W.F. Keane, C.E. Mogensen, H.-H. Parving, M.W. Steffes, and A. American Diabetes, *Nephropathy in diabetes*. *Diabetes Care*, 2004. **27 Suppl 1**: p. S79-83.
15. Krentz, A.J., G. Clough, and C.D. Byrne, *Interactions between microvascular and macrovascular disease in diabetes: pathophysiology and therapeutic implications*. *Diabetes, Obesity and Metabolism*, 2007. **9**(6): p. 781-791.
16. Gazis, A., N. Pound, R. Macfarlane, K. Treece, F. Game, and W. Jeffcoate, *Mortality in patients with diabetic neuropathic osteoarthropathy (Charcot foot)*. *Diabetic Medicine*, 2004. **21**(11): p. 1243-1246.
17. Bayraktutan, U., *Free radicals, diabetes and endothelial dysfunction*. *Diabetes, Obesity and Metabolism*, 2002. **4**(4): p. 224-238.
18. Oates, P.J., *Polyol pathway and diabetic peripheral neuropathy*. *Neurobiology of Diabetic Neuropathy*, 2002. **50**: p. 325-392.
19. Schalkwijk, C.G. and C.D.A. Stehouwer, *Vascular complications in diabetes mellitus: The role of endothelial dysfunction*. *Clinical Science*, 2005. **109**(2): p. 143-159.
20. Madonna, R. and R. De Caterina, *Cellular and molecular mechanisms of vascular injury in diabetes — Part I: Pathways of vascular disease in diabetes*. *Vascular Pharmacology*, 2011. **54**(3–6): p. 68-74.
21. Das Evcimen, N. and G.L. King, *The role of protein kinase C activation and the vascular complications of diabetes*. *Pharmacological Research*, 2007. **55**(6): p. 498-510.
22. Ishii, H., M.R. Jirousek, D. Koya, C. Takagi, P. Xia, A. Clermont, S.E. Bursell, T.S. Kern, L.M. Ballas, W.F. Heath, L.E. Stramm, E.P. Feener, and G.L. King, *Amelioration of vascular dysfunctions in diabetic rats by an oral PKC beta inhibitor*. *Science*, 1996. **272**(5262): p. 728-731.
23. Basta, G., A.M. Schmidt, and R. De Caterina, *Advanced glycation end products and vascular inflammation: implications for accelerated atherosclerosis in diabetes*. *Cardiovascular Research*, 2004. **63**(4): p. 582-592.
24. Doi, T., H. Vlassara, M. Kirstein, Y. Yamada, G.E. Striker, and L.J. Striker, *Receptor-specific increase in extracellular matrix production in mouse mesangial cells by advanced glycosylation end-products is mediated via platelet-derived*

- growth-factor*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1992. **89**(7): p. 2873-2877.
25. Sakata, N., J. Meng, and S. Takebayashi, *Effects of advanced glycation end products on the proliferation and fibronectin production of smooth muscle cells*. Journal of atherosclerosis and thrombosis, 2000. **7**(3): p. 169-76.
 26. Yan, S.D., A.M. Schmidt, G.M. Anderson, J.H. Zhang, J. Brett, Y.S. Zou, D. Pinsky, and D. Stern, *Enhanced cellular oxidant stress by the interaction of advanced glycation end-products with their receptors binding-proteins*. Journal of Biological Chemistry, 1994. **269**(13): p. 9889-9897.
 27. Saltiel, A.R. and C.R. Kahn, *Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism*. Nature, 2001. **414**(6865): p. 799-806.
 28. Wilcox, G., *Insulin and Insulin Resistance*. Clinical Biochemistry Review, 2005. **26**(2): p. 19-39.
 29. Chang, L., S.H. Chiang, and A.R. Saltiel, *Insulin signaling and the regulation of glucose transport*. Molecular Medicine, 2004. **10**(7-12): p. 65-71.
 30. Saltiel, A.R. and J.E. Pessin, *Insulin signaling pathways in time and space*. Trends in Cell Biology, 2002. **12**(2): p. 65-71.
 31. Weinstein, S.P., E. O'Boyle, and R.S. Haber, *Thyroid hormone increases basal and insulin-stimulated glucose transport in skeletal muscle: The role of GLUT4 glucose transporter expression*. Diabetes, 1994. **43**(10): p. 1185-1189.
 32. Chidakel, A., D. Mentuccia, and F.S. Celi, *Peripheral metabolism of thyroid hormone and glucose homeostasis*. Thyroid, 2005. **15**(8): p. 899-903.
 33. Marshall, W.J. and S.K. Bangert, *Clinical Chemistry*. 6th ed2008, Philadelphia: Elsevier. 416.
 34. Hoppner, W. and H.J. Seitz, *Effect of thyroid hormones on glucokinase gene transcription in rat liver*. Journal of Biological Chemistry, 1989. **264**(34): p. 20643-20647.
 35. Feng, X., Y. Jiang, P. Meltzer, and P.M. Yen, *Thyroid hormone regulation of hepatic genes in vivo detected by complementary DNA microarray*. Molecular Endocrinology, 2000. **14**(7): p. 947-955.
 36. Brenta, G., *Why Can Insulin Resistance Be a Natural Consequence of Thyroid Dysfunction?* Journal of Thyroid Research, 2011. **2011**.

37. Park, E.A., D.C. Jerden, and S.W. Bahouth, *Regulation of phosphoenolpyruvate carboxykinase gene transcription by thyroid hormone involves two distinct binding sites in the promoter*. *Biochemical Journal*, 1995. **309**(3): p. 913-919.
38. Shimizu, Y. and T. Shimazu, *Thyroid hormone augments GLUT4 expression and insulin-sensitive glucose transport system in differentiating rat brown adipocytes in culture*. *Journal of Veterinary Medical Science*, 2002. **64**(8): p. 677-681.
39. Swierczynski, J., D.A. Mitchell, D.S. Reinhold, L.M. Salati, S.R. Stapleton, and S.A. Klautky, *Triiodothyronine-induced accumulations of malic enzyme, fatty acid synthase, acetyl-coenzyme A carboxylase, and their mRNAs are blocked by protein kinase inhibitors. Transcription is the affected step*. *Journal of Biological Chemistry*, 1991. **266**(26): p. 17459-17466.
40. Becker, W., R. Kluge, T. Kantner, K. Linnartz, M. Korn, and G. Tschank, *Differential hepatic gene expression in a polygenic mouse model with insulin resistance and hyperglycemia: Evidence for a combined transcriptional dysregulation of gluconeogenesis and fatty acid synthesis*. *Journal of Molecular Endocrinology*, 2004. **32**(1): p. 195-208.
41. Gauthier, K., C. Billon, M. Bissler, M. Beylot, J.M. Lobaccaro, and J.M. Vanacker, *Thyroid hormone receptor beta (TRBeta) and liver X receptor (LXR) regulate carbohydrate-response element-binding protein (ChREBP) expression in a tissue-selective manner*. *Journal of Biological Chemistry*, 2010. **285**(36): p. 28156-28163.
42. Hashimoto, K., E. Ishida, S. Matsumoto, S. Okada, M. Yamada, and T. Satoh, *Carbohydrate response element binding protein gene expression is positively regulated by thyroid hormone*. *Endocrinology*, 2009. **150**(7): p. 3417-3424.
43. Bianco, A.C., A.L. Maia, W.S. Da Silva, and M.A. Christoffolete, *Adaptive activation of thyroid hormone and energy expenditure*. *Bioscience Reports*, 2005. **25**(3-4): p. 191-208.
44. Kim, S.R., E.S. Tull, E.O. Talbott, M.T. Vogt, and L.H. Kuller, *A hypothesis of synergism: the interrelationship of T3 and insulin to disturbances in metabolic homeostasis*. *Medical Hypotheses*, 2002. **59**(6): p. 660-666.
45. Moeller, L.C., A.M. Dumitrescu, R.L. Walker, P.S. Meltzer, and S. Refetoff, *Thyroid hormone responsive genes in cultured human fibroblasts*. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 2005. **90**(2): p. 936-943.

46. Ledda-Columbano, G.M., A. Perra, M. Pibiri, F. Molotzu, and A. Columbano, *Induction of pancreatic acinar cell proliferation by thyroid hormone*. Journal of Endocrinology, 2005. **185**(3): p. 393-399.
47. Ortega, E., J. Koska, N. Pannacciulli, J.C. Bunt, and J. Krakoff, *Free triiodothyronine plasma concentrations are positively associated with insulin secretion in euthyroid individuals*. European Journal of Endocrinology, 2008. **158**(2): p. 217-221.
48. Chubb, S.A.P., W.A. Davis, and T.M.E. Davis, *Interactions among thyroid function, insulin sensitivity, and serum lipid concentrations: The Fremantle diabetes study*. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, 2005. **90**(9): p. 5317-5320.
49. Bulum, T., B. Kolarić, and L. Duvnjak, *Insulin sensitivity modifies the relationship between thyroid function and lipid profile in euthyroid type 1 diabetic patients*. Endocrine, 2012. **42**(1): p. 139-145.
50. Maratou, E., D.J. Hadjidakis, A. Kollias, K. Tsegka, M. Peppas, and M. Alevizaki, *Studies of insulin resistance in patients with clinical and subclinical hypothyroidism*. European Journal of Endocrinology, 2009. **160**(5): p. 785-790.
51. Rezzonico, J., M. Rezzonico, E. Pusiol, F. Pitoia, and H. Niepomniszcze, *Introducing the thyroid gland as another victim of the insulin resistance syndrome*. Thyroid, 2008. **18**(4): p. 461-464.
52. Coiro, V., R. Volpi, C. Marchesi, L. Capretti, G. Speroni, and G. Caffarri, *Influence of residual C-peptide secretion on nocturnal serum TSH peak in well-controlled diabetic patients*. Clinical Endocrinology, 1997. **47**(3): p. 305-310.
53. Schlienger, J.L., A. Anceau, and G. Chabrier, *Effect of diabetic control on the level of circulating thyroid hormones*. Diabetologia, 1982. **22**(6): p. 486-488.
54. Sathish, R. and V. Mohan, *Diabetes and Thyroid diseases - A review*. International Journal of Diabetes in Developing Countries, 2003. **23**.
55. Satyanarayana, K., Y. Dhanunjaya, P.B. Dolia, B.J. Pradeep Kumar, and R. Aruna Kumari, *Influence of glycemic status on circulating thyroid hormones among diabetic patients*. Biomedicine, 2011. **31**(4): p. 474-478.
56. Bjorn-Hansen Gotzsche, L.S., O. Gotzsche, A. Flyvbjerg, and N. Boye, *Early changes in thyroid hormone metabolism in the heart, liver, and brown adipose*

- tissue during the induction of low T3 syndrome in streptozotocin-diabetic rats. *Acta Endocrinologica*, 1990. **123**(1): p. 67-71.
57. Franklyn, J.A., *Hypothyroidism*. *Medicine*, 2009. **37**(8): p. 426-429.
58. Roberts, C.G.P. and P.W. Ladenson, *Hypothyroidism*. *The Lancet*, 2004. **363**(9411): p. 793-803.
59. LaFranchi, S.H., *Approach to the Diagnosis and Treatment of Neonatal Hypothyroidism*. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 2011. **96**(10): p. 2959-2967.
60. Jereczek-Fossa, B.A., D. Alterio, J. Jassem, B. Gibelli, N. Tradati, and R. Orecchia, *Radiotherapy-induced thyroid disorders*. *Cancer Treatment Reviews*, 2004. **30**(4): p. 369-384.
61. Burek, C.L. and N.R. Rose, *Autoimmune thyroiditis and ROS*. *Autoimmunity Reviews*, 2008. **7**(7): p. 530-537.
62. Rose, S.R., *Cranial irradiation and central hypothyroidism*. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 2001. **12**(3): p. 97-104.
63. Papi, G., E.D. Uberti, C. Betterle, C. Carani, E.N. Pearce, L.E. Braverman, and E. Roti, *Subclinical hypothyroidism*. *Current Opinion in Endocrinology, Diabetes and Obesity*, 2007. **14**(3): p. 197-208.
64. Khandelwal, D. and N. Tandon, *Overt and subclinical hypothyroidism: who to treat and how*. *Drugs*, 2012. **72**(1): p. 17-33.
65. Hollowell, J.G., N.W. Staehling, D.W. Flanders, W.H. Hannon, E.W. Gunter, and C.A. Spencer, *Serum TSH, T4, and Thyroid Antibodies in the United States Population (1988 to 1994): National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES III)*. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 2002. **87**(2): p. 489-499.
66. Perros, P., R.J. McCrimmon, G. Shaw, and B.M. Frier, *Frequency of thyroid dysfunction in diabetic patients: Value of annual screening*. *Diabetic Medicine*, 1995. **12**(7): p. 622-627.
67. Papazafiropoulou, A., A. Sotiropoulos, A. Kokolaki, M. Kardara, P. Stamataki, and S. Pappas, *Prevalence of thyroid dysfunction among greek type 2 diabetic patients attending an outpatient clinic*. *Journal of clinical medicine research*, 2010. **2**(2): p. 75-8.

68. Swamy, R.M., N. Kumar, K. Srinivasa, G.N. Manjunath, D.S.P. Byrav, and G. Venkatesh, *Evaluation of hypothyroidism as a complication in Type II diabetes mellitus*. Biomedical Research, 2012. **23**(2): p. 170-172.
69. Akbar, D.H., M.M. Ahmed, and J. Al-Mughales, *Thyroid dysfunction and thyroid autoimmunity in Saudi type 2 diabetics*. Acta Diabetologica, 2006. **43**(1): p. 14-18.
70. Radaideh, A.R.M., M.K. Nusier, F.L. Amari, A.E. Bateiha, M.S. El-Khateeb, and A.S. Naser, *Thyroid dysfunction in patients with type 2 diabetes mellitus in Jordan*. Saudi Medical Journal, 2004. **25**(8): p. 1046-1050.
71. Duntas, L.H., J. Orgiazzi, and G. Brabant, *The interface between thyroid and diabetes mellitus*. Clinical Endocrinology, 2011. **75**(1): p. 1-9.
72. Wu, P., *Thyroid disorders and diabetes. It is common for a person to be affected by both thyroid disease and diabetes*. Diabetes self-management, 2007. **24**(5): p. 80-82, 85-87.
73. Umpierrez, G.E., K.A. Latif, M.B. Murphy, H.C. Lambeth, F. Stentz, and A. Bush, *Thyroid dysfunction in patients with type 1 diabetes: A longitudinal study*. Diabetes Care, 2003. **26**(4): p. 1181-1185.
74. Menon, P.S.N., B. Vaidyanathan, and M. Kaur, *Autoimmune thyroid disease in Indian children with type 1 diabetes mellitus*. Journal of Pediatric Endocrinology and Metabolism, 2001. **14**(3): p. 279-286.
75. Araujo, J., L.A.C. Brandão, R.L. Guimarães, S. Santos, E.A. Falcão, and M. Milanese, *Prevalence of autoimmune thyroid disease and thyroid dysfunction in young Brazilian patients with type 1 diabetes*. Pediatric Diabetes, 2008. **9**(4pt1): p. 272-276.
76. Kordonouri, O., A. Klinghammer, E.B. Lang, A. Grüters-Kieslich, M. Grabert, and R.W. Holl, *Thyroid autoimmunity in children and adolescents with type 1 diabetes: A multicenter survey*. Diabetes Care, 2002. **25**(8): p. 1346-1350.
77. Canaris, G.J., N.R. Manowitz, G. Mayor, and E.C. Ridgway, *The colorado thyroid disease prevalence study*. Archives of Internal Medicine, 2000. **160**(4): p. 526-534.
78. Radetti, G., C. Paganini, L. Gentill, S. Bernasconi, C. Betterle, and M. Borkenstein, *Frequency of Hashimoto's thyroiditis in children with type 1 diabetes mellitus*. Acta Diabetologica, 1995. **32**(2): p. 121-124.

79. Stadinski, B., J. Kappler, and G.S. Eisenbarth, *Molecular Targeting of Islet Autoantigens*. Immunity, 2010. **32**(4): p. 446-456.
80. Groen, H., F. Klatter, J. Pater, P. Nieuwenhuis, and J. Rozing, *Temporary, but Essential Requirement of CD8 + T Cells Early in the Pathogenesis of Diabetes in BB Rats as Revealed by Thymectomy and CD8 Depletion*. Clinical and Developmental Immunology, 2003. **10**(2-4): p. 141-151.
81. McLachlan, S.M., Y. Nagayama, P.N. Pichurin, Y. Mizutori, C.R. Chen, and A. Misharin, *The link between Graves' disease and Hashimoto's thyroiditis: A role for regulatory T cells*. Endocrinology, 2007. **148**(12): p. 5724-5733.
82. Geenen, V., *Thymus and type 1 diabetes: An update*. Diabetes Research and Clinical Practice, 2012. **98**(1): p. 26-32.
83. Levin, L., Y. Ban, E. Concepcion, T.F. Davies, D.A. Greenberg, and Y. Tomer, *Analysis of HLA genes in families with autoimmune diabetes and thyroiditis*. Human Immunology, 2004. **65**(6): p. 640-647.
84. Tomer, Y., Y. Ban, E. Concepcion, G. Barbesino, R. Villanueva, and D.A. Greenberg, *Common and Unique Susceptibility Loci in Graves and Hashimoto Diseases: Results of Whole-Genome Screening in a Data Set of 102 Multiplex Families*. The American Journal of Human Genetics, 2003. **73**(4): p. 736-747.
85. Onengut-Gumuscu, S., K.G. Ewens, R.S. Spielman, and P. Concannon, *A functional polymorphisms (1858C/T) in the PTPN22 gene is linked and associated with type 1 diabetes in multiplex families*. Genes and Immunity, 2004. **5**(8): p. 678-680.
86. Levin, L. and Y. Tomer, *The etiology of autoimmune diabetes and thyroiditis: evidence for common genetic susceptibility*. Autoimmunity Reviews, 2003. **2**(6): p. 377-386.
87. Jacobson, E.M., A. Huber, and Y. Tomer, *The HLA gene complex in thyroid autoimmunity: From epidemiology to etiology*. Journal of Autoimmunity, 2008. **30**(1-2): p. 58-62.
88. Tomer, Y. and A. Huber, *The etiology of autoimmune thyroid disease: A story of genes and environment*. Journal of Autoimmunity, 2009. **32**(3-4): p. 231-239.
89. Pociot, F., B. Akolkar, P. Concannon, H.A. Erlich, C. Julier, and G. Morahan, *Genetics of type 1 diabetes: What's next?* Diabetes, 2010. **59**(7): p. 1561-1571.

90. Criswell, L.A., K.A. Pfeiffer, R.F. Lum, B. Gonzales, J. Novitzke, and M. Kern, *Analysis of Families in the Multiple Autoimmune Disease Genetics Consortium (MADGC) Collection: the PTPN22 620W Allele Associates with Multiple Autoimmune Phenotypes*. The American Journal of Human Genetics, 2005. **76**(4): p. 561-571.
91. Pugliese, A. and D. Miceli, *The insulin gene in diabetes*. Diabetes/Metabolism Research and Reviews, 2002. **18**(1): p. 13-25.
92. Ban, Y., D.A. Greenberg, E. Concepcion, L. Skrabanek, R. Villanueva, and Y. Tomer, *Amino acid substitutions in the thyroglobulin gene are associated with susceptibility to human and murine autoimmune thyroid disease*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2003. **100**(25): p. 15119-15124.
93. Pociot, F. and M.F. McDermott, *Genetics of type 1 diabetes mellitus*. Genes and Immunity, 2002. **3**(5): p. 235-249.
94. Ilonen, J., O. Vaarala, H.K. Åkerblom, and M. Knip, *Environmental factors and primary prevention in type 1 diabetes*. Endokrynologia, Diabetologia i Choroby Przemiany Materii Wieku Rozwojowego, 2009. **15**(4): p. 227-232.
95. Åkerblom, H.K., O. Vaarala, H. Hyöty, J. Ilonen, and M. Knip, *Environmental factors in the etiology of type 1 diabetes*. American Journal of Medical Genetics - Seminars in Medical Genetics, 2002. **115**(1): p. 18-29.
96. van der Werf, N., F.G.M. Kroese, J. Rozing, and J.L. Hillebrands, *Viral infections as potential triggers of type 1 diabetes*. Diabetes/Metabolism Research and Reviews, 2007. **23**(3): p. 169-183.
97. Prummel, M.F., T. Strieder, and W.M. Wiersinga, *The environment and autoimmune thyroid diseases*. European Journal of Endocrinology, 2004. **150**(5): p. 605-618.
98. Rottem, M., *Chronic urticaria and autoimmune thyroid disease: is there a link?* Autoimmunity Reviews, 2003. **2**(2): p. 69-72.
99. Tomer, Y., *Hepatitis C and interferon induced thyroiditis*. Journal of Autoimmunity, 2010. **34**(3): p. J322-J326.
100. Signore, A., A. Picarelli, A. Annovazzi, K.E. Britton, A.B. Grossman, and E. Bonanno, *123I-Interleukin-2: biochemical characterization and in vivo use for*

- imaging autoimmune diseases*. Nuclear medicine communications, 2003. **24**(3): p. 305-316.
101. Strieder, T.G.A., B.E. Wenzel, M.F. Prummel, J.G.P. Tijssen, and W.M. Wiersinga, *Increased prevalence of antibodies to enteropathogenic Yersinia enterocolitica virulence proteins in relatives of patients with autoimmune thyroid disease*. Clinical and Experimental Immunology, 2003. **132**(2): p. 278-282.
102. Cettour-Rose, P., C. Theander-Carrillo, C. Asensio, M. Klein, T.J. Visser, and A.G. Burger, *Hypothyroidism in rats decreases peripheral glucose utilisation, a defect partially corrected by central leptin infusion*. Diabetologia, 2005. **48**(4): p. 624-633.
103. Czech, M.P., C.C. Malbon, K. Kerman, W. Gitomer, and P.F. Pilch, *Effect of thyroid status on insulin action in rat adipocytes and skeletal muscle*. Journal of Clinical Investigation, 1980. **66**(3): p. 574-582.
104. Rochon, C., I. Tauveron, C. Dejax, P. Benoit, P. Capitan, and A. Fabricio, *Response of glucose disposal to hyperinsulinaemia in human hypothyroidism and hyperthyroidism*. Clinical Science, 2003. **104**(1): p. 7-15.
105. Handisurya, A., G. Pacini, A. Tura, A. Gessl, and A. Kautzky-Willer, *Effects of T4 replacement therapy on glucose metabolism in subjects with subclinical (SH) and overt hypothyroidism (OH)*. Clinical Endocrinology, 2008. **69**(6): p. 963-969.
106. Hage, M., M.S. Zantout, and S.T. Azar, *Thyroid Disorders and Diabetes Mellitus*. Journal of Thyroid Research, 2011. **2011**.
107. Kilpatrick, E.S., A.S. Rigby, and S.L. Atkin, *Insulin resistance, the metabolic syndrome, and complication risk in type 1 diabetes: "Double diabetes" in the diabetes control and complications trial*. Diabetes Care, 2007. **30**(3): p. 707-712.
108. Davis, T.M.E., D.G. Bruce, and W.A. Davis, *Prevalence and prognostic implications of the metabolic syndrome in community-based patients with type 1 diabetes: The Fremantle Diabetes Study*. Diabetes Research and Clinical Practice, 2007. **78**(3): p. 412-417.
109. Rodondi, N., W.P.J. Den Elzen, D.C. Bauer, A.R. Cappola, S. Razvi, and J.P. Walsh, *Subclinical hypothyroidism and the risk of coronary heart disease and mortality*. JAMA - Journal of the American Medical Association, 2010. **304**(12): p. 1365-1374.

110. Kadiyala, R., R. Peter, and O.E. Okosieme, *Thyroid dysfunction in patients with diabetes: Clinical implications and screening strategies*. International Journal of Clinical Practice, 2010. **64**(8): p. 1130-1139.
111. Chen, H.S., T.E.J. Wu, T.S. Jap, R.A. Lu, M.L. Wang, and R.L. Chen, *Subclinical hypothyroidism is a risk factor for nephropathy and cardiovascular diseases in Type 2 diabetic patients*. Diabetic Medicine, 2007. **24**(12): p. 1336-1344.
112. Den Hollander, J.G., R.W. Wulkan, M.J. Mantel, and A. Berghout, *Correlation between severity of thyroid dysfunction and renal function*. Clinical Endocrinology, 2005. **62**(4): p. 423-427.
113. Yang, G.R., J.K. Yang, L. Zhang, Y.H. An, and J.K. Lu, *Association between subclinical hypothyroidism and proliferative diabetic retinopathy in type 2 diabetic patients: A case-control study*. Tohoku Journal of Experimental Medicine, 2010. **222**(4): p. 303-310.
114. Sud, M., E. Fahy, D. Cotter, A. Brown, E.A. Dennis, C.K. Glass, A.H. Merrill Jr, R.C. Murphy, C.R.H. Raetz, D.W. Russell, and S. Subramaniam, *LMSD: LIPID MAPS structure database*. Nucleic Acids Research, 2007. **35**(SUPPL. 1): p. D527-D532.
115. Watson, A.D., *Lipidomics: A global approach to lipid analysis in biological systems*. Journal of Lipid Research, 2006. **47**(10): p. 2101-2111.
116. Fahy, E., S. Subramaniam, H.A. Brown, C.K. Glass, A.H. Merrill Jr, R.C. Murphy, C.R.H. Raetz, D.W. Russell, Y. Seyama, W. Shaw, T. Shimizu, F. Spener, G. Van Meer, M.S. VanNieuwenhze, S.H. White, J.L. Witztum, and E.A. Dennis, *A comprehensive classification system for lipids*. Journal of Lipid Research, 2005. **46**(5): p. 839-861.
117. Carrasco-Pancorbo, A., N. Navas-Iglesias, and L. Cuadros-Rodríguez, *From lipid analysis towards lipidomics, a new challenge for the analytical chemistry of the 21st century. Part I: Modern lipid analysis*. TrAC - Trends in Analytical Chemistry, 2009. **28**(3): p. 263-278.
118. Quehenberger, O., A.M. Armando, A.H. Brown, S.B. Milne, D.S. Myers, A.H. Merrill, S. Bandyopadhyay, K.N. Jones, S. Kelly, R.L. Shaner, C.M. Sullards, E. Wang, R.C. Murphy, R.M. Barkley, T.J. Leiker, C.R.H. Raetz, Z. Guan, G.M. Laird, D.A. Six, D.W. Russell, J.G. McDonald, S. Subramaniam, E. Fahy, and E.A.

- Dennis, *Lipidomics reveals a remarkable diversity of lipids in human plasma*. Journal of Lipid Research, 2010. **51**(11): p. 3299-3305.
119. Greig, F.H., S. Kennedy, and C.M. Spickett, *Physiological effects of oxidized phospholipids and their cellular signaling mechanisms in inflammation*. Free Radical Biology and Medicine, 2012. **52**(2): p. 266-280.
120. Milne, S., P. Ivanova, J. Forrester, and H. Alex Brown, *Lipidomics: An analysis of cellular lipids by ESI-MS*. Methods, 2006. **39**(2): p. 92-103.
121. Wolf, C. and P.J. Quinn, *Lipidomics: Practical aspects and applications*. Progress in Lipid Research, 2008. **47**(1): p. 15-36.
122. Pulfer, M. and R.C. Murphy, *Electrospray mass spectrometry of phospholipids*. Mass Spectrometry Reviews, 2003. **22**(5): p. 332-364.
123. Hu, C., R. van der Heijden, M. Wang, J. van der Greef, T. Hankemeier, and G. Xu, *Analytical strategies in lipidomics and applications in disease biomarker discovery*. Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences, 2009. **877**(26): p. 2836-2846.
124. Kehrer, J.P., *The Haber-Weiss reaction and mechanisms of toxicity*. Toxicology, 2000. **149**(1): p. 43-50.
125. Catalá, A., *Lipid peroxidation of membrane phospholipids generates hydroxy-alkenals and oxidized phospholipids active in physiological and/or pathological conditions*. Chemistry and Physics of Lipids, 2009. **157**(1): p. 1-11.
126. Maritim, A.C., R.A. Sanders, and J.B. Watkins Iii, *Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: A review*. Journal of Biochemical and Molecular Toxicology, 2003. **17**(1): p. 24-38.
127. Bochkov, V.N., *Inflammatory profile of oxidized phospholipids*. Thrombosis and Haemostasis, 2007. **97**(3): p. 348-354.
128. Perassolo, M.S., J.C. Almeida, R.L. Prá, V.D. Mello, A.L. Maia, C.C. Moulin, J.L. Camargo, T. Zelmanovitz, M.J. Azevedo, and J.L. Gross, *Fatty acid composition of serum lipid fractions in type 2 diabetic patients with microalbuminuria*. Diabetes Care, 2003. **26**(3): p. 613-618.
129. Zendzian-Piotrowska, M., R. Bucki, M. Gorska, and J. Gorski, *Diabetes affects phospholipid content in the nuclei of the rat liver*. Hormone and Metabolic Research, 2000. **32**(10): p. 386-389.

130. Han, X., D.R. Abendschein, J.G. Kelley, and R.W. Gross, *Diabetes-induced changes in specific lipid molecular species in rat myocardium*. *Biochemical Journal*, 2000. **352**(1): p. 79-89.
131. Gredilla, R., M. López Torres, M. Portero-Otín, R. Pamplona, and G. Barja, *Influence of hyper- and hypothyroidism on lipid peroxidation, unsaturation of phospholipids, glutathione system and oxidative damage to nuclear and mitochondrial DNA in mice skeletal muscle*. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 2001. **221**(1-2): p. 41-48.
132. Hamplová, B., O. Nováková, E. Tvrzická, V. Pelouch, and F. Novák, *Effect of hypo- and hyperthyroid states on phospholipid composition in developing rat heart*. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 2003. **252**(1-2): p. 295-303.
133. Guerrero, A., R. Pamplona, M. Portero-Otín, G. Barja, and M. López-Torres, *Effect of thyroid status on lipid composition and peroxidation in the mouse liver*. *Free Radical Biology and Medicine*, 1999. **26**(1-2): p. 73-80.
134. Wang, C., H. Kong, Y. Guan, J. Yang, J. Gu, S. Yang, and G. Xu, *Plasma phospholipid metabolic profiling and biomarkers of type 2 diabetes mellitus based on high-performance liquid chromatography/electrospray mass spectrometry and multivariate statistical analysis*. *Analytical Chemistry*, 2005. **77**(13): p. 4108-4116.
135. Floegel, A., N. Stefan, Z. Yu, K. Mühlenbruch, D. Drogan, H.G. Joost, A. Fritsche, H.U. Häring, M.H. De Angelis, A. Peters, M. Roden, C. Prehn, R. Wang-Sattler, T. Illig, M.B. Schulze, J. Adamski, H. Boeing, and T. Pischon, *Identification of serum metabolites associated with risk of type 2 diabetes using a targeted metabolomic approach*. *Diabetes*, 2013. **62**(2): p. 639-648.
136. Li, M., Z. Zhou, H. Nie, Y. Bai, and H. Liu, *Recent advances of chromatography and mass spectrometry in lipidomics*. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2011. **399**(1): p. 243-249.
137. Ferreiro-Vera, C., F. Priego-Capote, and M.D. Luque de Castro, *Comparison of sample preparation approaches for phospholipids profiling in human serum by liquid chromatography-tandem mass spectrometry*. *Journal of Chromatography A*, 2012. **1240**: p. 21-28.
138. Dong, M.W. and J. Wiley, *Modern HPLC for practising scientists*. Wiley Online Library, 2006.

139. Ivanova, P.T., S.B. Milne, D.S. Myers, and H.A. Brown, *Lipidomics: a mass spectrometry based systems level analysis of cellular lipids*. Current Opinion in Chemical Biology, 2009. **13**(5-6): p. 526-531.
140. Han, X. and R.W. Gross, *Shotgun lipidomics: Electrospray ionization mass spectrometric analysis and quantitation of cellular lipidsomes directly from crude extracts of biological samples*. Mass Spectrometry Reviews, 2005. **24**(3): p. 367-412.
141. Hsu, F.F. and J. Turk, *Electrospray ionization with low-energy collisionally activated dissociation tandem mass spectrometry of glycerophospholipids: Mechanisms of fragmentation and structural characterization*. Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences, 2009. **877**(26): p. 2673-2695.
142. Zehethofer, N. and D.M. Pinto, *Recent developments in tandem mass spectrometry for lipidomic analysis*. Analytica Chimica Acta, 2008. **627**(1): p. 62-70.
143. Castaneda, C., O.I. Bermudez, and K.L. Tucker, *Protein nutritional status and function are associated with type 2 diabetes in Hispanic elders*. American Journal of Clinical Nutrition, 2000. **72**(1): p. 89-95.
144. Doi, Y., Y. Kiyohara, M. Kubo, T. Ninomiya, Y. Wakugawa, K. Yonemoto, M. Iwase, and M. Iida, *Elevated C-reactive protein is a predictor of the development of diabetes in a general Japanese population: The Hisayama study*. Diabetes Care, 2005. **28**(10): p. 2497-2500.
145. Ingelsson, E., J. Årnlöv, J. Sundström, and L. Lind, *Inflammation, as Measured by the Erythrocyte Sedimentation Rate, Is an Independent Predictor for the Development of Heart Failure*. Journal of the American College of Cardiology, 2005. **45**(11): p. 1802-1806.
146. Parikh, R.M., S.R. Joshi, P.S. Menon, and N.S. Shah, *Prevalence and pattern of diabetic dyslipidemia in Indian type 2 diabetic patients*. Diabetes and Metabolic Syndrome: Clinical Research and Reviews, 2010. **4**(1): p. 10-12.
147. Jevrić-Causević, A., M. Malenica, and T. Dujić, *Creatine kinase activity in patients with diabetes mellitus type I and type II*. Bosnian journal of basic medical sciences / Udruženje osnovnih medicinskih znanosti = Association of Basic Medical Sciences, 2006. **6**(3): p. 5-9.

148. Harris, E.H., *Elevated liver function tests in type 2 diabetes*. *Clinical Diabetes*, 2005. **23**(3): p. 115-119.