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

JÉSSICA ELLEN BARBOSA DE FREITAS LIMA

Estudo do estresse oxidativo e influência da hiperglicemia crônica nos perfis de expressão gênica em pacientes com diabetes mellitus tipo 2

RIBEIRÃO PRETO
2019

JÉSSICA ELLEN BARBOSA DE FREITAS LIMA

Estudo do estresse oxidativo e influência da hiperglicemia crônica nos perfis de expressão gênica em pacientes com diabetes mellitus tipo 2

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.
Área de Concentração: Genética
Orientadora: Profª. Drª. Elza Tiemi Sakamoto Hojo

RIBEIRÃO PRETO
2019

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Lima, Jéssica Ellen Barbosa de Freitas

Estudo do estresse oxidativo e influência da hiperglicemia crônica nos perfis de expressão gênica em pacientes com diabetes mellitus tipo 2. Ribeirão Preto, 2019.
84 p. : il. ; 30 cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Genética.
Orientadora: Sakamoto-Hojo, Elza Tiemi.

1. Reparo do DNA. 2. Dano ao DNA. 3. Parâmetros mitocondriais. 4. Resistência à insulina. 5. Intervenção nutricional.

Nome: LIMA, Jéssica Ellen Barbosa de Freitas

Título: Estudo do estresse oxidativo e influência da hiperglicemia crônica nos perfis de expressão gênica em pacientes com diabetes mellitus tipo 2.

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Aprovado em:__/__/____

Banca examinadora

Prof. Dr._____Instituição:_____

Julgamento: _____ Assinatura:_____

Prof. Dr._____Instituição:_____

Julgamento: _____ Assinatura:_____

Prof. Dr._____Instituição:_____

Julgamento: _____ Assinatura:_____

Prof. Dr._____Instituição:_____

Julgamento: _____ Assinatura:_____

APOIO E SUPORTE FINANCEIRO

O presente trabalho foi realizado com apoio do CNPq, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – Brasil (Bolsa de mestrado/ Proc. 131414/2017-8).

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP.

Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – FMRP

Conselho Nacional de Desenvolvimento Cientifico e Tecnológico – CNPq.

Departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo – FMRP-USP.

Departamento de Biologia da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo – FFCLRP-USP.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha orientadora, **Profa. Dra. Elza Tiemi Sakamoto-Hojo**, pela orientação neste trabalho, por ter me recebido com alegria no laboratório e por ter disponibilizado de todas as condições para o desenvolvimento deste estudo. Obrigada por tudo, professora, desde as conversas mais informais até as profissionais.

À **Profa. Dra. Catarina Satie Takahashi** por desde sempre me fazer sentir acolhida e me fazer sentir que aqui também é uma família. Sempre com as comemorações e todo o carinho, incentivo e apoio. Obrigada professora, por todos os momentos bons que tive com a senhora e com todos no laboratório em nossas reuniões.

Ao **Prof. Dr. Aguinaldo Luiz Simões**, chefe do Departamento de Genética da FMRP/USP e à **Profa. Dra. Ester Silveira Ramos**, coordenadora do curso de Pós-Graduação do Departamento de Genética, pelo apoio prestados à nossa pós.

Ao **Prof. Dr. Geraldo Aleixo Passos**, por gentilmente disponibilizar o uso de alguns aparelhos de seu laboratório e também a todo o pessoal do Laboratório de Imunogenética molecular por estarem sempre dispostos a ajudar.

À **Profa. Dra Maria Cristina Foss Freitas**, ao **Rafael Ferraz** e à **Dra. Diane Rassi**, por terem disponibilizado as amostras necessárias para o desenvolvimento dessa pesquisa, além dos conselhos, sugestões e ajudas da Diane.

À funcionária da limpeza, **Maria Oliveira**, pelo zelo e cuidado que teve sempre com o laboratório.

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

À secretaria do Departamento de Genética, principalmente a **Sra. Susie Adriana Nalon**, pela atenção e atendimentos prestados.

À instituição **CNPq**, pela bolsa de mestrado, sem o qual eu não poderia ter desenvolvido este trabalho e à **CAPES** e **FAPESP**, pelo auxílio financeiro, sem o qual a realização deste trabalho seria impossível. E ao **Departamento de Genética** e à **Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto**, pela estrutura e apoio oferecidos.

À todas as pessoas que deram seu sangue por esse trabalho, porque a ciência é necessária.

Ao melhor apoio técnico, emocional, estrutural que qualquer laboratório poderia ter, **Luiz Augusto da Costa Júnior**, por estar sempre presente, por ser essa pessoa maravilhosa que eu amo, pelo companheirismo, amizade, todas as conversas, lições de moral, conselhos, sugestões, caronas, ajudas, cervejas. Junão, te amo!

À **Natália Chermont**, por estar sempre do meu lado, por me ajudar em tudo na vida, pelos conselhos sem fim, pelas sugestões durante todo esse trabalho, por tudo que você já me ensinou, pelas dicas, ajudas nos experimentos até tarde no laboratório, ajuda na vida pessoal, pelos risos, alegria, me aturar em todos os momentos bons e ruins, por ser minha melhor vizinha e estar sempre aqui quando eu preciso. Nat, obrigada por tudo, porque sem você, Ribeirão não teria graça. Ao **Danilo JX**, porque sem ele sinceramente, esse trabalho não teria sido possível. Obrigada por ter me ajudado em tudo, desde as coletas dos pacientes no HC, experimentos até o último momento com as análises dos resultados desse trabalho. Obrigada por ter me ensinado tudo, por ter sido meu co-orientador, pela paciência comigo do tanto que enchi seu saco, mas mais do que tudo obrigada pela carinho e amizade que você sempre me deu, pelas conversas informais sobre jogos, até as mais sérias que me dava umas lascadas pra eu fazer as coisas. Obrigada por ser esse amigo tão maravilhoso que eu ganhei por ter vindo a Ribeirão. Sem vocês dois a vida seria muito difícil, amo vocês!

Aos amigos do laboratório, **Ana Paula Montaldi**, **Paulo Godoy**, **Leo, Lari, Thayná, Ana Beatriz, Sarinha, Gabs, Johnathan** pelas sugestões, conhecimentos, ajuda em experimentos, amizade nesse tempo que estive aqui e sempre disposição a ajudar. Obrigada, gente!

Aos meus grandes amigos de Teresina, dos quais eu morro de saudade, e estou aqui sempre querendo estar lá, **Dieguinho, Vitória, Leyliane, Higo, Laila, Mateus, Hanah, Ricardo** e outros dos quais as melhores memórias estão em off.

Aos meus pais, **Edilva** e **Arimateia** e meu irmão **Jefferson**, que são tudo na minha vida, que morro de saudade, e estou sempre me arrependendo por estar tão longe. Obrigada pelo apoio incondicional, eu amo vocês do fundo do meu coração, multiplicado por 1 zilhão!

RESUMO

LIMA, J. E. B. F. **Estudo do estresse oxidativo e influência da hiperglicemia crônica nos perfis de expressão gênica em pacientes com diabetes mellitus tipo 2.** 2019. 84 f. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2019.

O diabetes mellitus (DM) é uma síndrome metabólica crônica, cuja característica principal é a hiperglicemia. O diabetes do tipo 2 (DM2) é a forma mais prevalente da doença, podendo ser iniciado com o desenvolvimento de resistência à insulina em tecidos periféricos e produção insuficiente desta frente à demanda do corpo. Os níveis elevados de glicose no sangue podem levar a uma série de alterações celulares e moleculares nas vias de sinalização da insulina, de inflamação, respostas ao estresse oxidativo e nos processos de reparo do DNA que podem levar ao ciclo vicioso de disfunção das células β pancreáticas, à resistência insulínica e declínio metabólico. Visto o impacto que o sobrepeso e a obesidade têm em pacientes com DM2, intervenções nutricionais são sempre recomendadas nesses indivíduos. Além disso, foi relatado que restrições nutricionais têm efeitos positivos quanto à extensão da longevidade e redução da incidência de doenças associadas ao envelhecimento. Nesse contexto, os objetivos do presente estudo consistiram em avaliar os efeitos da hiperglicemia crônica em vias de sinalização molecular ligadas ao estresse oxidativo, reparo do DNA, resistência à insulina e inflamação, bem como análise do quadro de estresse oxidativo ao nível celular, mitocondrial e no *pool* de nucleotídeos, em pacientes com DM2 avaliados antes e após uma intervenção sob restrição proteica, e em pacientes DM2 portadores de hiperglicemia crônica comparados a um grupo de indivíduos sadios. Foi observado que em apenas 4 semanas a dieta com restrição proteica foi eficiente em reduzir significativamente os danos no DNA dos pacientes com DM2. Quanto aos genes avaliados, não foram observadas diferenças significativas nos níveis de expressão após a intervenção, sendo apenas observada uma leve tendência de indução dos genes *PI3K*, *PRKAA1* e *ATM*. No entanto, foi possível observar em alguns pacientes a indução de genes (*OGG1*, *MUTYH*, *SOD1*, *FOXO3*, *NUDT1*) relacionados a reparo do DNA e resposta a danos. Adicionalmente, em relação aos níveis de bases oxidadas no *pool* de nucleotídeos, o período de intervenção não foi suficiente para demonstrar efeitos nesse sentido. Porém, foi observado que indivíduos com DM2 possuem níveis aumentados de bases

oxidadas no *pool* de nucleotídeos quando comparados aos indivíduos sadios. Quanto às análises de estresse oxidativo a nível celular e mitocondrial, alterações significativas na quantificação de ROS, de potencial de membrana e massa mitocondrial não foram observadas quando comparados pacientes com DM2 e indivíduos sadios. Assim, foi observado que a hiperglicemia crônica promove um quadro de estresse oxidativo nos pacientes com DM2 e que a intervenção nutricional durante 4 semanas foi eficiente em reduzir significativamente os danos no DNA em pacientes com DM2, bem como melhorar o controle glicêmico desses indivíduos. Enquanto alterações na expressão transcricional de genes e nos níveis de bases oxidadas não foram observadas após o período de intervenção, é sugerido que um controle alimentar mais prolongado e um maior número amostral forneça informações relevantes acerca desta abordagem em pacientes com DM2.

Palavras-chave: Reparo do DNA; Dano ao DNA; Parâmetros mitocondriais; Resistência à insulina; Intervenção nutricional.

ABSTRACT

LIMA, J. E. B. F. **Oxidative stress and influence of chronic hyperglycemia on gene expression profiles in patients with type 2 diabetes mellitus**. 2019. 84 f. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2019.

Diabetes mellitus (DM) is a chronic metabolic syndrome, mainly characterized by hyperglycemia. Type 2 diabetes (T2D), the most prevalent form of diabetes, can be initiated with poor insulin secretion, lack of insulin sensitivity in target tissues or the combination of both. Elevated blood glucose levels can lead to a number of cellular and molecular changes in insulin signaling pathways, inflammation, oxidative stress responses, and DNA repair processes that can lead to pancreatic β-cells dysfunction, insulin resistance and metabolic decline. Considering the impact of overweight and obesity on individuals with T2D, nutritional interventions are recommended for those individuals. In addition, it has been reported that dietary restrictions have a positive effect on longevity extension and reduction of age-related diseases. In this context, the purpose of the present study was to evaluate the effects of chronic hyperglycemia on molecular signaling pathways linked to oxidative stress, DNA repair, insulin resistance and inflammation, as well as analysis of oxidative stress at the mitochondrial level and nucleotide pool in T2D patients evaluated before and after an intervention under protein restriction. T2D patients with chronic hyperglycemia compared to a group of healthy individuals were also evaluated. It was observed that following a period of 4 weeks, the protein-restricted diet led to decreased levels of DNA damage in patients with T2D. Regarding the target genes, no significant differences were observed in the expression levels after the intervention. Only a slight tendency of induction was observed for *PI3K*, *PRKAA1* and *ATM* genes. However, for some patients there was an induction of several genes (*OGG1*, *MUTYH*, *SOD1*, *FOXO3*, *NUDT1*) related to DNA repair and response to damage. In addition, in relation to the levels of oxidized bases in the nucleotide pool, the intervention period was not sufficient to exert alterations in those levels. However, it has been observed that individuals with T2D have increased levels of oxidized bases in the nucleotide pool when compared to healthy individuals. Regarding mitochondrial analysis, no significant alterations in the quantification of ROS, membrane potential and mitochondrial mass were observed when comparing T2D patients and healthy individuals. Thus, it was observed that chronic

hyperglycemia promotes an oxidative stress condition in T2D patients, and dietary restriction during 4 weeks was found efficient in significantly reducing DNA damage in patients with T2DM, as well as improving the glycemic control of these individuals. While changes in transcriptional gene expression and oxidized bases levels were not observed after the intervention period, thus suggesting that longer nutritional control and a larger sample number might provide relevant information about this approach in T2D patients.

Keywords: DNA Repair; DNA damage; Mitochondrial parameters; Insulin resistance; Dietary restriction.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Via de sinalização da insulina. Fonte: Kegg 27
Figura 2 – Danos no DNA avaliados pelo ensaio cometa, representados como porcentagens de DNA na cauda, avaliados em amostras de sangue total de pacientes com DM2 submetidos à internação sob restrição proteica, ao início (RP-I) e final (RP-F) de 4 semanas de internação, comparados aos indivíduos do grupo controle. Valores representados como média ± DP. Análise estatística teste t para amostras pareadas (RP-I e RP-F) e de amostras não pareadas em relação aos controles. **p*=0,01, ****p*<0,001 indicam diferenças estatisticamente significativas quando comparado ao controle ou entre os grupos. 46
Figura 3 – Expressão relativa de genes avaliados por qRT-PCR em PBMCs de pacientes DM2 submetidos à intervenção (restrição proteica), analisados ao início (RP-I) e ao final (RP-F) de 4 semanas de internação (A, B, C e D). Os valores de expressão foram normalizados de acordo com a expressão dos endógenos *GAPDH*, *GUSB* e *HPRT1*. O gráfico é apresentado na forma de mediana e o intervalo interquartil. O teste t para amostras pareadas foi utilizado para a comparação entre os grupos. 48
Figura 4 – *Heatmap* (agrupamento hierárquico) mostrando uma representação gráfica dos níveis de expressão gênica entre todas as amostras (colunas) para determinado gene alvo (linhas; alvos à direita). Os alvos e amostras (sendo I para início e F para final da intervenção) estão agrupados de acordo com a similaridade em termos de nível de expressão. Estas foram agrupadas utilizando a distância de Pearson com ligação média e de forma *target-centric*, ou seja, cada ponto correspondente a certo gene pode apenas ser comparado relativamente com outro ponto daquele mesmo gene. Os genes induzidos estão representados em vermelho, os genes reprimidos em verde, e os genes sem diferença na expressão em preto, sendo que maiores intensidades de cor representam maiores diferenças na intensidade de expressão. 50
Figura 5 – Avaliação dos níveis de 8-oxo-dG. A) Níveis individuais de 8-oxo-dG avaliados em pacientes DM2 (Grupo-01), ao início (RP-I) e ao final (RP-F) de 4 semanas de intervenção, correspondente ao período de internação no hospital, sob regime alimentar de restrição de proteínas; os resultados foram comparados com o grupo de indivíduos sadios (controles – Grupo-03). B) Níveis individuais de 8-oxo-dG em amostras de soro de pacientes DM2 (Grupo-02) e de indivíduos sadios (controles – Grupo-03). Valores representados como média ± DP. **p*<0,05 indica diferença estatisticamente significativa quando comparado aos controles...51
Figura 6 – Análise de parâmetros mitocondriais em PBMCs de pacientes com DM2 (Grupo-02) e indivíduos sadios (Grupo-03). A) Quantificação de ROS mitocondrial analisado pela intensidade de fluorescência média (IFM) emitida por *MitoSox Red*. B) Quantificação de ROS celular medido pela intensidade de fluorescência média analisado pelo *DHE*. C) Determinação do potencial de membrana mitocondrial avaliado pela IFM do *TMRM*. D) Avaliação da massa mitocondrial pela IFM do *MitoTracker Green*. Foi utilizado como controle positivo 100µM de *CCCP*. Os valores são representados como média ± desvio padrão. ***p*<0,01; ****p*<0,0001.53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Características clínicas dos pacientes submetidos à restrição de proteínas (Grupo-01). 35
Tabela 2 – Características clínicas de pacientes com DM2 (Grupo-02). 36
Tabela 3 – Características clínicas de indivíduos controles (Grupo-03). 37
Tabela 4 – Lista de genes avaliados quanto aos níveis de expressão gênica. 41
Tabela 5 – Porcentagens de DNA na cauda de indivíduos do Grupo-01 e do Grupo-03 representados como valores de média ± desvio padrão. 46
Tabela 6 – Níveis de 8-oxo-dG (ng/mL) de indivíduos submetidos à restrição proteica (Grupo-01) e indivíduos controles (Grupo-03). Valores representados como média ± DP. 51
Tabela 7 – Níveis de 8-oxo-dG (ng/mL) de indivíduos DM2 (Grupo-02) e indivíduos controles (Grupo-03). Valores representados como média ± DP. 52
Tabela 8 – Determinação de parâmetros mitocondriais em pacientes com DM2 (Grupo-02) e indivíduos controles (Grupo-03). Valores representados como média ± desvio padrão. 53

LISTA DE ANEXOS

Anexo A – Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa do HCRP (Processo 747/2018).....77
Anexo B – Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa do HCRP (Processo 16286/2015).....78
Anexo C – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) – Participante da intervenção sob restrição proteica.....79
Anexo D – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) – Pacientes DM2 81
Anexo E – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) – Controles 83

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

8-oxo-dG	*8-oxo-7,8-dihydro-2-deoxyguanosine*
8-oxo-G	8-oxo-guanina
AKT	*Alpha serine/threonine-protein kinase*
AKT2	*AKT serine/threonine kinase 2*
AMPK	*AMP-activated protein kinase*
APE1	*Apurinic/apyrimidinic endodeoxyribonuclease 1*
ATM	*ATM serine/threonine kinase*
ATR	*ATR serine/threonine kinase*
BECN1	*Beclin 1*
CALERIE	*Comprehensive assessment of long-term effects of reducing intake of energy*
CCCP	*Carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazone*
CCL3	*C-C motif chemokine ligand 3*
CCND2	*Cyclin D2*
CDKAL1	*CDK5 regulatory subunit associated protein 1 like 1*
CDKN1B	*Cyclin dependent kinase inhibitor 1B*
CDKN2A/2B	*Cyclin dependent kinase inhibitor 2A/2B*
CHK1	*Checkpoint kinase 1*
CHK2	*Checkpoint kinase 2*
COX	Ciclo-oxigenases
CXCL1	*C-X-C motif chemokine ligand 1*
DA	Doença de Alzheimer
DHE	*Dihydroethidium*
DM	Diabetes Mellitus
DM1	Diabetes Mellitus tipo 1
DM2	Diabetes Mellitus tipo 2
DP	Desvio Padrão
FMRP	Faculdade de medicina de Ribeirão Preto
FOXO	*Forkhead box*
FOXO3	*Forkhead box O3*
FTO	*FTO alpha-ketoglutarate dependent dioxygenase*

GAPDH	*Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*
GLUT4	*Glucose transporter 4*
GSK3	*Glycogen synthase kinase 3*
GSK3B	*Glycogen synthase kinase 3 beta*
GUSB	*Glucuronidase beta*
GWAS	*Genome-wide association study*
H_2O_2	Peróxido de hidrogênio
Hb1Ac	Hemoglobina glicada
HCRP	Hospital das clínicas de Ribeirão Preto
hMTH1	*Human MutT homologue*
hMYH	*Human MUTY homologue*
HPRT1	*Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1*
IGF-1	*Insulin growth factor 1*
IGFBP2	*Insulin like growth factor binding protein 2*
IKBKB	*Inhibitor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells, kinase beta*
IKKβ	*Iκβ kinase-β*
IL-1β	*Interleukin beta*
IL-6	*Interleukin 6*
IMC	Índice de massa corporal
IRS-1	*Insulin receptor substrate 1*
JNK	*JUN N-terminal kinase*
KCNJ11	*Potassium voltage-gated channel subfamily J member 11*
KLF6	*Kruppel like factor 6*
KRT1	*Keratin 1*
LMNB1	*Lamin B1*
MAPK8	*Mitogen-activated protein kinase 8*
mtDNA	DNA mitocondrial
mTOR	*Mammalian target of rapamycin*
NF-κB	N*uclear factor kappa beta*
NO	Óxido nítrico
NOS	*Endotelial NO synthases*
NOX4	*NADPH oxidase 4*

NUDT1	*Nudix hydrolase 1*
OGG1	*8-oxoguanine DNA glycosylase*
PBMC	Células mononucleares do sangue periférico
PGC1α	*Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha*
PI3K	*Phosphatidylinositol 3-kinase*
PIK3CA	*Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha*
PIP2	*Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase*
PIP3	*Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate*
PPARG	*Peroxisome proliferator activated receptor gamma*
PRKAA1	*Protein kinase AMP-activated catalytic subunit alpha 1*
RE	Retículo endoplasmático
RIN	*RNA integrity number*
RN	Restrição nutricional
RNS	Espécies reativas de nitrogênio
ROS	Espécies reativas de oxigênio
RP-F	Restrição proteica final
RP-I	Restrição proteica inicial
SIRT1	*NAD-Dependent Protein Deacetylase Sirtuin-1*
SOD1	*Superoxide dismutase 1, soluble*
SOD2	*Superoxide dismutase 2, mitochondrial*
TCF7L2	*Transcription factor 7 like 2*
TMRM	*Tetramethylrhodamine*
TNFRSF1B	*TNF receptor superfamily member 1B*
TNF-α	*Tumor necrosis factor alpha*
TP53	*Tumor protein p53*
TRIB3	*Tribbles pseudokinase 3*
UPR	*Unfolded protein response*
XRCC1	*X-ray repair cross complementing 1*

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 20
1.1 Diabetes mellitus 20
1.2 Diabetes mellitus tipo 2 e estresse oxidativo 21
1.3 Via de sinalização da insulina e resistência à insulina 25
1.4 Restrição nutricional e longevidade 27
2 HIPÓTESE 30
3 OBJETIVOS 32
3.1 Objetivos específicos 32
4 MATERIAIS E MÉTODOS 34
4.1 Casuística 34
4.2 Coleta e separação de células mononucleares do sangue periférico 37
4.3 Ensaio cometa em condições alcalinas 38
4.4 Extração, quantificação e avaliação de integridade de RNA 38
4.5 Reação de Transcrição Reversa 39
4.6 Avaliação da expressão gênica por qPCR em tempo real 40
4.7 Análise de 8-oxo-dG no *pool* de nucleotídeos do soro sanguíneo 41
4.8 Avaliação de ROS celular e mitocondrial, potencial de membrana e massa mitocondrial 42
4.9 Análise estatística 43
5 RESULTADOS 45
5.1 Caracterização dos grupos estudados 45
5.2 Danos no DNA 45
5.3 Avaliação da expressão gênica por qPCR 46
5.4 Determinação dos níveis de 8-oxo-dG no *pool* de nucleotídeos 50
5.5 Determinação de parâmetros mitocondriais 52
6 DISCUSSÃO 55
7 CONCLUSÕES 64
REFERÊNCIAS 66
ANEXOS 77

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1 Diabetes mellitus

Estima-se, em todo o mundo, que cerca de 425 milhões de pessoas possuem diabetes e a projeção para 2045 é que esse número cresça em torno de 48% entre pessoas com faixa etária de 20 a 79 anos de idade. No Brasil, estima-se que 12,5 milhões de pessoas vivem com esta doença, sendo o 4º país com o maior número de afetados (International Diabetes Federation, 2017).

O diabetes mellitus (DM) é uma doença metabólica crônica, cuja característica principal é a hiperglicemia, condição em que o organismo pode não responder à insulina produzida ou não está sendo capaz de produzir a quantidade necessária desse hormônio. Entre os tipos de diabetes, os tipos 1, tipo 2 e gestacional são os mais frequentes. Outras formas menos comuns incluem doenças genéticas como o diabetes do jovem com início na maturidade (do Inglês, *Maturity-Onset Diabetes of the Young*) e o diabetes neonatal.

O diabetes mellitus tipo 1 (DM1) é desencadeado a partir da destruição autoimune das células ß das ilhotas pancreáticas produtoras de insulina e, consequentemente, da falta de produção desse hormônio pelo pâncreas. Tem início usualmente em crianças e jovens, sendo que mais de um milhão de indivíduos entre 0 e 19 anos apresentam DM1 no mundo (De La Monte & Wands, 2008; Maiese, 2015; International Diabetes Federation, 2017). Por outro lado, o diabetes mellitus tipo 2 (DM2), sendo esta a forma mais prevalente da doença, pode se iniciar com o desenvolvimento de resistência à insulina em tecidos periféricos e/ou produção insuficiente deste hormônio. Nessa condição, ocorre a dessensibilização dos receptores de insulina frente ao hormônio, acarretando deficiência do organismo quanto à captação e absorção de glicose (Leibowitz et al., 2008; Blake & Trounce, 2014).

A predisposição genética pode também ser um dos determinantes que favorecem a suscetibilidade ao desenvolvimento do DM2. Diversas variantes de genes e inclusive modificações epigenéticas em histonas e metilação do DNA podem influenciar na herdabilidade do DM2 (Ali, 2013; Basile et al., 2014). Devido à complexidade da interação de diferentes fatores envolvidos nesta doença, estudos em escala genômica (GWAS – *genome-wide association study*) estão sendo realizados na tentativa de identificar variantes genéticas relacionadas ao risco aumentado ao DM2.

Em 2007, foi realizado na França o primeiro GWAS em pacientes com DM2 (Sladek et al., 2007); atualmente, já foram identificados pelo menos 75 loci associados, incluindo o fator de transcrição *TCF7L2*, sendo este, o gene mais comumente indicado nas populações estudadas, além de *PPARG, KCNJ11, FTO, CDKN2A/2B, CDKAL1, IGFBP2*, entre outros (Kwak & Park, 2016). Desde então, outros estudos semelhantes foram realizados (Ma et al., 2013; Fogarty et al., 2014), sendo observado que os loci com maior associação ao DM2 variam muito quanto ao risco relativo entre as diferentes etnias (Basile et al., 2014). Além disso, essas variantes explicam apenas um baixo percentual de herdabilidade da doença, sendo que a maioria delas se encontra em regiões intergênicas ou intrônicas do DNA (Kwak & Park, 2016).

Adicionalmente, os padrões de metilação no DNA podem contribuir para a suscetibilidade genética ao DM2. Há evidências de associação de determinados loci utilizando estudos com o epigenoma, sendo identificados distintos padrões de metilação associados a um risco aumentado em desenvolver DM2 (Chambers et al., 2015); entretanto, esta abordagem constitui ainda um grande desafio para os pesquisadores.

1.2 Diabetes mellitus tipo 2 e estresse oxidativo

Alterações na homeostase relativa à glicose representam um fator crítico para o desenvolvimento de doenças metabólicas. Normalmente, para manter os níveis ideais de glicose no sangue, o pâncreas secreta dois hormônios, a insulina e o glucagon. Em resposta à hiperglicemia, as células ß pancreáticas secretam a insulina, que facilita a absorção e captação de glicose pelos tecidos periféricos, reduz a gliconeogênese e diminui a quebra de glicogênio e triglicerídeos. Entretanto, quando os níveis de glicose no sangue estão reduzidos, as células α liberam o glucagon que fará o processo inverso ao citado acima (Blake & Trounce, 2014).

Uma das principais causas de alteração quanto à regulação da glicose é a resistência à insulina, que ocorre quando há a dessensibilização dos receptores de insulina nos tecidos alvo frente à insulina produzida, acarretando uma deficiência do organismo quanto à captação e absorção de glicose. Como um mecanismo compensatório, as células ß pancreáticas aumentam a secreção do hormônio, porém, se os níveis de glicose no sangue permanecerem altos devido à incapacidade de a insulina atender a demanda do corpo, o DM2 pode se desenvolver (Donath & Shoelson, 2011; American Diabetes Association). A resistência à insulina persiste nos pacientes desde o pré-diabetes, estágio no qual os indivíduos possuem

níveis de glicose acima do normal, porém não tão altos para o diagnóstico da doença em si (Bloomgarden, 1997; Donath & Shoelson, 2011).

Os níveis elevados de glicose no sangue podem levar a uma série de alterações celulares e moleculares no organismo, em especial devido à produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) (Evans et al., 2002). As ROS são geradas normalmente em consequência do metabolismo do oxigênio, sendo as mitocôndrias, a principal fonte de produção destas moléculas (Sangsuwan & Haghdoost, 2008). Porém, entre outras fontes estão as NADPH oxidases (NOXs), xantinas oxidases e ciclooxigenases (COXs). Predominantemente, as ROS incluem os radicais livres superóxido (O2-•) e hidroxila (OH-), além das espécies não radicalares, como o óxido nítrico (NO) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Há ainda as espécies reativas de nitrogênio (RNS), derivadas principalmente do óxido nítrico, e produzidas pelas NOS (*endothelial NO synthases*) (Wen et al., 2013; Zhang et al., 2016a; Rochette et al., 2018).

As ROS, quando em concentrações baixas, possuem importante função em vias de sinalização, estando envolvidas no controle transcricional, na regulação do ciclo celular e na modulação da atividade de enzimas, receptores e transportadores (Rochette et al., 2014, 2018; Hurrle & Hsu, 2017). Além disso, tem papel na regulação da captação da glicose, onde as ROS podem alterar o nível de expressão dos transportadores de glicose (GLUTs), bem como estimular a translocação destes para a membrana plasmática ou alterar a atividade dos GLUTs que estão na membrana. Para contrabalancear a produção de ROS, enzimas antioxidantes, (superóxido dismutase (MnSOD, Cu/ZnSOD), catalase, glutationa peroxidase), além das peroxiredoxinas e tioredoxinas atuam no sentido de remover essas moléculas do organismo (Liemburg-Apers et al., 2015; Rochette et al., 2018).

A exposição crônica a altos níveis de glicose no sangue pode promover alteração na cadeia transportadora de elétrons da mitocôndria, levando a uma produção descontrolada de superóxido e peróxido de hidrogênio (Dodson et al., 2013). Quando a concentração de ROS supera a capacidade antioxidante do organismo, essas moléculas reativas podem causar danos aos lipídios, proteínas e ácidos nucleicos, resultando em uma condição chamada estresse oxidativo (Zhang et al 2016).

Dentre os danos causados pelas ROS por meio de oxidação, a base guanina é a mais frequentemente modificada, sendo assim utilizada como marcador de estresse oxidativo, onde ocorre a formação da 8-oxoguanina (8-oxoG) e a 8-oxodesoxiguanosina (8-oxo-dG), tanto no DNA como no *pool* de nucleotídeos a ser incorporado durante a duplicação ou reparo

do DNA (Haghdoost et al., 2005; Haghdoost et al., 2006). O reparo da lesão ocasionada pela 8-oxoG é realizado pelo mecanismo de reparo por excisão de base (BER). A 8oxoG pode se parear tanto com citosina como com a adenina durante a duplicação do DNA. A DNA glicosilase OGG1 reconhece a 8oxoG pareada com a citosina, que em conjunto com a enzima APE1, o complexo polimerase β e DNA ligase I realizam a retirada dessa base e reparo da lesão; quando pareada com a adenina, a enzima hMTYH (*human MutY homologue*) promove a retirada da adenina incorporada erroneamente, permitindo que a citosina seja pareada e a OGG1 atue nesta lesão, de forma que seja evitada transversões G:C para T:A no DNA (Fortini et al., 2003a; Kremer et al., 2004; Almeida & Sobol, 2007); a remoção do segundo tipo (8-oxo-dG) do *pool* de nucleotídeos é realizado pela enzima hMTH1 (*human MutT homologue*), que ao hidrolisar a 8-oxo-dGTP permite o transporte desta molécula para o meio extracelular, impedindo a sua incorporação no DNA (Kremer et al., 2004; Sangsuwan & Haghdoost, 2008) razão pela qual é possível que esta seja detectada no soro sanguíneo, plasma ou urina de indivíduos, por meio de ensaios de ELISA, HPLC, dentre outros (Haghdoost et al., 2005).

Outros tipos de reparo envolvem o reparo por excisão de nucleotídeos, recombinação homóloga, reparo por junção de extremidades não homólogas e reparo de bases mal pareadas. No diabetes, o reparo do DNA e o nível de enzimas antioxidantes se mostraram reduzidos (Blasiak et al., 2004; Tilg & Moschen, 2008), enquanto que os níveis de danos no DNA (Xavier et al., 2014) e de bases oxidadas no *pool* de nucleotídeos (Sun et al., 2015) se mostraram aumentados nesses pacientes.

O estresse oxidativo promovido pela hiperglicemia crônica provoca danos celulares principalmente nas células β pancreáticas, conhecidas por possuírem baixos níveis de enzimas antioxidantes, sendo assim mais suscetíveis aos danos provocados pelas ROS. Esse estresse é também responsável por liberar mediadores inflamatórios, culminando em um ciclo vicioso que leva à disfunção das células β, à resistência insulínica e declínio metabólico, que em conjunto, constituem fatores determinantes para o desenvolvimento do DM2 (Akash et al., 2013).

No diabetes, os altos níveis de glicose podem também induzir o estresse de retículo endoplasmático (RE). Uma vez que é no RE que ocorre a maturação e dobramento das proteínas, incluindo a pró-insulina, esta tende a ser sintetizada excessivamente durante a hiperglicemia, podendo sobrecarregar o RE e levar ao comprometimento da homeostase e ao acúmulo de proteínas mal dobradas, gerando assim uma condição de estresse. Esse estresse

pode levar à ativação da via de resposta a proteínas mal dobradas (UPR – *unfolded protein response*), podendo restaurar a homeostase do RE ou alternativamente, induzir a morte celular. Esta última, pode levar à disfunção das células β e, consequentemente, à redução da secreção de insulina, resultando em hiperglicemia crônica (Fonseca et al., 2011; Akash et al., 2013; Dufey et al., 2014; Manie et al., 2014).

Diversas vias metabólicas estão envolvidas na resistência à insulina e na indução de inflamação e estresse (Hotamisligil, 2010), entre elas, as vias JNK (*JUN N-terminal kinase*) e IKKβ (*IκB kinase-β*), ambas podendo ser ativadas pelo estresse de RE (Hotamisligil, 2010) e pelo número elevado de ROS (Hurrle & Hsu, 2017). A IKKβ é uma proteína responsável por mediar a ativação de NF-κβ (*nuclear factor-κβ*), que por sua vez estimula as citocinas pró-inflamatórias, TNF-α e IL-1β, e podem inibir a fosforilação do substrato do receptor de insulina (IRS-1) ou inibir sua expressão transcricional, comprometendo a correta sinalização desta via (Tilg & Moschen, 2008; Akash et al., 2013) e levando consequentemente à resistência insulínica.

A obesidade é outro fator crítico que resulta em estresse oxidativo e resistência à insulina (Maiese, 2015), gerando uma condição inflamatória crônica no tecido adiposo, causando a liberação recorrente de citocinas pró-inflamatórias, tais como as citadas acima, além de IL-6, que em conjunto, levam gradualmente à disfunção de células β pancreáticas, diminuição da secreção de insulina e, consequentemente, à hiperglicemia e ao desenvolvimento do DM2 (Akash et al., 2013).

A longo prazo, a exposição constante a altos níveis de glicose levam as complicações micro e macrovasculares característicos do DM2, como neuropatia, retinopatia, nefropatia, doenças cardiovasculares e problemas cognitivos, sendo que mais recentemente, muitos autores têm relatado a sua associação com a doença de Alzheimer (DA), provavelmente relacionada ao avanço da doença vascular (Evans et al., 2002; Li & Hölscher, 2007; Ribe & Lovestone, 2016; Zhang et al., 2017), que culmina em maior risco destes pacientes em desenvolver DA (Ott et al., 1999; Xu et al., 2010; Cheng et al., 2012; Chatterjee & Mudher, 2018). No entanto, os mecanismos moleculares que ligam as duas patologias (DM2 e DA) ainda constituem uma incógnita.

1.3 Via de sinalização da insulina e resistência à insulina

A adequada sinalização da via da insulina é crucial para o organismo e o comprometimento desta é implicado não só no DM2, como também no câncer, doenças cardiovasculares e neurodegenerativas. O conhecimento de como as alterações nessa cascata de sinalização estão relacionadas, bem como as consequências das mesmas, torna esta via um importante alvo de estudo para a prevenção de doenças relacionadas ao processo do envelhecimento.

Em condições fisiológicas normais, o transporte de glicose para dentro da célula ocorre por meio de diferentes mecanismos de sinalização intracelulares realizados em cascata, como ilustrado na **Figura 1**. Inicialmente, a insulina secretada liga-se ao seu receptor em tecidos alvos, como músculo esquelético, fígado e tecido adiposo, promovendo o recrutamento e fosforilação de proteínas IRS (*insulin receptor substrate protein*s). A fosforilação destas em resíduos de tirosina é crítica para a sinalização da via da insulina. Fosforilação em resíduos de serina ou treonina são associados com a inibição ou mesmo degradação das proteínas IRS, culminando na regulação negativa da via e resistência à insulina. Este *feedback* negativo ocorre naturalmente por meio de enzimas induzidas pela insulina, como uma forma de manter a função apropriada de todas as proteínas envolvidas neste processo. No entanto, condições como a hiperglicemia, disfunção mitocondrial, estresse oxidativo, estresse de RE, níveis aumentados de citocinas inflamatórias e de ácidos graxos podem induzir um aumento na fosforilação em serina e/ou treonina, exacerbando a condição de resistência à insulina (Henriksen et al., 2011; Boucher et al., 2014; DeFronzo et al., 2015).

Portanto, a fosforilação em tirosina das proteínas IRS, por sua vez promove a ativação da proteína PI3K (*phosphatidylinositol 3-kinase*) (Freude et al., 2009; Murrow & Hoehn, 2010; Zhu et al., 2015), que catalisa a fosforilação de PIP2 (*phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase*) em PIP3 (*phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate*) e resulta na translocação do transportador de glicose (GLUT4) para a membrana plasmática e o transporte da glicose para dentro da célula. No entanto, altos níveis de insulina podem levar a uma sinalização alterada de PI3K, fazendo com que este fosforile a proteína RAC que induz a produção de ROS por meio de NOX4 (*NADPH oxidase 4*). A grande quantidade de ROS, por conseguinte, pode promover a redução na expressão ou mesmo degradação destes transportadores de glicose, levando à condição de resistência à insulina (Rochette et al., 2014; Hurrle & Hsu, 2017).

Adicionalmente, PI3K regula a atividade de AKT (*alpha serine/threonine-protein kinase*) (Sasaoka et al., 2006; Erneux et al., 2011), que tem papel essencial na regulação do metabolismo energético, estimulando a glicogênese por meio da inibição de GSK3 (*glycogen synthase kinase 3*) (O'Neill, 2013) e a glicólise por meio da inibição dos fatores de transcrição FOXO, que por sua vez também atuam em diferentes genes de resposta a estresse, defesa antioxidante e autofagia (Zhang et al., 2011; White, 2014).

Ainda, a quinase mTOR (*mammalian target of rapamycin*), responsável por regular o crescimento celular e metabolismo, sendo um grande sensor de nutrientes e energia celular é também alvo de AKT (Bhaskar & Hay, 2007; Kapahi et al., 2010; O'Neill, 2013) e tem sido bastante discutido devido ao seu importante papel na extensão da longevidade em alguns organismos (López-Otín et al., 2013). A proteína AMPK (*AMP-activated protein kinase*) que possui papel na glicólise, oxidação de ácidos graxos, redução de lipogênese, gliconeogênese e síntese de proteínas, por sua vez, é capaz de promover a inibição de mTOR. E a metformina, droga utilizada no controle glicêmico em diabéticos, é capaz de inibir a atividade de mTOR por meio da ativação de AMPK (Onken & Driscoll, 2010; Halicka et al., 2011; Maiese, 2015). Além disso, AMPK também tem importância na biogênese mitocondrial, ativando a PGC1α (*Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha*) (Haigis & Yankner, 2010) que tem capacidade de estimular a cadeia transportadora de elétrons da mitocôndria e suprimir os níveis de ROS, sendo essencial na indução da defesa antioxidante do organismo (St-Pierre et al., 2006; López-Otín et al., 2013).

Curiosamente, há evidências de que alterações na expressão de fatores de crescimento, proteínas IRS, IGF-1, AKT, mTOR ou outras proteínas que resultam em *downregulação* da via da insulina estão implicados no aumento da resistência ao estresse, indução de autofagia, na extensão da longevidade e redução de doenças associadas ao envelhecimento em diversas espécies (Bartke et al., 2001; Partridge et al., 2005; Colman et al., 2009; Kapahi et al., 2010; Kenyon, 2010; Onken & Driscoll, 2010; Anisimov et al., 2011; Fontana et al., 2013; López-Otín et al., 2013; Levine et al., 2014; Fontana & Partridge, 2015; Amigo et al., 2017).

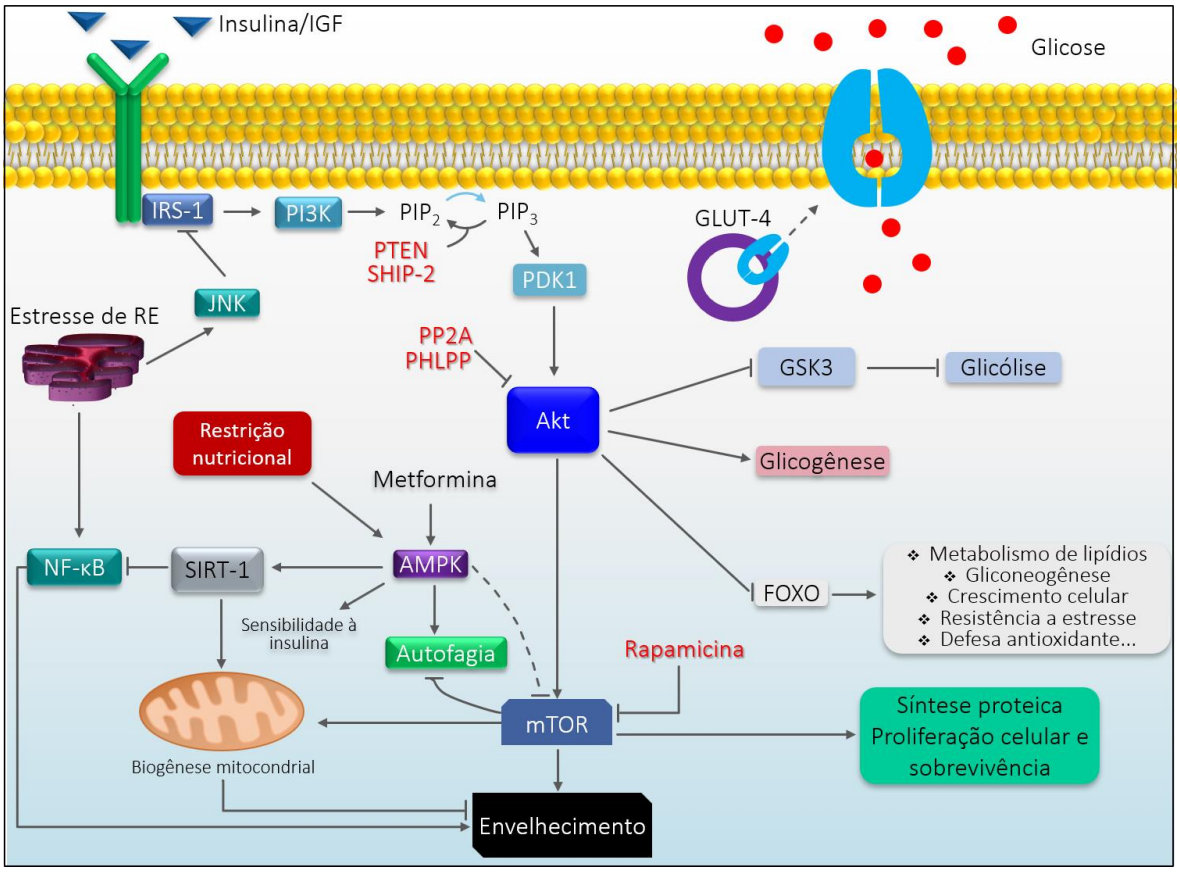

Figura 1 – Via de sinalização da insulina. Fonte: Kegg

1.4 Restrição nutricional e longevidade

Um grande número de pacientes com DM2 possui sobrepeso ou obesidade. Portanto, mudanças no estilo de vida têm se mostrado essenciais no controle dos níveis de glicose. Em particular, algumas intervenções nutricionais, tais como restrição calórica ou proteica, têm se mostrado efetivas, não apenas na redução da glicemia, mas também por exercer efeitos positivos em termos de aumentar a expectativa de vida (Fontana et al., 2010; Onken & Driscoll, 2010), e reduzir a incidência de doenças relacionadas a idade (Fontana et al., 2004; Meyer et al., 2006; Colman et al., 2014).

Há cerca de 80 anos foi demonstrado que a restrição calórica era capaz de aumentar a longevidade em ratos (McCay et al., 1935). Desde então, a busca por métodos e mecanismos que aumentem a expectativa de vida em humanos tem sido amplamente explorada em várias áreas. A restrição nutricional (RN) consiste na redução do total de calorias ingeridas ou de um nutriente específico, sem que haja o comprometimento do organismo por falta de nutrientes e/ou mal nutrição (Cantó & Auwerx, 2009; Kapahi et al., 2016). O mecanismo pelo qual a RN

atua no sentido de aumentar a longevidade ainda não está completamente elucidado, porém muitos estudos têm focado a atenção na desregulação da via da insulina, uma vez que o envelhecimento e o desenvolvimento de doenças associadas ao mesmo frequentemente vem acompanhado de comprometimento na homeostase da glicose (Lopez-Torres et al., 2002; Bjedov & Partridge, 2011; López-Otín et al., 2013; Perluigi et al., 2015; Tramutola et al., 2015).

Estudos em modelos animais sugerem que os mecanismos implicados na extensão da longevidade em decorrência da restrição nutricional possam ser modulados por diferentes vias, como a inibição da sinalização de insulina e inibição do sensor de nutrientes mTOR. Outros mecanismos envolvem a ativação do sensor de energia AMPK (Kenyon, 2010), cuja superexpressão culminou no aumento da expectativa de vida em *C. elegans* (Apfeld et al., 2004); em camundongos, com o uso da metformina, ativador de AMPK, Anisimov et al (2008) observaram um aumento de 37,8% na média da expectativa de vida desses animais.

Além disso, outras vias podem estar implicadas nas respostas à RN associada à longevidade. Foi demonstrado um aumento da expressão de SIRT1 (*NAD-Dependent Protein Deacetylase Sirtuin-1*) em camundongos submetidos à restrição calórica. SIRT1 possui papel na formação do autofagossomo. Nesse contexto, é possível que essa enzima exerça uma função importante relativa ao aumento da expectativa de vida, uma vez que com o envelhecimento ocorre declínio da atividade autofágica (Anisimov et al., 2008; Salminen & Kaarniranta, 2009; Mercken et al., 2013). A SIRT1 ainda pode promover supressão da via inflamatória de NF-κB, desacetilação dos fatores de transcrição FOXO e ativação de PGC1α (Baur et al., 2012), que também pode ser ativada via AMPK (Haigis & Yankner, 2010), com grande importância na biogênese mitocondrial e na defesa antioxidante do organismo (St-Pierre et al., 2006; López-Otín et al., 2013). Em *C. elegans* (Wang & Tissenbaum, 2006) e *Drosophila* (Rogina & Helfand, 2004), o efeito positivo da restrição calórica na longevidade é dependente de Sir2, cujo homólogo em mamíferos é a SIRT1.

Em relação a seres humanos, um grande estudo conhecido como CALERIE (*Comprehensive Assessment of Long-term Effects of Reducing Intake of Energy*) teve como objetivo mostrar os efeitos da restrição calórica em indivíduos sadios. Já foi mostrado que em um período de dois anos, este tipo de intervenção foi eficiente em melhorar a sensibilidade à insulina (Fontana et al., 2010), reduzir marcadores inflamatórios (Redman et al., 2018) e o estresse oxidativo (Il'yasova et al., 2018). Estas características estão especialmente aumentadas em pacientes com DM2, o que poderia fazer deste um importante tipo de

intervenção para estes indivíduos. Em um estudo longitudinal ao longo de 20 anos, com macacos rhesus, de um total de 38 animais analisados, 16 deles se tornaram pré-diabéticos ou diabéticos, enquanto que no grupo sob restrição calórica, nenhum animal desenvolveu qualquer distúrbio referente à regulação da glicose (Colman et al., 2009), evidenciando a possível importância desta intervenção em DM2.

Apesar de a RN ser amplamente discutida recentemente, os resultados ainda são muito controversos quanto à composição da dieta a ser utilizada. Tem sido debatido que a alta ingestão de proteínas poderia influenciar os efeitos da restrição calórica (Fontana et al., 2016). Fontana et al (2008) demonstraram que em indivíduos sadios, a restrição calórica a longo prazo não diminuiu os níveis de IGF-1 quando a quantidade de proteínas ingeridas pelos pacientes se manteve elevada durante esse tipo de intervenção. Já um outro estudo demonstrou que a restrição de proteínas se mostrou eficaz em reduzir os níveis de IGF-1, diminuir a incidência de câncer e/ou aumentar a longevidade, independentemente da quantidade de calorias consumidas (Levine et al., 2014). Em roedores, o uso de uma dieta restrita quanto ao aminoácido essencial metionina mostrou-se eficaz quanto à avaliação de parâmetros mitocondriais, quanto à redução dos níveis de formação de ROS, dano oxidativo ao mtDNA (Sanz et al., 2006) e também na diminuição dos níveis de 8-oxodG (Caro et al., 2009). Ou seja, enquanto estudos demonstram que a restrição calórica apresenta benefícios em relação à extensão da longevidade em alguns organismos, provavelmente devido à deficiência na regulação da via da insulina, outros autores contra argumentam que este tipo de restrição alimentar em seres humanos não seria tão eficaz se combinada com alto consumo de proteínas. Adicionalmente, tem sido questionado que o corte de proteínas seria mais eficiente em reduzir a sinalização da insulina e a incidência de doenças associadas ao envelhecimento (Levine et al., 2014).

Conforme exposto, os efeitos de intervenções nutricionais em seres humanos não são bem consistentes e necessitam de estudos mais aprofundados, além de uma metodologia sistemática e bem controlada. Quanto aos pacientes com DM2, esta abordagem parece fornecer benefícios muito positivos quanto ao controle dos níveis de glicose e de outros parâmetros que se encontram alterados nesses indivíduos; portanto, tal estudo mostra sua particular importância no tratamento e melhora da qualidade de vida de pacientes com DM2, sendo importante a análise de uma série de parâmetros clínicos associados a resultados de ensaios em níveis celular e molecular.

2 HIPÓTESE

A hipótese do presente trabalho é que a hiperglicemia crônica apresentada pelos pacientes com DM2 levam a alterações moleculares nas vias de sinalização da insulina, de respostas ao estresse oxidativo e nos processos de reparo do DNA. Em contrapartida, a estratégia de intervenção nutricional promove a redução de danos celulares, melhoria no controle glicêmico e lipídico relacionados à deficiência na regulação da via da insulina e redução de marcadores inflamatórios em pacientes com DM2.

OBJETIVOS

3 OBJETIVOS

O objetivo do presente projeto é avaliar os efeitos da hiperglicemia crônica em vias de sinalização molecular ligadas ao estresse oxidativo, reparo do DNA, resistência à insulina e inflamação, bem como análise do quadro de estresse oxidativo ao nível mitocondrial e no *pool* de nucleotídeos, em pacientes com DM2 avaliados antes e após uma intervenção sob restrição proteica (Grupo-01), e em pacientes DM2 portadores de hiperglicemia crônica (Grupo-02) comparados a um grupo de indivíduos não diabéticos (controles – Grupo-03)

3.1 Objetivos específicos

- Avaliar os níveis de quebras no DNA em pacientes com DM2 submetidos à restrição proteica (Grupo-01) avaliados antes e após a intervenção, e comparados com um grupo controle (Grupo-03).
- Avaliar a expressão de genes envolvidos em vias relacionadas a estresse oxidativo, resistência à insulina, reparo do DNA e inflamação em pacientes com DM2 submetidos à restrição proteica (Grupo-01), avaliados antes e após a intervenção.
- Determinar os níveis de 8-oxo-dG como marcador de estresse oxidativo no *pool* de nucleotídeos, em amostras de soro de pacientes com DM2 submetidos à restrição proteica (Grupo-01) avaliados antes e após a intervenção (comparados entre si), bem como comparados com um grupo controle (Grupo-03) e com um grupo de pacientes com DM2 os quais apresentaram hiperglicemia crônica (Grupo-02).
- Analisar os níveis de ROS total, ROS mitocondrial, potencial de membrana e massa mitocondrial em pacientes com DM2 que apresentam hiperglicemia crônica (Grupo-02) comparados a indivíduos controles (Grupo-03).

MATERIAIS E MÉTODOS

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Casuística

Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (HC-FMRP/USP), (Processos n° 747/2018 e 16286/2015; **Anexo A e Anexo** B). Todos os indivíduos participantes concordaram em participar da pesquisa e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (**Anexo C**, **Anexo** D **e Anexo** E) no qual constava todas as informações acerca do presente trabalho, da finalidade das amostras, do sigilo de suas informações e telefone para contato em caso de eventuais dúvidas.

O trabalho foi desenvolvido com três grupos de estudo: pacientes submetidos à restrição proteica (Grupo-01), pacientes com DM2 com hiperglicemia crônica (Grupo-02) e indivíduos controles sadios (Grupo-03).

Em relação ao Grupo-01, 10 pacientes foram internados durante 4 semanas submetidos a uma dieta restrita em proteínas (0,8 g/kg de peso de paciente/dia) e mantendo-se as calorias de acordo com o gasto energético basal de cada indivíduo, medido por meio de calorimetria indireta. A seleção desses pacientes bem como a internação e a composição da dieta utilizada por eles foi realizada pela Prof.ª Dr.ª Maria Cristina Foss-Freitas e do doutorando Rafael Ferraz Bannitz do departamento de Clínica Médica do HC-FMRP/USP (Endocrinologia e Metabologia). Cada indivíduo passou por uma avaliação médica detalhada antes de ser submetido à intervenção e, após a determinação do gasto energético basal individual, o paciente foi aconselhado a seguir uma dieta em casa com base no cálculo da taxa metabólica e a restrição utilizada, nos 15 dias antecedentes à internação. Em seguida, os pacientes passaram por internação durante 4 semanas, sendo coletadas amostras de sangue periférico no início (RP-I) e ao final (RP-F) deste período. As características clínicas dos mesmos encontram-se na **Tabela 1**. Foram selecionados 5 indivíduos do sexo masculino e 5 do sexo feminino, com idade entre 38 e 60 anos (média de 51,6 ± 9 anos), com índice de massa corporal média (IMC) de 29,1 ± 8,2 ao início da internação, a qual foi reduzida para 27,3 ± 7,1 após a internação; por outro lado, a média de glicemia foi 241 mg/dL ± 80,2 no início, e foi reduzida significativamente para 114 ± 35,4 ao final do período de 4 semanas, sendo que a média de hemoglobina glicada (Hb1Ac) foi 9,2% ± 1,6 no início, sendo diminuída para 8,3 ± 1,7 ao final

da hospitalização. Todos os pacientes selecionados apresentaram descontrole glicêmico, neuropatia periférica, dislipidemia e hipertensão. Cabe ressaltar que os indivíduos com nefropatia, insulino-dependentes ou doenças infecciosas foram excluídos do estudo.

Tabela 1 – Características clínicas dos pacientes submetidos à restrição de proteínas (Grupo-01).

Paciente	Sexo	Idade (anos)	IMC Inicial	IMC Final	Glic. Inicial (mg/dL)	Glic. Final (mg/dL)	Hb1Ac Inicial (%)	Hb1AC Final (%)
1•◦	M	57	20,2	20,5	356	117	8,6	7,2
2•	F	54	25,2	23,5	282	97	9,3	7,8
3•	M	45	25,8	24,5	119	76	7,1	6,3
4•▪	M	57	24,7	22,9	262	87	10,6	9,4
5•▪◦	F	38	32,3	30,9	277	117	10,7	9,1
6•▪	M	57	41,3	37,1	158	106	7,3	7,1
7•▪◦	M	35	44,9	41,2	122	82	6,8	5,7
8•▪◦	F	60	24,6	22,7	286	168	10,7	10,6
9•▪◦	F	59	21,6	21,2	250	107	10,3	10,3
10▪◦	F	54	30,4	28,7	298	183	10,1	9,5
Média ± DP	**-**	**51,6 ± 9**	**29,1 ± 8,2**	**27,3 ± 7,1****	**241 ± 80,2**	**114 ± 35,4*****	**9,2 ± 1,6**	**8,3 ± 1,7****

• Pacientes cujas amostras foram utilizadas para quantificação dos níveis de 8-oxo-dG.
▪ Pacientes cujas amostras foram utilizadas para o ensaio do Cometa.
◦ Pacientes cujas amostras foram utilizadas para a avaliação de expressão gênica.
***p*<0,01 e ****p*<0,001 indicam diferenças estatisticamente significativas quando comparados ao grupo no início da intervenção.

Em relação ao grupo de pacientes com DM2 (Grupo-02), 8 indivíduos do sexo masculino e 7 do sexo feminino, com idade entre 45 e 67 anos (média de 57,4 ± 6 anos) compuseram a amostragem deste grupo. De forma geral, alguns indivíduos apresentavam hipertensão arterial sistêmica, sendo que alguns indivíduos apresentaram sobrepeso ou obesidade leve (IMC médio de 27,3 ± 1,9). Os pacientes apresentaram glicemia no valor de 205,4 ± 77,8 mg/dL e porcentagem média de Hb1Ac de 9,6 ± 2%. As características principais desses pacientes estão representadas na **Tabela 2**. Tais indivíduos foram atendidos no ambulatório de Diabetes do HC-FMRP/USP, sendo diagnosticados com DM2 de acordo com os critérios da Associação Americana de Diabetes (possuindo níveis de glicose >126mg/dl e Hb1Ac ≥ 6,5%). Para este estudo quanto aos efeitos da hiperglicemia crônica, foram considerados os pacientes com valores de Hb1Ac acima de 7%. Todos os pacientes estavam em tratamento prévio para o DM2, principalmente com o uso de medicamentos como metformina e alguns faziam uso de insulina. Pacientes obesos, com complicações tardias do diabetes, como neuropatia

autonômica, nefropatia consolidada, insuficiência renal, retinopatia proliferativa, doenças cardíacas, depressão, doenças infecciosas, fumantes e etilistas foram excluídos do estudo.

Tabela 2 – Características clínicas de pacientes com DM2 (Grupo-02).

Paciente	Sexo	Idade	IMC	Glicemia (mg/dL)	Hb1Ac (%)	DM2 (anos)	Insulina
1	F	56	26,6	359	11,6	6	sim
2	F	64	26,6	146	7,8	6	sim
3	F	54	29,9	245	10,1	6	não
4	M	54	29,9	240	9,4	3	sim
5	F	53	24,9	193	13,4	19	sim
6	M	54	28,6	168	8,5	19	sim
7	F	64	26	130,6	7,4	10	não
8	M	62	28,6	107	8,1	14	sim
9	F	55	28	245	10,7	15	sim
10	M	62	25,9	139,6	7,8	20	sim
11	M	52	26,9	147,7	7,7	14	sim
12	M	55	29	336	12,5	21	sim
13	M	45	25,6	142	7,2	N.E.	N.E.
14	M	67	23,4	189,9	9,4	27	sim
15	F	64	29	292	12	45	sim
Média ± DP	**-**	**57,4 ± 6**	**27,3 ± 1,9****	**205,4 ± 77,8*****	**9,6 ± 2*****	**16 ± 2**	**-**

***p*<0,01 e ****p*<0,001 indicam diferenças estatisticamente significativas quando comparados ao grupo controle (Grupo-03). N.E.: não especificado.

Quanto ao grupo controle (Grupo-03), foram coletadas amostras de 13 indivíduos, sendo 8 do sexo masculino e 5 do sexo feminino, com os seguintes valores (média ± DP): idade de 57,2 ± 6,7 anos, IMC de 23,7 ± 3,3, glicemia de 95,3 ± 8 mg/dL e Hb1Ac de 5,2 ± 0,3%. O grupo foi composto por indivíduos que não possuíam histórico de exposição a radiações, medicamentos, doenças infecciosas e diabetes na família, sendo excluídos etilistas e fumantes. Além disso, foram realizados testes glicêmicos e de HbA1c para garantir que estes realmente apresentavam níveis normais (**Tabela 3**).

Tabela 3 – Características clínicas de indivíduos controles (Grupo-03).

Controles	Sexo	Idade (anos)	IMC	Glicemia (mg/dL)	Hb1Ac (%)
C01*	M	50	23,3	80	4,7
C02*	M	59	27,7	85	4,8
C03*	F	56	22,1	N.E.	5
C04*▪	M	63	22,1	99	5,5
C05*▪	M	48	27,68	88	5
C06*▪	F	52	30,8	98	5,3
C07*▪	M	63	25,5	106	5,6
C08*▪	M	56	22,2	102	5,3
C09*▪	F	57	22,1	89	5,5
C10▪	F	47	21,8	104	5
C11▪	M	59	18,5	95	5,4
C12▪	M	67	22,12	99	5,2
C13	F	67	22,48	99	5,6
Média ± DP	**-**	**57,2 ± 6,7**	**23,7 ± 3,3**	**95,3 ± 8**	**5,2 ± 0,3**

* Pacientes cujas amostras foram utilizadas para quantificação dos níveis de 8-oxo-dG.
▪ Pacientes cujas amostras foram utilizadas para o ensaio do Cometa.
N.E.: não especificado.

4.2 Coleta e separação de células mononucleares do sangue periférico

Foram coletados de cada indivíduo cerca de 20mL de sangue em tubos *Vacutainer* (*Beckton & Dickinson, EUA*), sendo três tubos contendo EDTA e um tubo sem anticoagulante. Dois tubos contendo EDTA foram utilizados para a separação de células mononucleares do sangue periférico (PBMCs), que posteriormente foram submetidas à extração de RNA e à avaliação de parâmetros mitocondriais por citometria de fluxo.

Para a separação das PBMCs, foi utilizado o método de centrifugação por gradiente de densidade utilizando-se o Histopaque 1077 (*Sigma Chemical Co, EUA*); inicialmente, o sangue foi homogeneizado com solução salina em uma proporção de 1:1. Em seguida, essa amostra foi adicionada a um tubo contendo Histopaque 1077 na mesma proporção, que foi centrifugado a 448 x *g* por 20 minutos. Logo, por gradiente de densidade, foi formado um anel de PBMCs entre o plasma e o Histopaque, que foi retirado com o auxílio de uma pipeta descartável e adicionado a outro tubo, sendo este lavado com solução salina e centrifugado à 112 x *g* por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado, e em parte das PBMCs foram adicionados 2 mL de Trizol (*Invitrogen*) para o procedimento de extração do RNA, sendo o restante do material utilizado para a análise de parâmetros mitocondriais.

4.3 Ensaio cometa em condições alcalinas

Para a detecção de danos genotóxicos foi realizado o ensaio Cometa, segundo protocolo descrito por Singh et al. (1988), nos pacientes submetidos à restrição proteica (Grupo-01) ao início (AI) e após o período de intervenção (DI), e ainda em um grupo controle (Grupo-03). Foram utilizados 50 µL de sangue total que foram homogeneizados com 400 µL de agarose de baixo ponto de fusão (0,5%), a 37°C. Em seguida, esta solução foi dispersa em lâminas contendo uma fina camada de agarose de ponto de fusão normal à 1,5%, cobertas com lamínula (24x50mm) e mantidas à 4°C por cerca de 20 minutos para a solidificação da solução. Após a retirada da lamínula, as lâminas foram imersas em solução de lise fresca (NaCl 2,5 mM, Na_2EDTA 100 mM, Tris 100 mM, DMSO 10% e Triton-X 100 1%), por pelo menos 12 horas. Para cada paciente foram preparadas duas lâminas. Após a etapa de lise, as lâminas foram incubadas em tampão de eletroforese por 20 minutos (NaOH 0,3M e Na_2EDTA 1mM, pH>13), sendo então dispersas logo após em cuba de eletroforese e submetidas à uma corrente de 25V e 300mA, por 20 minutos. Por fim, as lâminas foram imersas em tampão de neutralização por 15 minutos e fixadas com etanol absoluto por 3 minutos.

A análise das lâminas foi realizada após coloração com 50µL de SYBR Green 2X (*Sigma*), em microscópio de fluorescência Zeiss (Germany) com filtro 516-560nm acoplado à um computador utilizando-se o software *CometAssay IV* (*TriTek Corp./USA*). Foram analisadas 50 células por lâmina, sendo utilizada a porcentagem de DNA na cauda como parâmetro de análise, disponibilizado pelo software utilizado.

4.4 Extração, quantificação e avaliação de integridade de RNA

Seguido o isolamento das PBMCs ao qual foi adicionado 2 mL de Trizol até homogeneização completa das células, foram acrescidos 200 µL de salina DEPC e clorofórmio, por mL de Trizol, divulsionados com vigor por cerca de 15 segundos e então mantidos estáveis por 5 minutos. As amostras foram centrifugadas à 12000 x *g* por 15 minutos a 4°C, e então foi retirada cuidadosamente a fase aquosa contendo o RNA. Nesta, foi adicionado 800 µL de isopropanol, por mL de Trizol, homogeneizados e então mantidos a -20°C *overnight*. No dia seguinte, as amostras foram centrifugadas a 12000 x *g* por 10 minutos a 4°C, sendo o *pellet* lavado 3x com 1 mL de etanol 75% DEPC seguido de centrifugação a 7500 x *g* por 5 minutos a

4°C. Logo, após a retirada do etanol, as amostras foram mantidas a temperatura ambiente por cerca de 5 minutos e o *pellet* foi eluído em cerca de 15 µL de água *nuclease free*.

Em seguida, foi realizada a quantificação do RNA utilizando espectrofotômetro *NanoDrop ND-1000* (*Uniscience*), onde foram verificadas as razões de proteína (260/230) e fenol (260/280), apenas as amostras que apresentaram valores entre 1,8-2,2 e 1,8-2,0, respectivamente, foram utilizadas nos ensaios subsequentes.

Ainda, para verificar a integridade do RNA, foi utilizado o kit RNA 6000 Nano (*Agilent*) e análise foi realizada em um equipamento bioanalisador 2100 (*Agilent*), de acordo com o protocolo do fabricante. As amostras foram avaliadas quanto ao valor de RIN (*RNA Integrity Number*) e somente aquelas que apresentaram valores de RIN>6,0 foram utilizadas.

4.5 Reação de Transcrição Reversa

Primeiramente, o RNA foi tratado com o kit *Deoxyribonuclease I Amplification Grade* (*Invitrogen*) para a remoção de moléculas de DNA, seguindo o protocolo: 1 µg de RNA foi adicionado a 1 µL de tampão de reação 10X DNAse I e 1 µL de DNase I *Amplification Grade* (1U/µL) em um volume final de 10 µL. Em seguida as amostras ficaram por 15 minutos à temperatura ambiente, seguido de inativação da DNAse com a adição de 1 µL de 25mM de EDTA e posterior incubação a 65°C por 10 minutos. Com isso, foi realizado o passo de transcrição reversa utilizando-se o kit *Superscript® VILO™ MasterMix* (*Invitrogen*). A síntese de cDNA foi realizada com a adição de 4 µL de *SuperScript VILO MasterMix* e 6 µL de água *nuclease free* ao RNA proveniente do tratamento com a DNAse, em um volume final de reação de 20 µL. Logo, procedeu-se a incubação a 25°C por 10 minutos, a 42°C por 60 minutos, e a reação foi terminada a 85°C por 5 minutos. O produto da reação foi armazenado a -20°C para posterior uso.

Para a verificação da síntese de cDNA foi então realizada uma PCR convencional. Para tanto, foram utilizados 19,5 µL de água *nuclease* free, 2,5 µL de 10X PCR *Reaction Buffer*, 0,5 µL de dNTPs, 0,5 µL do primer TBP *forward*, 0,5 µL do primer TBP *reverse*, 0,5 µL de Taq DNA *polymerase* com $MgCL_2$ e 1 µL do cDNA resultante da etapa anterior, em um volume final de 25 µL. O programa de amplificação consistiu em uma etapa de desnaturação inicial de 5 minutos a 94°C, e 35 ciclos com desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento de 60°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 1 minuto, além uma extensão final a 72°C por 6 minutos. Os

produtos de PCR foram visualizados em gel de agarose a 1% e corado com *Gel Red* 40X (*Invitrogen*).

4.6 Avaliação da expressão gênica por qPCR em tempo real

Para a análise da expressão de genes envolvidos em vias de sinalização foram utilizadas placas customizadas *Taqman Array 96-well fast* (*Thermo Fisher*). As placas foram customizadas de forma que coubessem 3 amostras por placa, sendo analisados 28 genes para cada, os quais foram selecionados com base em suas funções biológicas relacionadas ao estresse oxidativo, resistência à insulina, inflamação e reparo do DNA. Os genes endógenos constituíram de *18s rRNA*, *GAPDH*, *GUSB* e *HPRT1*. Os genes de interesse selecionados encontram-se na **Tabela 4**. Foi utilizado o protocolo segundo as recomendações do fabricante, em que foi inicialmente preparado um mix contendo 5 µL de *Taqman® Fast Advanced Master Mix* (*Applied Biosystems*), 2 µL de água *nuclease free* e 3 µL de cDNA (1:4), em um volume final de 10 µL. O mix passou pelo *vortex* gentilmente para ser bem homogeneizado e foi centrifugado para que o líquido fosse para o fundo do tubo. As placas contendo as sondas fluorescentes, foram centrifugadas brevemente a 112 x *g* por 1 minuto, retiradas o selo e então 10 µL do mix preparado anteriormente foram adicionados a cada um dos poços da placa. Finalmente, as placas foram seladas com *MicroAmp® Optical Adhesive Film*, centrifugadas a 112 x *g* e colocadas em um termociclador *QuantStudio 3* (*Applied Biosystems*). As condições da reação foram 1 ciclo de incubação de UNG a 50°C por 2 minutos, 1 ciclo para ativação de *AmpliTaq™ Fast DNA Polymerase* a 95°C por 20 segundos, e 40 ciclos com desnaturação a 95°C por 1 segundo e anelamento/extensão a 60°C por 20 segundos.

Os endógenos *GAPDH*, *HPRT1* e *GUSB* foram utilizados para a normalização da expressão gênica, sendo o programa *ExpressionSuite*™ v1.1 (*Applied Biosystems*) e o *Relative Quantification app* (*Thermo Fisher*) foi utilizado para o cálculo da normalização e quantificação da expressão relativa gênica.

Tabela 4 – Lista de genes avaliados quanto aos níveis de expressão gênica.

Assay ID	**Gene**	**Nome do gene**
Hs99999901_s1	*18s rRNA*	-
Hs99999905_m1	*GAPDH*	*glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*
Hs99999909_m1	*HPRT*	*hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1*
Hs99999908_m1	*GUSB*	*glucuronidase beta*
Hs00175892_m1	*ATM*	*ATM serine/threonine kinase*
Hs00992123_m1	*ATR*	*ATR serine/threonine kinase*
Hs00959834_m1	*XRCC1*	*X-ray repair cross complementing 1*
Hs00213454_m1	*OGG1*	*8-oxoguanine DNA glycosylase*
Hs01014856_m1	*MUTYH*	*mutY DNA glycosylase*
Hs00167309_m1	*SOD2*	*superoxide dismutase 2, mitochondrial*
Hs00533490_m1	*SOD1*	*superoxide dismutase 1, soluble*
Hs00159343_m1	*NUDT1*	*nudix hydrolase 1*
Hs00810569_m1	*KLF6*	*Kruppel like factor 6*
Hs00196158_m1	*KRT1*	*keratin 1*
Hs01034249_m1	*TP53*	*tumor protein p53*
Hs00907957_m1	*PIK3CA*	*phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha*
Hs00173304_m1	*PPARGC1A*	*PPARG coactivator 1 alpha*
Hs00234508_m1	*MTOR*	*mechanistic target of rapamycin*
Hs01047719_m1	*GSK3B*	*glycogen synthase kinase 3 beta*
Hs00818121_m1	*FOXO3*	*forkhead box O3*
Hs01562315_m1	*PRKAA1*	*protein kinase AMP-activated catalytic subunit alpha 1*
Hs01086099_m1	*AKT2*	*AKT serine/threonine kinase 2*
Hs00234142_m1	*CCL3*	*C-C motif chemokine ligand 3*
Hs00961750_m1	*TNFRSF1B*	*TNF receptor superfamily member 1B*
Hs00236937_m1	*CXCL1*	*C-X-C motif chemokine ligand 1*
Hs01559460_m1	*IKBKB*	*inhibitor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells, kinase beta*
Hs01548508_m1	*MAPK8*	*mitogen-activated protein kinase 8*
Hs01059210_m1	*LMNB1*	*lamin B1*
Hs01007018_m1	*BECN1*	*beclin 1*
Hs00153380_m1	*CCND2*	*cyclin D2*
Hs01082394_m1	*TRIB3*	*tribbles pseudokinase 3*
Hs00153277_m1	*CDKN1B*	*cyclin dependent kinase inhibitor 1B*

4.7 Análise de 8-oxo-dG no *pool* de nucleotídeos do soro sanguíneo

A concentração de 8-oxo-dG foi avaliada com a utilização do kit de Elisa obtido da *Health Biomarkers Sweden AB*, seguindo protocolos já previamente descritos (Haghdoost et al., 2005, 2006). Brevemente, após a coleta de sangue em tubo *Vacutainer®* sem anticoagulante, as amostras foram deixadas em temperatura ambiente para a formação do coágulo e em seguida foram centrifugadas a 2000 x *g* por 10 minutos, para obtenção do soro sanguíneo. Cerca de

800 µL de soro foram purificados utilizando um método de filtragem por colunas (*Bond Elut column filtration method*), para que fossem retiradas quaisquer moléculas que pudessem interferir na reação junto ao anticorpo utilizado no ensaio.

As amostras foram filtradas 2 vezes, sendo depois submetidas à secagem em centrífuga à vácuo (*speed vac*). Em seguida, as amostras foram dissolvidas em 600 µL de PBS e 270 µL da amostra foram incubadas com o anticorpo primário por 120 min a 37°C. Para cada placa foi estabelecida uma curva padrão de concentrações de 8-oxo-dG (0,01, 0,1, 0,5, 1, 3 e 10 ng/mL), as quais também foram incubadas com anticorpo primário. Subsequentemente, 140 µL de cada amostra e das concentrações padrões de 8-oxo-dG foram adicionados em triplicata a placas de 96 poços preparadas previamente com 8-oxo-dG (*Japan Institute for the Control of Aging*) e incubadas *overnight* a 4°C.

A seguir, as placas foram lavadas com uma solução de ELISA, conjugadas com 140 µL de anticorpo secundário (*goat antimouse IgG-HRP, Scandinavian Diagnostic Services, Sweden*) e incubadas a 24°C por 2 horas. Por fim, os poços da placa foram novamente lavados, sendo o material corado com uma solução de coloração por 20 minutos a 24°C e adicionados 70 µL de 1,5M de H_3PO_4 por 3 minutos. As placas foram analisadas em um leitor de placas (*Epoch Microplate Spectrophotometer*, Biotek) em absorbância de 450nm e as concentrações de 8-oxo-dG de cada amostra foram obtidas a partir da normalização com base nas concentrações padrões estabelecidas.

4.8 Avaliação de ROS celular e mitocondrial, potencial de membrana e massa mitocondrial

Para a detecção de ROS celular e mitocondrial foram utilizados os corantes fluorescentes *DHE* (*Dihydroethidium - Thermo Fisher*) e *MitoSox Red* (*Thermo Fisher*), respectivamente. Uma vez nas células, estes são rapidamente oxidados pelo radical superóxido se tornando fluorescentes. Enquanto o *DHE* é responsável pela detecção de ROS intracelular, o *MitoSox Red* exibe afinidade apenas por mitocôndrias. Ainda, a membrana mitocondrial apresenta uma diferença de potencial elétrico entre a matriz mitocondrial e o citosol, sendo este definido como potencial de membrana da mitocôndria. A sonda *TMRM* (*Tetramethylrhodamine - Thermo Fisher*) se acumula em mitocôndrias sadias com potencial de membrana intacto exibindo intensa fluorescência. Qualquer comprometimento no potencial da membrana destas é percebido com a perda do sinal fluorescente. Por fim,

também foi utilizada a sonda *MitoTracker™ Green FM* (*Thermo Fisher*), que é capaz de se acumular na mitocôndria independentemente do potencial de membrana e assim determinar a massa mitocondrial.

Brevemente, para estas análises, o *pellet* de PBMCs foi ressuspendido em solução salina contendo 5mM de Glicose (para 2 mL de sangue, foi acrescentado 1 mL de PBS), e cerca de 10^6 células foram coradas com *Mitosox Red* (1,5 µM), *DHE* (1,5 µM), *TMRM* (40 nM) e *MitoTracker Green* (100 nM) por 30 minutos a 37°C, para a detecção de superóxido mitocondrial, intracelular, potencial de membrana e massa mitocondrial, respectivamente. Como controle positivo da reação, foi utilizado 100 µM *CCCP* (*Carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazone - Sigma*), uma droga que atua sobre a fosforilação oxidativa que ocorre nas mitocôndrias, fazendo com que haja um comprometimento no gradiente de prótons formado entre o espaço intermembrana e a matriz mitocondrial, tendo como efeito a despolarização da membrana mitocondrial, além de induzir a formação de ROS (Zhang et al., 2016b).

A análise das células foi realizada em citômetro de fluxo *Guava EasyCyte Mini System* (*Merck Millipore*) por meio da intensidade de fluorescência emitida por cada sonda, sendo utilizado o *software Guava CytoSoft 4.2.1* (*Guava Technologies*). 5000 eventos foram analisados.

4.9 Análise estatística

Os dados foram apresentados como média ± desvio padrão (DP), sendo todos os gráficos e análises realizados pelo software *GraphPad Prism v.6.01* (*GraphPad Software, Inc*). Para a caracterização dos pacientes e controles foi utilizado o teste t de Student. Para comparações dentro do Grupo-01 (antes e depois da internação) foi utilizado o teste t de amostras pareadas. Para as análises envolvendo os pacientes DM2 (Grupo-02) e controles (Grupo-03) foi utilizado o teste t para amostras não pareadas. Quando houve comparação entre 3 grupos ou mais, foi utilizado o teste One-Way ANOVA. Em todas as análises, $p<0,05$ foi considerado como valor estatisticamente significativo.

RESULTADOS

5 RESULTADOS

5.1 Caracterização dos grupos estudados

Para a caracterização dos pacientes com DM2 e indivíduos controles foram realizadas comparações com relação à idade, IMC, níveis de glicemia e HB1Ac. Foram observadas diferenças significativas quanto ao IMC (p<0,01), níveis de glicemia (p<0,001) e de Hb1Ac (p<0,01) nos pacientes DM2 após uma intervenção sob restrição proteica durante 4 semanas (**Tabela 1**). Quanto ao grupo de pacientes DM2 com hiperglicemia crônica sem intervenção, quando comparados aos indivíduos sadios, não foi observada diferença significativa com relação a idade, mas foram observadas diferenças significativas quanto ao IMC (p<0,01), glicemia (p<0,001) e Hb1Ac (p<0,001) (**Tabela 2**).

5.2 Danos no DNA

A avaliação de danos no DNA foi realizada neste estudo por meio do ensaio cometa, no qual a porcentagem de DNA na cauda é calculada de acordo com a migração de fragmentos de DNA danificados, formando uma cauda em forma de "cometa". Nesse ensaio foram avaliados os danos no DNA de 9 indivíduos controles e 7 pacientes submetidos à internação sob restrição proteica (Grupo-01), sendo as amostras de sangue coletadas no início da internação (RP-I) e ao final desta (RP-F).

A análise estatística dos dados revelou que o grupo RP-I apresentou danos no DNA significativamente maiores que os controles (4,02 ± 1,05 e 2,03 ± 0,74, respectivamente; p<0,001), e que interessantemente esses danos foram reduzidos significativamente (2,70 ± 1,46; p=0,01) ao fim de 4 semanas nos pacientes sob uma dieta com restrição de proteínas (RP-F), fazendo com que este grupo não mais apresentasse diferença estatisticamente significativa quanto aos danos, quando comparados aos indivíduos sadios (2,70 ± 1,46 e 2,03 ± 0,74, respectivamente – **Figura 2** e **Tabela 5**).

Esses resultados demonstram que em apenas 4 semanas a dieta com restrição proteica foi eficiente em reduzir significativamente os danos no DNA, provavelmente provocados pela hiperglicemia, nos pacientes diabéticos, o que corrobora os resultados clínicos quanto à melhoria metabólica dos pacientes em relação ao controle glicêmico e lipídico.

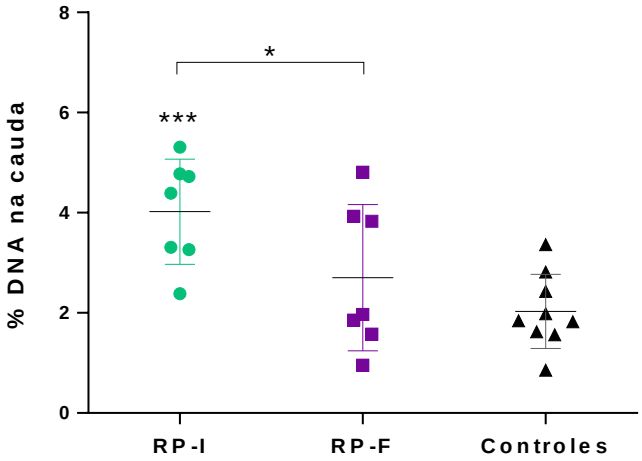

Figura 2 – Danos no DNA avaliados pelo ensaio cometa, representados como porcentagens de DNA na cauda, avaliados em amostras de sangue total de pacientes com DM2 submetidos à internação sob restrição proteica, ao início (RP-I) e final (RP-F) de 4 semanas de internação, comparados aos indivíduos do grupo controle. Valores representados como média ± DP. Análise estatística teste t para amostras pareadas (RP-I e RP-F) e de amostras não pareadas em relação aos controles. *p=0,01, ***p<0,001 indicam diferenças estatisticamente significativas quando comparado ao controle ou entre os grupos.

Tabela 5 – Porcentagens de DNA na cauda de indivíduos do Grupo-01 e do Grupo-03 representados como valores de média ± desvio padrão.

	Grupo-01 (n=7)		**Grupo-03 Controles (n=9)**
	RP-I	**RP-F**	
%DNA na cauda	4,02 ± 1,05***	2,70 ± 1,45 #	2,03 ± 0,74

***p<0,001 indicam diferenças estatisticamente significativas em comparação aos controles. #p=0,01 comparação entre os grupos ao início da restrição proteica (RP-I) e ao final (RP-F).

5.3 Avaliação da expressão gênica por qPCR

Neste trabalho foram analisados também a expressão de uma série de genes envolvidos em estresse oxidativo, resistência à insulina, inflamação e reparo do DNA nos pacientes submetidos à dieta hipoproteica. Os genes endógenos testados foram o *18s rRNA*, *GAPDH*, *GUSB* e *HPRT1*, mas devido ao fato de que o gene *18s rRNA* apresentou grande variação nos valores de expressão, este foi excluído e apenas os três últimos foram utilizados para normalização dos dados. Portanto, os valores foram expressos como quantificação relativa, após normalização com os genes endógenos *GAPDH*, *GUSB* e *HPRT1*, utilizando o programa *Relative Quantification app* (*Thermo Fisher*).

De forma geral, não houve alterações significativas nos níveis de expressão gênica transcricional dos genes estudados após o período de intervenção dos pacientes sob dieta com restrição de proteínas (**Figura 3**). Assim, esses dados indicam que o tempo de internação não foi suficiente para induzir alterações na expressão gênica. Os genes *PI3K*, *PRKAA1* e *ATM* (**Figura 3D**) apresentaram apenas uma tendência a aumento de expressão nos pacientes após as 4 semanas de internação (p=0,05; 0,06 e 0,09, respectivamente).

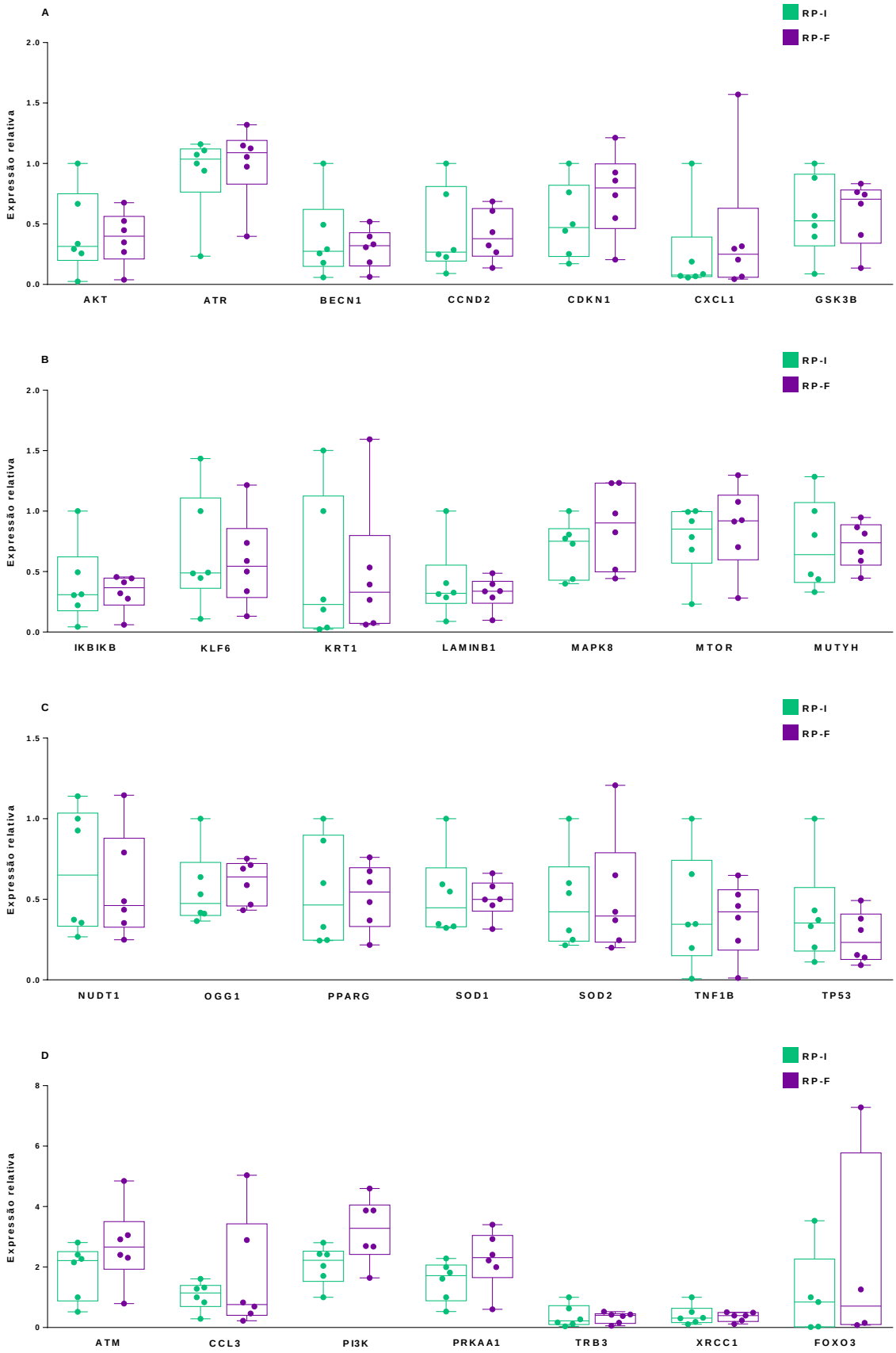

Figura 3 – Expressão relativa de genes avaliados por qRT-PCR em PBMCs de pacientes DM2 submetidos à intervenção (restrição proteica), analisados ao início (RP-I) e ao final (RP-F) de 4 semanas de internação **(A, B, C e D**). Os valores de expressão foram normalizados de acordo com a expressão dos

endógenos *GAPDH*, *GUSB* e *HPRT1*. O gráfico é apresentado na forma de mediana e o intervalo interquartil. O teste t para amostras pareadas foi utilizado para a comparação entre os grupos.

Adicionalmente, com os valores de expressão dos genes normalizados com a média dos endógenos, isto é, ΔCt, foi possível obter uma representação gráfica em forma de *clusters*, caracterizando os grupos de acordo com a similaridade na expressão relativa dos genes (**Figura 4**). Com base nesses dados, observa-se que o grupo amostral apresentou uma grande heterogeneidade quanto à expressão dos genes selecionados, o que é esperado devido a uma melhor resposta ao tratamento que alguns pacientes possuem em relação a outros. Pode-se citar que o paciente P10, por exemplo, apresentou uma grande variação na expressão de alguns genes após o período de 4 semanas sob restrição proteica. Em particular, este indivíduo mostrou uma indução de genes relacionados a reparo no DNA (*OGG1*, *MUTYH*, *SOD1*, *NUDT1* e *FOXO3*), resposta inflamatória e proliferação celular (*KLF6*) e controle do ciclo celular (*CDKN1B*) após a intervenção. Em contraste, os pacientes P5 e P8, apresentaram uma repressão dos genes *NUDT1* e *FOXO3*, sendo que o paciente P5 apresentou também repressão do gene de reparo *MUTYH* e do antioxidante *SOD2* e ainda, indução do gene de resposta a danos, *ATM*, enquanto os genes *OGG1* e *SOD1* permaneceram induzidos após o período de tratamento. Ainda, é possível observar que quatro pacientes apresentaram indução do gene *PIK3CA* após 4 semanas sob restrição proteica. Observa-se ainda, que em todos os pacientes, exceto o indivíduo P1, o gene de resposta a danos no DNA, *ATR*, se mostrou induzido. Curiosamente, o paciente P1 exibiu perfis de expressão gênica diferentes dos demais, apresentando a maior parte dos genes reprimidos, sem alterações após a internação, com exceção dos genes *MUTYH*, *NUDT1* e *FOXO3* (os quais se apresentaram induzidos), entre os 28 genes avaliados. Como característica clínica, este paciente foi o que apresentou o menor IMC dentre os pacientes avaliados, bem como o maior nível de glicemia em jejum (**Tabela 1**).

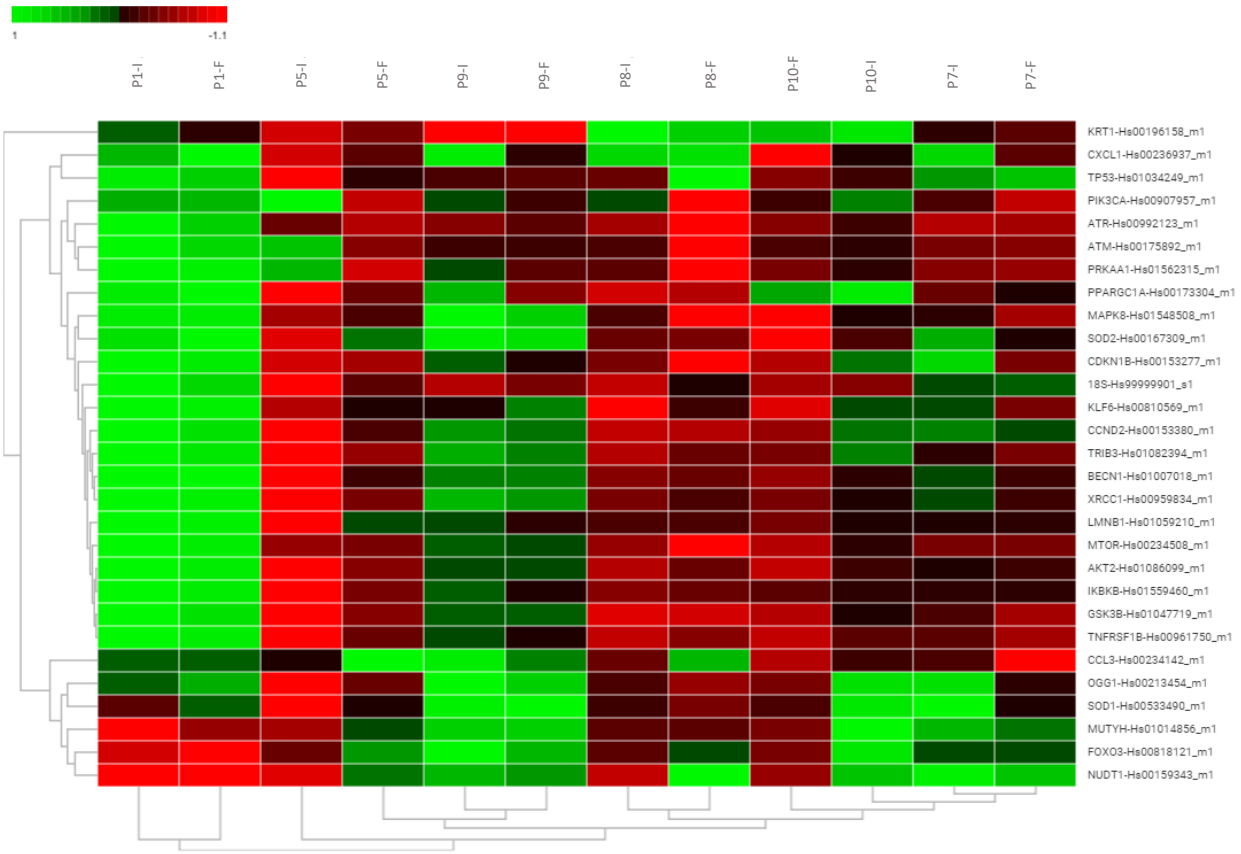

Figura 4 – *Heatmap* (agrupamento hierárquico) mostrando uma representação gráfica dos níveis de expressão gênica entre todas as amostras (colunas) para determinado gene alvo (linhas; alvos à direita). Os alvos e amostras (sendo I para início e F para final da intervenção) estão agrupados de acordo com a similaridade em termos de nível de expressão. Estas foram agrupadas utilizando a distância de Pearson com ligação média e de forma *target-centric*, ou seja, cada ponto correspondente a certo gene pode apenas ser comparado relativamente com outro ponto daquele mesmo gene. Os genes induzidos estão representados em vermelho, os genes reprimidos em verde, e os genes sem diferença na expressão em preto, sendo que maiores intensidades de cor representam maiores diferenças na intensidade de expressão.

5.4 Determinação dos níveis de 8-oxo-dG no *pool* de nucleotídeos

Para avaliar os danos oxidativos causados pelas ROS, foram avaliados os níveis da base oxidada 8-oxo-dG no *pool* de nucleotídeos. Para isso, foram utilizadas amostras de soro sanguíneo dos pacientes do Grupo-01 (n=9) avaliados ao início (RP-I) e final (RP-F) da internação, comparados ao Grupo-03 controle (n=10). Os dados mostram que não houve diferenças estatisticamente significativas quanto aos níveis de bases oxidadas apresentadas pelos pacientes na comparação entre o início e ao final de 4 semanas sob uma dieta

hipoproteica (0,69 ± 0,36 e 0,69 ± 0,28, respectivamente). No entanto, observou-se que os pacientes apresentaram uma tendência a níveis maiores de 8-oxo-dG do que os indivíduos sadios (Grupo-03) (0,69 ± 0,36, 0,69 ± 0,28 e 0,56 ± 0,16, respectivamente - **Figura 5A** e **Tabela 6**). Neste caso, apenas 4 semanas de intervenção não se mostraram suficientes para reduzir os níveis de bases oxidadas no *pool* de nucleotídeos.

Em contraste, quando comparados os níveis de 8-oxo-dG de indivíduos sadios (n=10) com indivíduos DM2 não submetidos à intervenção (Grupo-02), somados aos pacientes antes de serem submetidos à intervenção, os quais também estavam hiperglicêmicos (Grupo-01, RP-I), totalizando 17 pacientes DM2, foi observada uma diferença estatisticamente significativa entre os grupos (p<0,05), sendo o grupo DM2, o que apresentou maiores níveis dessa base oxidada no *pool* de nucleotídeos (0,76 ± 0,24; 0,56 ± 0,16 – **Figura 5B** e **Tabela 7**).

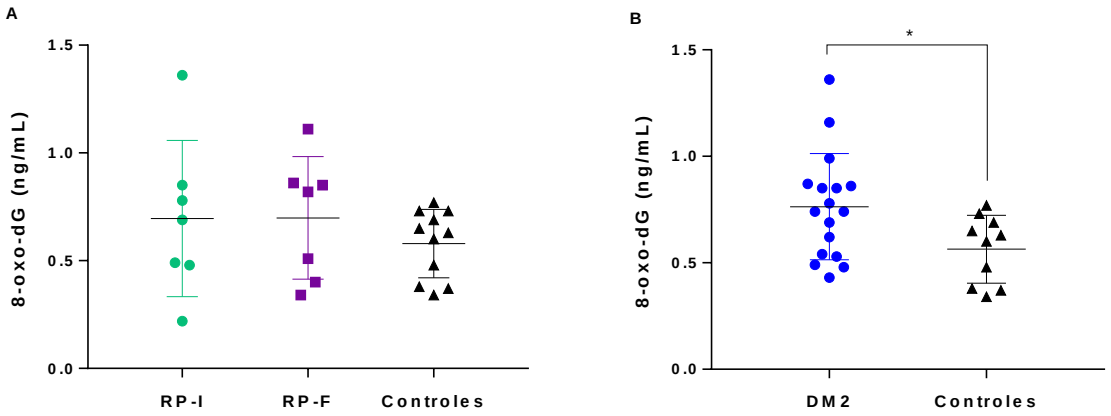

Figura 5 – Avaliação dos níveis de 8-oxo-dG. **A)** Níveis individuais de 8-oxo-dG avaliados em pacientes DM2 (Grupo-01), ao início (RP-I) e ao final (RP-F) de 4 semanas de intervenção, correspondente ao período de internação no hospital, sob regime alimentar de restrição de proteínas; os resultados foram comparados com o grupo de indivíduos sadios (controles – Grupo-03). **B)** Níveis individuais de 8-oxo-dG em amostras de soro de pacientes DM2 (Grupo-02) e de indivíduos sadios (controles – Grupo-03). Valores representados como média ± DP. *p<0,05 indica diferença estatisticamente significativa quando comparado aos controles.

Tabela 6 – Níveis de 8-oxo-dG (ng/mL) de indivíduos submetidos à restrição proteica (Grupo-01) e indivíduos controles (Grupo-03). Valores representados como média ± DP.

	Grupo-01 (n=9)		**Grupo-03 Controles (n=10)**
	RP-I	**RP-F**	
Níveis de 8-oxo-dG (ng/mL)	0,69 ± 0,36	0,69 ± 0,28	0,56 ± 0,16

Tabela 7 – Níveis de 8-oxo-dG (ng/mL) de indivíduos DM2 (Grupo-02) e indivíduos controles (Grupo-03). Valores representados como média ± DP.

	Grupo-02 (n=17)	**Grupo-03 (n=10)**
Níveis de 8-oxo-dG (ng/mL)	0,76 ± 0,24*	0,56 ± 0,16

*p<0,05 quando comparado ao grupo controle.

5.5 Determinação de parâmetros mitocondriais

Para a quantificação das análises relativas às mitocôndrias, primeiramente a população de PBMCs, majoritariamente linfócitos e monócitos, foi ajustada no citômetro de fluxo de acordo com suas características morfológicas de tamanho e granulosidade por meio do *side* e *forward scatter*. Em cada análise, foi utilizado um controle sem o reagente para o cálculo de autofluorescência das células, sendo que a intensidade de fluorescência média utilizada nas análises foi calculada subtraindo-se a fluorescência obtida por células não coradas em cada uma das amostras. Um total de 5000 eventos foram analisados por amostra.

De modo geral, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas quando comparados os pacientes com DM2 aos indivíduos controles em nenhum dos parâmetros mitocondriais analisados (**Figura 6**). Quando comparado a massa mitocondrial desses dois grupos, é possível observar apenas uma leve tendência dos pacientes DM2 possuírem massa mitocondrial reduzida em relação aos indivíduos sadios (25,70 ± 8,25 vs 36,96 ± 17,05, respectivamente; **Figura 6D e Tabela 8**).

Para garantir a sensibilidade do ensaio foi utilizado um controle positivo, o *CCCP*, uma droga que atua sobre a fosforilação oxidativa nas mitocôndrias, tendo como efeito a despolarização da membrana mitocondrial, além de induzir a formação de ROS. Com isso é possível observar diferença estatisticamente significativa entre o controle positivo e cada um dos grupos (o grupo de pacientes DM2 e grupo controle, induzindo a produção de ROS mitocondrial, intracelular e despolarização da membrana (**Figura 6A**, **B** e **C** e **Tabela 8**). Entretanto, não houve efeitos dessa droga sobre a massa mitocondrial, como é constatado pela diferença não significativa entre os grupos analisados e o *CCCP* (**Figura 6D** e **Tabela 8**).

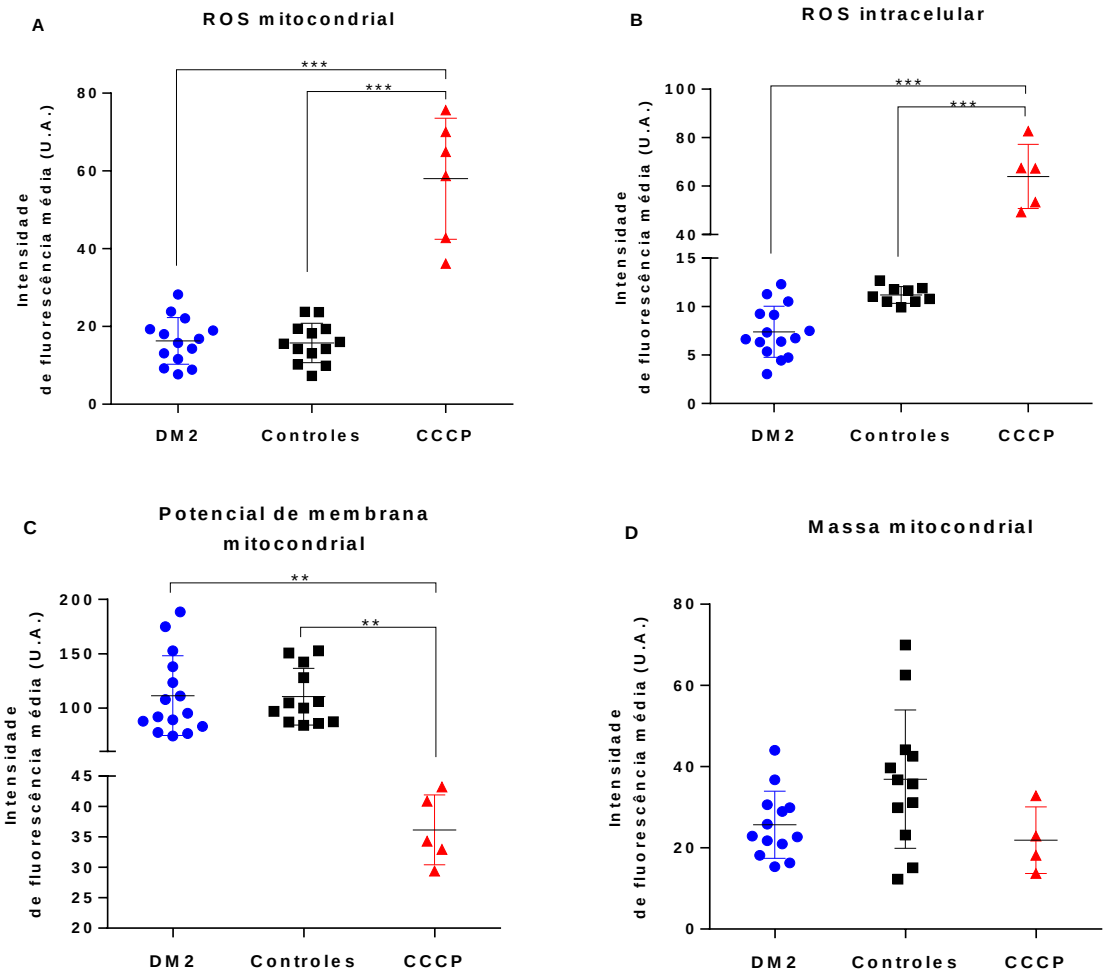

Figura 6 – Análise de parâmetros mitocondriais em PBMCs de pacientes com DM2 (Grupo-02) e indivíduos sadios (Grupo-03). **A)** Quantificação de ROS mitocondrial analisado pela intensidade de fluorescência média (IFM) emitida por *MitoSox Red*. **B)** Quantificação de ROS celular medido pela intensidade de fluorescência média analisado pelo *DHE*. **C)** Determinação do potencial de membrana mitocondrial avaliado pela IFM do *TMRM*. **D)** Avaliação da massa mitocondrial pela IFM do *MitoTracker Green*. Foi utilizado como controle positivo 100µM de *CCCP*. Os valores são representados como média ± desvio padrão. ***p*<0,01; ****p*<0,0001.

Tabela 8 – Determinação de parâmetros mitocondriais em pacientes com DM2 (Grupo-02) e indivíduos controles (Grupo-03). Valores representados como média ± desvio padrão.

Parâmetros mitocondriais	Grupo-02 DM2 (n=15)	Grupo-03 Controles (n=13)	CCCP
ROS mitocondrial	16,28 ± 5,9***	15,78 ± 5,07***	58,03 ± 15,57
ROS intracelular	7,40 ± 2,63***	11,21 ± 0,86***	63,99 ± 13,25
Potencial de membrana mitocondrial	111,4 ± 36,63***	110,5 ± 26,03***	36,16 ± 5,73
Massa mitocondrial	25,70 ± 8,25	36,96 ± 17,05	21,91 ± 8,21

****p*<0,001 quando comparado ao controle positivo *CCCP*.

DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

O diabetes constitui um problema de saúde mundial. Atualmente, o tratamento desta doença é realizado com a utilização de medicamentos visando principalmente a redução e o controle dos níveis de glicose no sangue, na tentativa de prevenir uma série de alterações no metabolismo celular. Por conta da hiperglicemia crônica, os pacientes com DM2 desenvolvem diversas complicações decorrentes da doença, o que os fazem necessitar de cada vez mais medicamentos para o tratamento de retinopatias, doenças cardiovasculares, renais, dentre outras. O sucesso destes tratamentos, no entanto, é bem limitado, sendo necessário e recomendável que os pacientes adotem outras medidas de intervenção (como por exemplo, intervenção nutricional e atividade física regular, principalmente) relacionadas ao estilo de vida dos pacientes.

A maior parte dos pacientes com DM2 apresenta idade entre 40 e 59 anos de idade, a qual é crítica para a doença (IDF, 2015); nessa fase, da mesma forma que nos estágios subsequentes, com a progressão do processo de envelhecimento, a homeostase proteica se torna cada vez mais comprometida, acompanhada também por uma redução na eficiência do sistema de reparo do DNA e do sistema antioxidante, além do organismo como um todo, consequentemente levando ao acúmulo de danos celulares e, conforme destacado anteriormente, moleculares (Haigis & Yankner, 2010; Kenyon, 2010; Hipp et al., 2014; Madabhushi et al., 2014). Indivíduos com DM2, especialmente aqueles com hiperglicemia crônica, possuem altos níveis de ROS em seu corpo, o que os torna muito suscetíveis ao acúmulo de danos causados pelo estresse oxidativo, que é um dos fatores que culminam na resistência insulínica. Além disso, a maioria desses indivíduos apresenta obesidade, que contribui significativamente para o declínio metabólico e avanço da doença.

Intervenções nutricionais têm sido bastante estudadas, principalmente em relação à melhoria na qualidade de vida dos indivíduos. Em pacientes com DM2, este tipo de intervenção se mostra ainda mais essencial. Estudos têm mostrado que uma moderada a alta ingestão de proteínas leva a um maior risco de mortalidade por diabetes. Uma possível explicação é que ao receberem o diagnóstico de diabetes, alguns indivíduos mudam erroneamente a dieta, consistindo em alta ingestão de proteínas, e reduzida quantidade de carboidratos e gorduras (Levine et al., 2014). Em contraste, tem sido sugerido que a redução

no consumo de proteínas seria mais eficiente em reduzir os níveis de IGF-1 e a incidência de doenças humanas associadas ao envelhecimento, mas ainda não existem dados consistentes.

Neste trabalho, 10 indivíduos foram submetidos à RN por 4 semanas em uma dieta controlada com ingestão de 0,8 gramas de proteína por kg do paciente por dia. É importante ressaltar que a RN consiste na restrição de calorias ou de nutrientes específicos, sem que haja mal nutrição do organismo. Nesse contexto, os indivíduos avaliados neste estudo obtiveram uma dieta controlada pelos pesquisadores, sendo mantidos sob hospitalização durante todo o período de intervenção. Desta forma, foram avaliados os efeitos da dieta com restrição em proteínas (ao início e ao final de um período de 4 semanas) nos níveis de danos no DNA, em marcadores de estresse oxidativo e na expressão de genes de células mononucleares do sangue periférico de indivíduos com diabetes tipo 2.

Por meio do ensaio cometa, conhecido por detectar danos no DNA em células individuais, foi realizada uma análise em pacientes com DM2 antes e ao final de um período de internação sob intervenção com uma dieta com restrição proteica. Foi observado que nesses indivíduos houve uma redução significativa de danos no DNA ao final do período de intervenção (internação durante 4 semanas), condizente com a melhoria no controle glicêmico e lipídico desses indivíduos. Já foi demonstrado que pacientes com DM2 possuem maiores níveis de dano no DNA do que indivíduos sem a doença e que o controle hiperglicêmico nesses pacientes é essencial para a redução desses danos decorrentes dos altos níveis de glicose no sangue. No presente grupo de pesquisa, Xavier e colaboradores (2014) já demonstraram anteriormente que uma semana de tratamento controlado no intuito de reduzir os níveis de glicemia se mostrou suficiente para reduzir os danos no DNA, havendo tendência a alcançar níveis próximos aos dos indivíduos sadios. Em (2006), Heilbronn e colaboradores também mostraram que após um período de 6 meses sob RN, os danos no DNA se mostraram reduzidos.

No presente estudo, após 4 semanas sob intervenção nutricional, os níveis de danos no DNA de pacientes com DM2 reduziram significativamente, sendo que após o período de tratamento, estes indivíduos não apresentaram danos estatisticamente significativos quando comparados aos indivíduos sadios (p>0,05).

Alguns autores têm estudado intervenções nutricionais em seres humanos (Hammer et al., 2008; Fontana et al., 2016; Il'yasova et al., 2018). Porém, são estudos de seguimento por anos, em que os indivíduos são recomendados a seguir uma dieta específica em casa e os

próprios sujeitos devem relatar todos os dados nutricionais e dietéticos em programas de computador, sendo avaliados periodicamente com exames clínicos para verificar a eficácia da dieta recomendada. Nesse tipo de trabalho, a vantagem é que é possível a inclusão de um grande número de indivíduos no grupo amostral, mas a desvantagem é a falta de controle do pesquisador sobre a intervenção em si e assim, sobre os dados gerados. O diferencial do presente estudo, no entanto, é que os indivíduos foram mantidos sob internação no hospital em um período de 4 semanas, sob uma dieta altamente controlada pelos investigadores, onde foram calculados todos os nutrientes necessários para cada paciente, com a possibilidade de verificar o seguimento correto pelos mesmos. Por ficarem hospitalizados, é um estudo difícil de ser conduzido, requerendo total atenção dos pesquisadores, além da disponibilidade de tempo dos pacientes de ficarem 4 semanas sob hospitalização.

Após o período de internação, foi possível observar melhoras no controle glicêmico dos indivíduos, bem como perda de peso, características estas bem marcantes em pacientes com DM2. Não há estudos em seres humanos mostrando os efeitos de uma restrição de proteínas em um ambiente controlado sobre a expressão de genes. Visto que foi sugerido que os efeitos da RN não seriam tão eficientes se a ingestão de proteínas fosse alta (Levine et al., 2014) e que pacientes com DM2 possuem altos níveis de danos no DNA, sendo estes reduzidos significativamente após o tratamento, seria interessante assim analisar os efeitos que essa intervenção teria sobre a expressão de diversos genes relacionados ao estresse oxidativo, reparo do DNA, inflamação e resistência à insulina após 4 semanas sob restrição proteica. Foram avaliados então 6 pacientes com DM2, ao início e ao final da internação; no entanto, não foram observadas alterações significativas na expressão gênica de nenhum dos genes analisados. Houve apenas uma tendência a um aumento na expressão dos genes *PI3K* (p=0,05), *PRKAA1* (p=0,06) e *ATM* (p=0,09) nos pacientes após o período de intervenção.

O gene *PIK3CA*, codifica a proteína PI3K que, como mencionado anteriormente tem importante papel na regulação dos transportadores de glicose GLUT4, promovendo a translocação destes para a membrana plasmática e permitindo a passagem da glicose para dentro das células. Além disso, tem importante função na ativação de AKT que por sua vez exerce diferentes funções. O gene *PRKAA1* codifica a proteína AMPK, que por sua vez pode ser ativada pela metformina, droga utilizada pelos pacientes com DM2 para controle glicêmico. É possível que este medicamento tenha influenciado a expressão deste gene. Ainda, *ATM*, é um gene de resposta a danos no DNA, cuja ativação irá sinalizar uma cascata de

proteínas (TP53, CHK1 (*checkpoint kinase 1*), CHK2 (*checkpoint kinase 2*), histona H2AX, entre outras) envolvidas no processo de reparo do DNA, parada do ciclo celular e apoptose (Roy et al., 2018).

Ainda, com relação ao estudo de expressão gênica, os resultados analisados por agrupamento hierárquico (*heatmap*) indicam algumas características observáveis entre os pacientes no grupo amostrado. Primeiramente, é notável uma grande variação nos perfis de expressão entre os pacientes, muito provavelmente devida à heterogeneidade da amostra, refletindo a heterogeneidade entre os pacientes, os quais são provenientes de diversos estados do país, com alimentação regional diferenciada, além de apresentarem diferentes graus da doença, bem como alguns indivíduos com obesidade. Além disso, variações genéticas individuais podem ter sido responsáveis pelas diferenças nas respostas à intervenção observadas em cada um dos pacientes quanto à expressão transcricional dos 28 genes avaliados. A partir disso, foram relatadas muitas variações na expressão gênica. O paciente P10, por exemplo, mostrou indução de genes relacionados a reparo do DNA (*OGG1*, *MUTYH*, *SOD1*, *NUDT1* e *FOXO3*), resposta inflamatória e proliferação celular (*KLF6*) e controle do ciclo celular (*CDKN1B*) após o período de intervenção. Os genes *OGG1*, *MUTYH* e *NUDT1*, estão principalmente relacionados a reparo de dano oxidativo, como as lesões ocasionadas pela 8-oxoG. *NUDT1* tem sua importância por codificar a enzima MUTH1 envolvida principalmente na remoção de bases oxidadas do *pool* de nucleotídeos. Além disso, *SOD1* tem papel na regulação dos níveis de ROS (Fortini et al., 2003b; Kremer et al., 2004; Almeida & Sobol, 2007). É relevante notar que a dieta com restrição de proteínas induziu a expressão de genes com papel no controle do estresse oxidativo neste paciente. Se mantido esse padrão, seria um importante tipo de intervenção no controle da doença. Ainda, cabe ressaltar que este paciente teve uma ótima resposta e melhora quanto à redução de peso e nos níveis de Hb1Ac.

Em contraste, o paciente P5 apresentou uma repressão dos genes *MUTYH*, *NUDT1,* do antioxidante *SOD2* e *FOXO3*, e indução do gene de resposta a danos *ATM* após a RN. Enquanto os genes *OGG1* e *SOD1* permaneceram induzidos tanto ao início como ao final do período de tratamento. Visto que genes responsáveis pela remoção de bases oxidadas (*MUTYH* e *NUDT1*), e de reguladores de ROS mitocondrial (*SOD2*) estão reprimidos, bem como o gene de resposta a danos se mostrou induzido, é possível que a resposta a danos oxidativos tenha melhorado após o período de intervenção, porém, um estudo mais aprofundado se faz necessário.

Além disso, foi observado que em todos os pacientes, exceto o paciente P1, o gene *ATR* se mostrou induzido. Seria interessante uma melhor avaliação do perfil gênico transcricional aliado a parâmetros clínicos desse paciente.

Ainda não há grandes estudos em seres humanos sob RN relatando alterações de expressão em genes relacionados a resposta a danos e reparo do DNA. Portanto, cabe ressaltar a importância deste trabalho nessa área. É provável que um tempo maior de intervenção controlada em pacientes com DM2 reflita em alterações significativas na expressão de variados genes. No entanto, seria desejável um maior número de indivíduos amostrados.

Há evidências de que o estresse oxidativo provoca o aumento da oxidação da base guanina no DNA, sendo esta a lesão oxidativa mais estudada, ainda que espécies reativas também atuem em outras bases. A 8-oxo-dG é uma molécula formada pela interação do radical OH^- com a base no DNA ou com o nucleotídeo guanina no *pool* de nucleotídeos. O estresse oxidativo é comumente avaliado indiretamente a partir dos danos causados por oxidação, preferivelmente do que pela detecção em si das ROS. A 8-oxo-dG, ao ser detectada pela enzima hMTH1, desfosforilada e liberada para o meio extracelular, pode por exemplo assim ser detectada por ensaios como o ELISA ou por cromatografia líquida de alta performance em soro sanguíneo ou urina, sendo este um marcador para avaliar o grau de estresse oxidativo naquele organismo (Haghdoost et al., 2006).

O *pool* de nucleotídeos representa também um importante alvo de estudo, uma vez que bases oxidadas incorporadas erroneamente no DNA durante o processo normal de duplicações podem levar a transversões. Ainda, foi sugerido que os nucleotídeos seriam mais acessíveis à oxidação pelas ROS, do que o próprio DNA envolvido pela cromatina, e que as modificações mais significativas ocorreriam no *pool* de nucleotídeos. Concentrações elevadas de bases oxidadas no *pool* de nucleotídeos podem sugerir que uma grande quantidade de danos podem ser gerados no DNA (Rai, 2010).

No presente trabalho, nos pacientes submetidos à restrição proteica, os níveis de 8-oxo-dG não variaram entre o início e final da internação, sugerindo que o período de 4 semanas foi suficiente para melhorar os níveis glicêmicos desses pacientes, mas não foi suficiente para reduzir os níveis desse marcador de estresse oxidativo no *pool* de nucleotídeos. Um trabalho similar com 46 indivíduos com sobrepeso seguindo RN por 6 meses, porém em casa, também não encontrou diferenças significativas quanto a este marcador de estresse oxidativo após o

período de intervenção (Meydani et al., 2011). Outro estudo utilizando proteínas carboniladas como marcador de estresse oxidativo, também não encontrou diferenças significativas após um período de intervenção de 6 meses (Heilbronn et al., 2006). É possível que um controle de dieta mais prolongado e controlado, concomitante com o controle glicêmico dos indivíduos com DM2 possa exercer efeitos mais marcantes na redução dos níveis de bases oxidadas no *pool* de nucleotídeos. Como visto em um estudo longitudinal com indivíduos não obesos, um período de 2 anos sob RN foi capaz de reduzir os níveis do marcador de estresse oxidativo, F2-isoprostanes (Il'yasova et al., 2018; Redman et al., 2018). Vale salientar que o controle da dieta realmente apresentou benefícios evidentes na redução da glicemia neste trabalho e em outros (Heilbronn et al., 2006; Hammer et al., 2008; Meydani et al., 2011), havendo expectativa de que as complicações da doença possam ser retardadas ou ter seu progresso mais lento, sendo assim, um controle nutricional iniciado bem precocemente pode representar um importante fator no controle do DM2. Como exemplo, foi relatado que os pacientes submetidos a uma dieta hipoproteica, relataram uma melhora na acuidade visual, uma vez que grande parte dos indivíduos com DM2, devido as complicações microvasculares da doença, possuem problemas de visão, muitas vezes evoluindo para cegueira (Fong et al., 2004).

Além disso, foram avaliados os efeitos da hiperglicemia crônica nos níveis de 8-oxo-dG em pacientes DM2 não submetidos a nenhum tipo de intervenção, sendo também realizadas algumas análises quantitativas para estudar o estresse oxidativo ao nível mitocondrial.

Neste estudo, foi observado que pacientes com DM2 apresentaram níveis elevados de 8-oxo-dG quando comparados aos controles. Estudos similares também relataram que pacientes com DM2 possuem níveis maiores de 8-oxo-dG (Sun et al., 2015).

O aumento dessas bases oxidadas no pool de nucleotídeos pode ser devido à redução na eficiência dos mecanismos de resposta a danos no DNA. O BER ineficiente pode fazer com que a lesão provocada pela 8oxoG provoque uma quebra na fita do DNA, uma vez que inicialmente a enzima OGG1, excisa a base, mas depende de outros passos subsequentes que levem à inserção da nova base correta na cadeia de DNA. Ainda, pode ocorrer a persistência de bases oxidadas em consequência da expressão reduzida de *MTH1*, visto que a enzima tem a função de remover essas bases oxidadas do *pool* de nucleotídeos e assim, impedir a incorporação destas durante a duplicação do DNA (Rai et al., 2009). Ainda, foi relatado que os níveis de bases oxidadas se encontram aumentadas inclusive em pacientes pré-diabéticos, sugerindo a

associação da hiperglicemia, mesmo que ainda em níveis não tão aumentados quanto em DM2, com o aumento do estresse oxidativo (Al-Aubaidy & Jelinek, 2011).

Quanto às analises ao nível mitocondrial, é bem descrito na literatura que as mitocôndrias são a principal fonte de ROS, e que a hiperglicemia aumenta a produção de espécies reativas podendo resultar em disfunção mitocondrial. É relatado que os altos níveis de glicose no sangue atuam como indutores do metabolismo da glicose pelas mitocôndrias, sobrecarregando a cadeia transportadora de elétrons e ocasionando alterações no potencial de membrana dessas organelas (Shah et al., 2013; Yu et al., 2006). Yu e colaboradores (2006) observaram em seu estudo que a morfologia das mitocôndrias sofre mudanças rápidas e dinâmicas ao serem expostas a ambiente com altas concentrações de glicose. Bhansali e colaboradores (2017) relataram em seu estudo que pacientes com pré-diabetes apresentavam uma massa mitocondrial maior, sugerindo que o aumento inicial nos níveis de glicemia poderia induzir uma resposta adaptativa no sentido de aumentar a biogênese mitocondrial para manter a homeostase do organismo e talvez prevenir ou reduzir a progressão do DM2. Tais resultados são associados com um aumento na mitofagia nestes pacientes, levantando evidências de que durante o estado de pré-diabetes pode ocorrer eliminação de mitocôndrias comprometidas na tentativa de diminuir o estresse oxidativo mitocondrial.

No presente estudo não foram observadas diferenças significativas quanto aos níveis de ROS e potencial de membrana mitocondrial. Uma possível explicação é que o ensaio utilizando *MitoSox* Red é responsável pela detecção apenas do radical superóxido, que por sua vez é removido do organismo pela atividade da SOD. Em indivíduos com DM2, já foi relatado um aumento na atividade desse antioxidante (Bandeira et al., 2012). É possível, portanto, que o aumento de SOD nesses pacientes tenha reduzido os níveis do radical superóxido, mas não significa no entanto, que estes não tenham concentrações aumentadas de ROS. Cabe ressaltar que deve ser considerado para esse tipo de estudo, a análise conjunta com outros marcadores de estresse oxidativo.

Em relação a massa mitocondrial, houve uma tendência dos pacientes com DM2 possuírem uma massa reduzida, o que corroboraria com dois estudos similares (Widlansky et al., 2010; Bhansali et al., 2017), que relataram que em um grupo de 27 e 20 pacientes com DM2, condição em que ocorre exposição crônica à hiperglicemia, as mitocôndrias se encontram hiperpolarizadas e com massa reduzida. Além disso, foi possível observar que

houve bastante variação nos níveis relacionados a esses parâmetros tanto nos indivíduos com DM2 como nos controles, o que pode ter sido causado pelo número de amostras analisadas. Ainda, há que considerar o nível de gravidade da doença e os critérios de inclusão dos pacientes amostrados em ambos os estudos, além das condições técnicas experimentais que podem ter influenciado os resultados. Mas sem dúvida, um número elevado de indivíduos amostrados é desejável e poderia fornecer dados reprodutíveis.

Quanto aos níveis de ROS, no presente estudo, não foram observadas diferenças significativas com relação ao ROS mitocondrial entre os grupos estudados utilizando a sonda fluorescente *MitoSox Red*. Um estudo composto por 20 indivíduos DM2 comparados a indivíduos sadios, revelou um aumento estatisticamente significativo nos níveis de ROS (p<0,05) (Bhansali et al., 2017), e outro trabalho utilizando apenas 8 pacientes DM2 e 6 controles, encontraram também níveis aumentados de ROS nos pacientes (p=0,01) (Widlansky et al., 2010). Entretanto, ambos estudos relataram o uso de 5 µM do reagente *MitoSox Red* e posterior lavagem e re-incubação em novo meio de cultivo; segundo alguns autores, essa metodologia torna a quantificação de ROS inespecífica, uma vez que a lavagem causaria uma redistribuição do MitoSox fora das mitocôndrias e a alta concentração poderia comprometer a função mitocondrial (Polster et al., 2014; Roelofs et al., 2015).

Neste trabalho, houve o cuidado quanto ao uso correto da sonda, e foram utilizados uma concentração de 1,5 µM, com o intuito de não tornar a quantificação de ROS superestimada. Sendo assim, é reforçada a importância de uma metodologia sensível e específica, cujos resultados sejam consistentes e reprodutíveis. Ainda, há que considerar também a influência do número de amostras, sendo desejável um maior número de pacientes, o que deverá ser alcançado para a publicação dos dados.

CONCLUSÕES

7 CONCLUSÕES

A internação dos pacientes com DM2 durante 4 semanas submetidos a uma dieta com restrição de proteínas foi eficaz em reduzir os níveis de danos no DNA. No entanto, não foram observadas alterações significativas na expressão transcricional de genes relacionados a reparo de DNA, resposta a danos, inflamação e resistência à insulina. Apesar disso, foi interessante notar a indução de genes relacionados a reparo do DNA e resposta a danos em alguns indivíduos, o que pode sugerir que um maior número amostral aliado a um período de intervenção maior possa apresentar resultados importantes demonstrando o potencial desse tipo de abordagem em pacientes com DM2. Ainda, os níveis de bases oxidadas no *pool* de nucleotídeos não foram afetados após 4 semanas de RN, porém, foi observado que pacientes com DM2 possuem níveis aumentados de 8-oxo-dG quando comparados aos indivíduos sadios.

Quanto às análises referentes ao estudo do estresse oxidativo nas mitocôndrias, estas não mostraram diferenças significativas em relação aos níveis de ROS, potencial de membrana e massa mitocondrial entre os pacientes com DM2 quando comparados aos indivíduos sadios. É importante ressaltar que para o estudo do estresse oxidativo, análises conjuntas com diversos marcadores de estresse oxidativo devem ser utilizados.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

Akash, M. S. H.; Rehman, K.; Chen, S. Role of inflammatory mechanisms in pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 114, n. 3, p. 525–531, 2013.

Al-Aubaidy, H. A.; Jelinek, H. F. Oxidative DNA damage and obesity in type 2 diabetes mellitus. **European Journal of Endocrinology**, v. 164, n. 6, p. 899–904, 2011.

Ali, O. Genetics of type 2 diabetes. **World Journal of Diabetes**, v. 4, n. 4, p. 114, 2013.

Almeida, K. H.; Sobol, R. W. A unified view of base excision repair: Lesion-dependent protein complexes regulated by post-translational modification. **DNA Repair**, v. 6, n. 6, p. 695–711, 2007.

Amigo, I.; Menezes-Filho, S. L.; Luevano-Martinez, L. A.; Chausse, B.; Kowaltowski, A. J. Caloric restriction increases brain mitochondrial calcium retention capacity and protects against excitotoxicity. **Aging Cell**, v. 16, n. 1, p. 73–81, 2017.

Anisimov, V. N.; Berstein, L. M.; Egormin, P. A.; Piskunova, T. S.; Popovich, I. G.; Zabezhinski, M. A.; Tyndyk, M. L.; Yurova, M. V.; Kovalenko, I. G.; Poroshina, T. E.; Semenchenko, A. V. Metformin slows down aging and extends life span of female SHR mice. **Cell Cycle**, v. 7, n. 17, p. 2769–2773, 2008.

Anisimov, V. N.; Berstein, L. M.; Popovich, I. G.; Zabezhinski, M. A.; Egormin, P. A.; Piskunova, T. S.; Semenchenko, A. V.; Tyndyk, M. L.; Yurova, M. N.; Kovalenko, I. G.; Poroshina, T. E. If started early in life, metformin treatment increases life span and postpones tumors in female SHR mice. **Aging**, v. 3, n. 2, p. 148–157, 2011.

Apfeld, J.; O'Connor, G.; McDonagh, T.; DiStefano, P. S.; Curtis, R. The AMP-activated protein kinase AAK-2 links energy levels and insulin-like signals to lifespan in C. elegans. **Genes and Development**, v. 18, n. 24, p. 3004–3009, 2004.

Bandeira, S. DE M.; Guedes, G. DA S.; Fonseca, L. J. S. DA; Pires, A. S.; Gelain, D. P.; Moreira, J. C. F.; Rabelo, L. A.; Vasconcelos, S. M. L.; Goulart, M. O. F. Characterization of Blood Oxidative Stress in Type 2 Diabetes Mellitus Patients: Increase in Lipid Peroxidation and SOD Activity. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2012, p. 1–13, 2012.

Bartke, A.; Wright, J. C.; Mattison, J. A.; Ingram, D. K.; Miller, R. A.; Roth, G. S. Longevity: Extending the lifespan of long-lived mice. **Nature**, v. 414, n. 6862, p. 412–412, 2001.

Basile, K. J.; Johnson, M. E.; Xia, Q.; Grant, S. F. A. Genetic susceptibility to type 2 diabetes and obesity: follow-up of findings from genome-wide association studies. **International journal of endocrinology**, v. 2014, p. 769671, 2014.

Baur, J. A.; Ungvari, Z.; Minor, R. K.; Le Couteur, D. G.; De Cabo, R. Are sirtuins viable targets for improving healthspan and lifespan? **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 11, n. 6, p. 443–461, 2012.

Bhansali, S.; Bhansali, A.; Walia, R.; Saikia, U. N.; Dhawan, V. Alterations in mitochondrial oxidative stress and mitophagy in subjects with prediabetes and type 2 diabetes mellitus. **Frontiers in Endocrinology**, v. 8, n. DEC, 2017.

Bhaskar, P. T.; Hay, N. The Two TORCs and Akt. **Developmental Cell**, v. 12, n. 4, p. 487–502, 2007.

Bjedov, I.; Partridge, L. A longer and healthier life with TOR down-regulation: genetics and drugs. **Biochemical Society transactions**, v. 39, n. 2, p. 460–5, 2011.

Blake, R.; Trounce, I. A. Mitochondrial dysfunction and complications associated with diabetes. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, v. 1840, n. 4, p. 1404–1412, 2014.

Blasiak, J.; Arabski, M.; Krupa, R.; Wozniak, K.; Zadrozny, M.; Kasznicki, J.; Zurawska, M.; Drzewoski, J. DNA damage and repair in type 2 diabetes mellitus. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 554, n. 1–2, p. 297–304, 2004.

Bloomgarden, Z. T. American Diabetes Association Annual Meeting, 1997. Type 2 diabetes. **Diabetes care**, v. 20, n. 11, p. 1791–5, 1997.

Boucher, J.; Kleinridders, A.; Kahn, C. R. Insulin Receptor Signaling in Normal. **Cold Spring Harb Perspect Biol 2014**, v. 6, p. a009191, 2014.

Cantó, C.; Auwerx, J. Caloric restriction, SIRT1 and longevity. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, v. 20, n. 7, p. 325–331, 2009.

Caro, P.; Gomez, J.; Sanchez, I.; Naudi, A.; Ayala, V.; López-Torres, M.; Pamplona, R.; Barja, G. Forty percent methionine restriction decreases mitochondrial oxygen radical production and leak at complex I during forward electron flow and lowers oxidative damage to proteins and mitochondrial DNA in rat kidney and brain mitochondria. **Rejuvenation research**, v. 12, n. 6, p. 421–434, 2009.

Chambers, J. C.; Loh, M.; Lehne, B.; Drong, A.; Kriebel, J.; Motta, V.; Wahl, S.; Elliott, H. R.; Rota, F.; Scott, W. R.; Zhang, W.; Tan, S.; Campanella, G.; Chadeau-Hyam, M.; Yengo, L.; Richmond, R. C.; Rozario, M. A.; Tarantini, L.; Abbott, J.; Ala-Korpela, M.; Albetti, B.; Ammerpohl, O.; Bertazzi, P. A.; Relton, C. L.; Froguel, P.; Soong, R.; Vineis, P.; Jarvelin, M.; Scott, J.; Grallert, H.; Bollati, V.; Elliott, P.; Mccarthy, M. I.; Kooner, J. S. Epigenome-wide association of DNA methylation markers in peripheral blood from Indian Asians and Europeans with incident type 2 diabetes : a nested case-control study. **Lancet Diabetes Endocrinol**, v. 3, n. 7, p. 526–34, 2015.

Chatterjee, S.; Mudher, A. Alzheimer's Disease and Type 2 Diabetes: A Critical Assessment of the Shared Pathological Traits. **Frontiers in Neuroscience**, v. 12, p. 383, 2018.

Cheng, G.; Huang, C.; Deng, H.; Wang, H. Diabetes as a risk factor for dementia and mild cognitive impairment: a meta-analysis of longitudinal studies. **Internal Medicine Journal**, v. 42, n. 5, p. 484–491, 2012.

Colman, R. J.; Anderson, R. M.; Johnson, S. C.; Kastman, E. K.; Kosmatka, K. J.; Beasley, T. M.; Allison, D. B.; Cruzen, C.; Simmons, A.; Kemnitz, J. W.; Weindruch, R. Caloric restriction delays disease onset and mortalilty in rhesus monkeys. **Science**, v. 325, n. 5937, p. 201–204, 2009.

Colman, R. J.; Beasley, T. M.; Kemnitz, J. W.; Johnson, S. C.; Weindruch, R.; Anderson, R. M. Caloric restriction reduces age-related and all-cause mortality in rhesus monkeys. **Nature Communications**, v. 5, p. 3557, 2014.

De La Monte, S. M.; Wands, J. R. Alzheimer ' s Disease Is Type 3 Diabetes — Evidence Reviewed. **Diabetes Technology Society**, v. 2, n. 6, p. 1101–1113, 2008.

DeFronzo, R. A.; Ferrannini, E.; Groop, L.; Henry, R. R.; Herman, W. H.; Holst, J. J.; Hu, F. B.; Kahn, C. R.; Raz, I.; Shulman, G. I.; Simonson, D. C.; Testa, M. A.; Weiss, R. Type 2 diabetes mellitus. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 1, p. 15019, 2015.

Dodson, M.; Darley-Usmar, V.; Zhang, J. Cellular metabolic and autophagic pathways: Traffic control by redox signaling. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 63, p. 207–221, 2013.

Donath, M. Y.; Shoelson, S. E. Type 2 diabetes as an inflammatory disease. **Nature Reviews Immunology**, v. 11, n. 2, p. 98–107, 2011.

Dufey, E.; Sepulveda, D.; Rojas-Rivera, D.; Hetz, C. Cellular Mechanisms of Endoplasmic Reticulum Stress Signaling in Health and Disease. 1. An overview. **AJP: Cell Physiology**, v. 307, n. 7, p. C582–C594, 2014.

Erneux, C.; Edimo, W. E.; Deneubourg, L.; Pirson, I. SHIP2 multiple functions: A balance between a negative control of PtdIns(3,4,5)P3 level, a positive control of PtdIns(3,4)P2 production, and intrinsic docking properties. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 112, n. 9, p. 2203–2209, 2011.

Evans, J. L.; Goldfine, I. D.; Maddux, B. A.; Grodsky, G. M. Oxidative stress and stress-activated signaling pathways: A unifying hypothesis of type 2 diabetes. **Endocrine Reviews**, v. 23, n. 5, p. 599–622, 2002.

Fogarty, M. P.; Cannon, M. E.; Vadlamudi, S.; Gaulton, K. J.; Mohlke, K. L. Identification of a Regulatory Variant That Binds FOXA1 and FOXA2 at the CDC123/CAMK1D Type 2 Diabetes GWAS Locus. **PLoS Genetics**, v. 10, n. 9, p. e1004633, 2014.

Fong, D. S.; Aiello, L.; Gardner, T. W.; King, G. L.; Blankenship, G.; Cavallerano, J. D.; Ferris, F. L.; Klein, R. Retinopathy in Diabetes. **Diabetes Care**, v. 27, n. Supplement 1, p. S84–S87, 2004.

Fonseca, S. G.; Gromada, J.; Urano, F. Endoplasmic reticulum stress and pancreatic beta-cell death. **Trends Endocrinol Metab**, v. 22, n. 7, p. 266–274, 2011.

Fontana, L.; Meyer, T. E.; Klein, S.; Holloszy, J. O. Long-term calorie restriction is highly effective in reducing the risk for atherosclerosis in humans. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 17, p. 6659–63, 2004.

Fontana, L.; Weiss, E. P.; Villareal, D. T.; Klein, S.; Holloszy, J. O. Long-term effects of calorie or protein restriction on serum IGF-1 and IGFBP-3 concentration in humans. **Aging Cell**, v. 7, n. 5, p. 681–687, 2008.

Fontana, L.; Villareal, D. T.; Das, S. K.; Smith, S. R.; Meydani, S. N.; Pittas, A. G.; Klein, S.; Bhapkar, M.; Rochon, J.; Ravussin, E.; Holloszy, J. O.; CALERIE Study Group. Effects of 2-year calorie restriction on circulating levels of IGF-1, IGF-binding proteins and cortisol in nonobese men and women: a randomized clinical trial. **Aging Cell**, v. 15, n. 1, p. 22–27, 2016.

Fontana, L.; Klein, S.; Holloszy, J. O. Effects of long-term calorie restriction and endurance exercise on glucose tolerance, insulin action, and adipokine production. **AGE**, v. 32, n. 1, p. 97–108, 2010.

Fontana, L.; Partridge, L. Promoting health and longevity through diet: From model organisms to humans. **Cell**, v. 161, n. 1, p. 106–118, 2015.

Fontana, L.; Partridge, L.; Longo, V. D. D. Extending healthy lifespan - from yeast to humans. **Science**, v. 328, n. 5976, p. 321–326, 2013.

Fortini, P.; Pascucci, B.; Parlanti, E.; D'Errico, M.; Simonelli, V.; Dogliotti, E. 8-Oxoguanine DNA damage: at the crossroad of alternative repair pathways. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 531, n. 1, p. 127–139, 2003a.

Fortini, P.; Pascucci, B.; Parlanti, E.; D'Errico, M.; Simonelli, V.; Dogliotti, E. 8-Oxoguanine DNA damage: At the crossroad of alternative repair pathways. **Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 531, n. 1–2, p. 127–139, 2003b.

Haghdoost, S.; Czene, S.; Näslund, I.; Skog, S.; Harms-Ringdahl, M. Extracellular 8-oxo-dG as a sensitive parameter for oxidative stress in vivo and in vitro. **Free radical research**, v. 39, n. 2, p. 153–162, 2005.

Haghdoost, S.; Sjölander, L.; Czene, S.; Harms-Ringdahl, M. The nucleotide pool is a significant target for oxidative stress. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 41, n. 4, p. 620–626, 2006.
Haigis, M. C.; Yankner, B. A. The Aging Stress Response. **Molecular Cell**, v. 40, n. 2, p. 333–344, 2010.

Halicka, H. D.; Zhao, H.; Li, J.; Traganos, F.; Zhang, S.; Lee, M.; Darzynkiewicz, Z. Genome protective effect of metformin as revealed by reduced level of constitutive DNA damage signaling. **Aging**, v. 3, n. 10, p. 1028–1038, 2011.

Hammer, S.; Snel, M.; Lamb, H. J.; Jazet, I. M.; Van Der Meer, R. W.; Pijl, H.; Meinders, E. A.; Romijn, J. A.; De Roos, A.; Smit, J. W. A. Prolonged Caloric Restriction in Obese Patients With

Type 2 Diabetes Mellitus Decreases Myocardial Triglyceride Content and Improves Myocardial Function. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 52, n. 12, p. 1006–1012, 2008.

Heilbronn, L. K.; De Jonge, L.; Frisard, M. I.; DeLany, J. P.; Larson-Meyer, D. E.; Rood, J.; Nguyen, T.; Martin, C. K.; Volaufova, J.; Most, M. M.; Greenway, F. L.; Smith, S. R.; Deutsch, W. A.; Williamson, D. A.; Ravussin, E.; Pennington CALERIE Team, FOR THE. Effect of 6-Month Calorie Restriction on Biomarkers of Longevity, Metabolic Adaptation, and Oxidative Stress in Overweight Individuals. **JAMA**, v. 295, n. 13, p. 1539, 2006.

Henriksen, E. J.; Diamond-Stanic, M. K.; Marchionne, E. M. Oxidative stress and the etiology of insulin resistance and type 2 diabetes. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 51, n. 5, p. 993–999, 2011.

Hipp, M. S.; Park, S.-H.; Hartl, F. U. Proteostasis impairment in protein-misfolding and -aggregation diseases. **Trends in Cell Biology**, v. 24, n. 9, p. 506–514, 2014.

Hotamisligil, G. S. Endoplasmic Reticulum Stress and the Inflammatory Basis of Metabolic Disease. **Cell**, v. 140, n. 6, p. 900–917, 2010.

Hurrle, S.; Hsu, W. H. The etiology of oxidative stress in insulin resistance. **Biomedical Journal**, v. 40, n. 5, p. 257–262, 2017.

Il'yasova, D.; Fontana, L.; Bhapkar, M.; Pieper, C. F.; Spasojevic, I.; Redman, L. M.; Das, S. K.; Huffman, K. M.; Kraus, W. E.; CALERIE Study Investigators. Effects of 2 years of caloric restriction on oxidative status assessed by urinary F2-isoprostanes: The CALERIE 2 randomized clinical trial. **Aging Cell**, v. 17, n. 2, p. e12719, 2018.

International Diabetes Federation. **IDF Diabetes Atlas**. 8th. ed. Brussels, Belgium: International Diabetes Federation, 2017.

Kapahi, P.; Chen, D.; Rogers, A. N.; Katewa, S. D.; Li, P. W. L.; Thomas, E. L.; Kockel, L. With TOR, less is more: A key role for the conserved nutrient-sensing TOR pathway in aging. **Cell Metabolism**, v. 11, n. 6, p. 453–465, 2010.

Kapahi, P.; Kaeberlein, M.; Hansen, M. Dietary restriction and lifespan: Lessons from invertebrate models. **Ageing Research Reviews**, 2016.

Kenyon, C. J. The genetics of ageing. **Nature**, v. 467, n. 7315, p. 622–622, 2010.

Kremer, T. M.; Rinne, M. L.; Xu, Y.; Chen, X. M.; Kelley, M. R. Protection of pulmonary epithelial cells from oxidative stress by hMYH adenine glycosylase. **Respiratory Research**, v. 5, p. 1–11, 2004.

Kwak, S. H.; Park, K. S. Recent progress in genetic and epigenetic research on type 2 diabetes. **Experimental & molecular medicine**, v. 48, n. 3, p. e220, 2016.

Leibowitz, G.; Cerasi, E.; Ketzinel-Gilad, M. The role of mTOR in the adaptation and failure of

B-cells in type 2 diabetes. **Diabetes, Obesity and Metabolism**, v. 10, p. 157–169, 2008.

Levine, M. E.; Suarez, J. A.; Brandhorst, S.; Balasubramanian, P.; Cheng, C. W.; Madia, F.; Fontana, L.; Mirisola, M. G.; Guevara-Aguirre, J.; Wan, J.; Passarino, G.; Kennedy, B. K.; Wei, M.; Cohen, P.; Crimmins, E. M.; Longo, V. D. Low protein intake is associated with a major reduction in IGF-1, cancer, and overall mortality in the 65 and younger but not older population. **Cell Metabolism**, v. 19, n. 3, p. 407–417, 2014.

Li, L.; Hölscher, C. Common pathological processes in Alzheimer disease and type 2 diabetes: A review. **Brain Research Reviews**, v. 56, n. 2, p. 384–402, 2007.

Liemburg-Apers, D. C.; Willems, P. H. G. M.; Koopman, W. J. H.; Grefte, S. Interactions between mitochondrial reactive oxygen species and cellular glucose metabolism. **Archives of Toxicology**, v. 89, n. 8, p. 1209–1226, 2015.

López-Otín, C.; Blasco, M. A.; Partridge, L.; Serrano, M.; Kroemer, G. The hallmarks of aging. **Cell**, v. 153, n. 6, 2013.

Lopez-Torres, M.; Gredilla, R.; Sanz, A.; Barja, G. Influence of aging and long-term caloric restriction on oxygen radical generation and oxidative DNA damage in rat liver mitochondria. **Free Radic Biol Med**, v. 32, n. 9, p. 882–889, 2002.

Ma, R. C. W.; Hu, C.; Tam, C. H.; Zhang, R.; Kwan, P.; Leung, T. F.; Thomas, G. N.; Jia, W.; et al. Genome-wide association study in a Chinese population identifies a susceptibility locus for type 2 diabetes at 7q32 near PAX4. **Diabetologia**, v. 56, n. 6, p. 1291–1305, 2013.

Madabhushi, R.; Pan, L.; Tsai, L. H. DNA damage and its links to neurodegeneration. **Neuron**, v. 83, n. 2, p. 266–282, 2014.

Maiese, K. New insights for oxidative stress and diabetes mellitus. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2015, n. Dm, p. 46–49, 2015.

Manie, S. N.; Lebeau, J.; Chevet, E. Cellular Mechanisms of Endoplasmic Reticulum Stress Signaling in Health and Disease. 3. Orchestrating the unfolded protein response in oncogenesis: an update. **AJP: Cell Physiology**, v. 307, n. 10, p. C901–C907, 2014.

McCay, C. M.; Crowell, M. F.; Maynard, L. A. The Effect of Retarded Growth upon the Length of Life Span and upon the Ultimate Body Size. **The Jounal of Nutrition**, v. 10, n. 1, p. 63–79, 1935.

Mercken, E. M.; Crosby, S. D.; Lamming, D. W.; JeBailey, L.; Krzysik-Walker, S.; Villareal, D. T.; Capri, M.; Franceschi, C.; Zhang, Y.; Becker, K.; Sabatini, D. M.; De Cabo, R.; Fontana, L. Calorie restriction in humans inhibits the PI3K/AKT pathway and induces a younger transcription profile. **Aging cell**, v. 12, n. 4, p. 645–51, 2013.

Meydani, M.; Das, S.; Band, M.; Epstein, S.; Roberts, S. The effect of caloric restriction and glycemic load on measures of oxidative stress and antioxidants in humans: results from the

CALERIE Trial of Human Caloric Restriction. **The journal of nutrition, health & aging**, v. 15, n. 6, p. 456–60, 2011.

Meyer, T. E.; Kovács, S. J.; Ehsani, A. A.; Klein, S.; Holloszy, J. O.; Fontana, L. Long-Term Caloric Restriction Ameliorates the Decline in Diastolic Function in Humans. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 47, n. 2, p. 398–402, 2006.

Murrow, B. A.; Hoehn, K. L. Mitochondrial regulation of insulin action. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 42, n. 12, p. 1936–1939, 2010.

O'Neill, C. PI3-kinase/Akt/mTOR signaling: Impaired on/off switches in aging, cognitive decline and Alzheimer's disease. **Experimental Gerontology**, v. 48, n. 7, p. 647–653, 2013.

Onken, B.; Driscoll, M. Metformin induces a dietary restriction-like state and the oxidative stress response to extend C. elegans healthspan via AMPK, LKB1, and SKN-1. **PLoS ONE**, v. 5, n. 1, 2010.

Ott, A.; Stolk, R. P.; Van Harskamp, F.; Pols, H. A.; Hofman, A.; Breteler, M. M. Diabetes mellitus and the risk of dementia: The Rotterdam Study. **Neurology**, v. 53, n. 9, p. 1937–42, 1999.

Partridge, L.; Piper, M. D. W.; Mair, W. Dietary restriction in Drosophila. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 126, n. 9 SPEC. ISS., p. 938–950, 2005.

Perluigi, M.; Di Domenico, F.; Butterfield, D. A. mTOR signaling in aging and neurodegeneration: At the crossroad between metabolism dysfunction and impairment of autophagy. **Neurobiology of Disease**, v. 84, p. 39–49, 2015.

Polster, B. M.; Nicholls, D. G.; Ge, S. X.; Roelofs, B. A. **Use of potentiometric fluorophores in the measurement of mitochondrial reactive oxygen species**. 1. ed. [s.l.] Elsevier Inc., 2014. v. 547, 2014.

Rai, P.; Onder, T. T.; Young, J. J.; McFaline, J. L.; Pang, B.; Dedon, P. C.; Weinberg, R. A. Continuous elimination of oxidized nucleotides is necessary to prevent rapid onset of cellular senescence. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 1, p. 169–174, 2009.

Rai, P. Oxidation in the nucleotide pool, the DNA damage response and cellular senescence: Defective bricks build a defective house. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 703, n. 1, p. 71–81, 2010.

Redman, L. M.; Smith, S. R.; Burton, J. H.; Martin, C. K.; Il'yasova, D.; Ravussin, E. Metabolic Slowing and Reduced Oxidative Damage with Sustained Caloric Restriction Support the Rate of Living and Oxidative Damage Theories of Aging. **Cell Metabolism**, v. 27, n. 4, p. 805–815.e4, 2018.

Ribe, E. M.; Lovestone, S. Insulin signalling in Alzheimer's disease and diabetes: from epidemiology to molecular links. **Journal of Internal Medicine**, v. 280, n. 5, p. 430–442, 2016.

Rochette, L.; Zeller, M.; Cottin, Y.; Vergely, C. Diabetes, oxidative stress and therapeutic strategies. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, v. 1840, n. 9, p. 2709–2729, 2014.

Rochette, L.; Zeller, M.; Cottin, Y.; Vergely, C. Redox Functions of Heme Oxygenase-1 and Biliverdin Reductase in Diabetes. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, v. 29, n. 2, p. 74–85, 2018.

Roelofs, B. A.; Ge, S. X.; Studlack, P. E.; Polster, B. M. Low micromolar concentrations of the superoxide probe MitoSOX uncouple neural mitochondria and inhibit complex IV. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 86, p. 250–258, 2015.

Rogina, B.; Helfand, S. L. Sir2 mediates longevity in the fly through a pathway related to calorie restriction. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 101, n. 45, p. 15998–16003, 2004.

Roy, S.; Roy, S.; Rana, A.; Akhter, Y.; Hande, M. P.; Banerjee, B. The role of p38 MAPK pathway in p53 compromised state and telomere mediated DNA damage response. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 836, p. 89–97, 2018.

Salminen, A.; Kaarniranta, K. SIRT1: Regulation of longevity via autophagy. **Cellular Signalling**, v. 21, n. 9, p. 1356–1360, 2009.

Sangsuwan, T.; Haghdoost, S. The Nucleotide Pool, a Target for Low-Dose γ-Ray-Induced Oxidative Stress. **Radiation Research**, v. 170, n. 6, p. 776–783, 2008.

Sanz, A.; Caro, P.; Ayala, V.; Portero-Otin, M.; Pamplona, R.; Barja, G. Methionine restriction decreases mitochondrial oxygen radical generation and leak as well as oxidative damage to mitochondrial DNA and proteins. **The FASEB journal**, v. 20, n. 8, p. 1064–1073, 2006.

Sasaoka, T.; Wada, T.; Tsuneki, H. Lipid phosphatases as a possible therapeutic target in cases of type 2 diabetes and obesity. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 112, n. 3, p. 799–809, 2006.

Shah, G. N.; Morofuji, Y.; Banks, W. A.; Price, T. O. High glucose-induced mitochondrial respiration and reactive oxygen species in mouse cerebral pericytes is reversed by pharmacological inhibition of mitochondrial carbonic anhydrases: Implications for cerebral microvascular disease in diabetes. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 440, n. 2, p. 354–358, 2013.

Singh, N. P.; McCoy, M. T.; Tice, R. R.; Schneider, E. L. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Experimental Cell Research**, v. 175, n. 1, p. 184–191, 1988.

Sladek, R.; Rocheleau, G.; Rung, J.; Dina, C.; Shen, L.; Serre, D.; Boutin, P.; Vincent, D.; Belisle, A.; Hadjadj, S.; Balkau, B.; Heude, B.; Charpentier, G.; Hudson, T. J.; Montpetit, A.; Pshezhetsky, A. V.; Prentki, M.; Posner, B. I.; Balding, D. J.; Meyre, D.; Polychronakos, C.; Froguel, P. A genome-wide association study identifies novel risk loci for type 2 diabetes. **Nature**, v. 445, n.

7130, p. 881–885, 2007.

St-Pierre, J.; Drori, S.; Uldry, M.; Silvaggi, J. M.; Rhee, J.; Jäger, S.; Handschin, C.; Zheng, K.; Lin, J.; Yang, W.; Simon, D. K.; Bachoo, R.; Spiegelman, B. M. Suppression of Reactive Oxygen Species and Neurodegeneration by the PGC-1 Transcriptional Coactivators. **Cell**, v. 127, n. 2, p. 397–408, 2006.

Sun, J.; Lou, X.; Wang, H.; Sollazzo, A.; Harms-Ringdahl, M.; Skog, S.; He, E.; Haghdoost, S. Serum 8-hydroxy-2′-deoxyguanosine (8-oxo-dG) levels are elevated in diabetes patients. **International Journal of Diabetes in Developing Countries**, v. 35, n. 3, p. 368–373, 2015.

Tilg, H.; Moschen, A. Inflammatory Mechanisms in the Regulation of Insulin Resistance. **Molecular Medicine**, v. 14, n. 3–4, p. 222–231, 2008.

Tramutola, A.; Triplett, J. C.; Di Domenico, F.; Niedowicz, D. M.; Murphy, M. P.; Coccia, R.; Perluigi, M.; Allan Butterfield, D. Alteration of mTOR signaling occurs early in the progression of Alzheimer disease (AD): Analysis of brain from subjects with pre-clinical AD, amnestic mild cognitive impairment and late-stage AD. **Journal of Neurochemistry**, v. 133, n. 5, p. 739–749, 2015.

Wang, Y.; Tissenbaum, H. A. Overlapping and distinct functions for a Caenorhabditis elegans SIR2 and DAF-16/FOXO. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 127, n. 1, p. 48–56, 2006.

Wen, X.; Wu, J.; Wang, F.; Liu, B.; Huang, C.; Wei, Y. Deconvoluting the role of reactive oxygen species and autophagy in human diseases. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 65, p. 402–410, 2013.

White, M. F. IRS2 integrates insulin/IGF1 signalling with metabolism, neurodegeneration and longevity. **Diabetes, Obesity and Metabolism**, v. 16, p. 4–15, 2014.

Widlansky, M. E.; Wang, J.; Shenouda, S. M.; Hagen, T. M.; Smith, A. R.; Kizhakekuttu, T. J.; Kluge, M. A.; Weihrauch, D.; Gutterman, D. D.; Vita, J. A. Altered mitochondrial membrane potential, mass, and morphology in the mononuclear cells of humans with type 2 diabetes. **Translational Research**, v. 156, n. 1, p. 15–25, 2010.

Xavier, D. J.; Takahashi, P.; Manoel-Caetano, F. S.; Foss-Freitas, M. C.; Foss, M. C.; Donadi, E. A.; Passos, G. A.; Sakamoto-Hojo, E. T. One-week intervention period led to improvements in glycemic control and reduction in DNA damage levels in patients with type 2 diabetes mellitus. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v. 105, n. 3, p. 356–363, 2014.

Xu, W.; Caracciolo, B.; Wang, H.-X.; Winblad, B.; Backman, L.; Qiu, C.; Fratiglioni, L. Accelerated Progression From Mild Cognitive Impairment to Dementia in People With Diabetes. **Diabetes**, v. 59, n. 11, p. 2928–2935, 2010.

Yu, T.; Robotham, J. L.; Yoon, Y. Increased production of reactive oxygen species in hyperglycemic conditions requires dynamic change of mitochondrial morphology. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n.

8, p. 2653–8, 2006.

Zhang, J.; Wang, X.; Vikash, V.; Ye, Q.; Wu, D.; Liu, Y.; Dong, W. ROS and ROS-Mediated Cellular Signaling. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2016, n. Figure 1, p. 4350965, 2016a.
Zhang, J.; Chen, C.; Hua, S.; Liao, H.; Wang, M.; Xiong, Y.; Cao, F. An updated meta-analysis of cohort studies: Diabetes and risk of Alzheimer's disease. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v. 124, p. 41–47, 2017.

Zhang, X.; Tang, N.; Hadden, T. J.; Rishi, A. K. Akt, FoxO and regulation of apoptosis. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research**, v. 1813, n. 11, p. 1978–1986, 2011.

Zhang, Y.-Q.; Shen, X.; Xiao, X.-L.; Liu, M.-Y.; Li, S.-L.; Yan, J.; Jin, J.; Gao, J.-L.; Zhen, C.-L.; Hu, N.; Zhang, X.-Z.; Tai, Y.; Zhang, L.-S.; Bai, Y.-L.; Dong, D.-L. Mitochondrial uncoupler carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone induces vasorelaxation without involving K_{ATP} channel activation in smooth muscle cells of arteries. **British Journal of Pharmacology**, v. 173, n. 21, p. 3145–3158, 2016b.

Zhu, A. N.; Yang, X. X.; Sun, M. Y.; Zhang, Z. X.; Li, M. Associations between INSR and MTOR polymorphisms in type 2 diabetes mellitus and diabetic nephropathy in a Northeast Chinese Han population. **Genetics and Molecular Research**, v. 14, n. 1, p. 1808–1818, 2015.

ANEXOS

ANEXOS

Anexo A – Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa do HCRP (Processo 747/2018)

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

FMRP-USP
RIBEIRÃO PRETO

Ribeirão Preto, 21 de março de 2018.

Ofício nº 780/2018
CEP/MGV

PROCESSO HCRP nº 747/2018

Prezadas Pesquisadoras,

O trabalho intitulado **"INFLUÊNCIA DA HIPERGLICEMIA CRÔNICA NOS PERFIS DE EXPRESSÃO GÊNICA E ESTUDO DO ESTRESSE OXIDATIVO EM PACIENTES COM DIABETES MELLITUS TIPO 2" – Projeto de Pesquisa Versão 2 - 23/02/2018,** foi analisado pelo Comitê de Ética em Pesquisa, em sua 466ª Reunião Ordinária realizada em 19/03/2018, e enquadrado na categoria: **APROVADO,** bem como o TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – PARTICIPANTE DA PESQUISA Versão 1 – 20/02/2018 e TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – CONTROLES Versão 2 – 20/02/2018.

De acordo com Carta Circular nº 003/2011/CONEP/CNS, datada de 21/03/2011, o sujeito de pesquisa ou seu representante, quando for o caso, deverá rubricar todas as folhas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE – apondo sua assinatura na última do referido Termo; o pesquisador responsável deverá da mesma forma, rubricar todas as folhas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE – apondo sua assinatura na última página do referido Termo.

Este Comitê segue integralmente a Conferência Internacional de Harmonização de Boas Práticas Clínicas (IGH-GCP), bem como a Resolução nº 466/2012 CNS/MS.

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

Atenciosamente,

DRA MARCIA GUIMARÃES VILLANOVA
COORDENADORA DO COMITÊ DE ÉTICA EM
PESQUISA DO HCRP E DA FMRP-USP

Ilustríssimas Senhoras
JESSICA ELLEN BARBOSA DE FREITAS LIMA
PROFA DRA ELZA TIEMI SAKAMOTO HOJO (ORIENTADORA)
Depto. de Genética

Campus Universitário – Monte Alegre
14048-900 Ribeirão Preto SP

Comitê de Ética em Pesquisa do HCRP e FMRP-USP
FWA-00002733; IRB-00002186 e Registro SISNEP/CONEP nº 4
(016) 3602-2228
cep@hcrp.usp.br

www.hcrp.usp.br

Anexo B – Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa do HCRP (Processo 16286/2015)

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

FMRP-USP
RIBEIRÃO PRETO

Ribeirão Preto, 11 de maio de 2016.

Ofício nº 1571/2016
CEP/MGV

PROCESSO HCRP nº 16286/2015

Prezados Pesquisadores,

O trabalho intitulado **"ESTUDO DAS ALTERAÇÕES METABÓLICAS E MOLECULARES ENVOLVIDAS NA RESTRIÇÃO CALÓRICA E NA DIETA HIPOPROTEICA EM SERES HUMANOS" – Projeto de Pesquisa Versão 2,** foi analisado pelo Comitê de Ética em Pesquisa, em sua 427ª Reunião Ordinária realizada em 09/05/2016, e enquadrado na categoria: **APROVADO,** bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido Versão 2.

De acordo com Carta Circular nº 003/2011/CONEP/CNS, datada de 21/03/2011, o sujeito de pesquisa ou seu representante, quando for o caso, deverá rubricar todas as folhas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE – apondo sua assinatura na última do referido Termo; o pesquisador responsável deverá da mesma forma, rubricar todas as folhas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE – apondo sua assinatura na última página do referido Termo.

Este Comitê segue integralmente a Conferência Internacional de Harmonização de Boas Práticas Clínicas (IGH-GCP), bem como a Resolução nº 466/2012 CNS/MS.

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

Atenciosamente.

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

Ilustríssimos Senhores
RAFAEL FERRAZ CONCEIÇÃO
PROFª DRª MARIA CRISTINA FOSS DE FREITAS (Orientadora)
Depto. de Clínica Médica - Endocrinologia

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Campus Universitário – Monte Alegre
14048-900 Ribeirão Preto SP

Comitê de Ética em Pesquisa do HCRP e FMRP-USP
FWA-00002733; IRB-00002186 e
Registro Plataforma Brasil /CONEP nº 5440
(016) 3602-2228
cep@hcrp.usp.br

www.hcrp.usp.br

Anexo C – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) – Participante da intervenção sob restrição proteica

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – PARTICIPANTE DA PESQUISA

NOME DA PESQUISA: INFLUÊNCIA DA HIPERGLICEMIA CRÔNICA NOS PERFIS DE EXPRESSÃO GÊNICA E ESTUDO DO ESTRESSE OXIDATIVO EM PACIENTES COM DIABETES MELLITUS TIPO 2.

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Jéssica Ellen Barbosa de Freitas Lima
ENDEREÇO PARA CONTATO: Av. Bandeirantes, 3900; CEP: 14049-900; Laboratório de Citogenética e Mutagênese, Bloco G
Departamento de Genética - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP/USP).
Telefone: (16) 3315-3082
E-mail: jessicaellen.lima@usp.br

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DO HCFMRP-USP: (16) 3602-2228

O(a) senhor(a) está sendo convidado(a) para participar, como voluntário, de uma pesquisa relacionada ao diabetes mellitus tipo 2 que está sendo realizada pelo departamento de Genética da FMRP/USP em parceria com a equipe da Clínica Médica do Hospital das Clínicas. O diabetes atinge cerca de 415 milhões de pessoas em todo o mundo, sendo uma doença cuja característica principal é o aumento do nível do açúcar no sangue. Em condições normais, o corpo é capaz de controlar os níveis de glicose (açúcar no sangue) por meio da produção de um hormônio chamado insulina. No entanto, em casos em que o organismo não consegue produzir a quantidade de hormônio necessário para o controle da glicose, ou quando o corpo já não responde à insulina, o diabetes se desenvolve.

Os altos valores de açúcar no sangue durante um longo período de tempo podem provocar uma série de modificações no indivíduo, causando danos ao corpo. A mudança de hábitos alimentares traz diversos benefícios para a vida dos indivíduos, incluindo a melhora do diabetes, diminuindo a quantidade de açúcar presente no sangue. Esta pesquisa objetiva estudar as alterações e danos causados pelos altos valores de açúcar no sangue de pacientes com diabetes, buscando entender como a dieta pode influenciar na melhora da doença.

Caso concorde participar da pesquisa, o(a) senhor(a) será internado por 27 dias sob supervisão da Drª. Maria Cristina Foss-Freitas da Clínica Médica onde passará por um tratamento em que será utilizado uma dieta com restrição de proteínas. Para esta pesquisa, será necessário a coleta de cerca de 20mL de seu sangue (equivalente a duas colheres de sopa) utilizando uma seringa descartável, realizado por profissional qualificado e, portanto, com riscos mínimos à sua saúde. Haverá somente o incômodo da dor da “picada” da agulha e há um pequeno risco de formação de um hematoma (marca “roxa” localizada na pele) devido a colheita do sangue. A coleta será realizada uma vez na primeira

semana quando o(a) senhor(a) for internado e mais uma vez na última semana de tratamento. Sua participação não acarretará em nenhum custo e/ou benefício direto para o(a) senhor(a), e se desejar não participar da pesquisa, você não será penalizado de nenhuma forma, não tendo influência alguma em seu tratamento ou acompanhamento da doença. Quaisquer custos adicionais ocorrerão por conta do pesquisador. Além disso, caso ocorra dano decorrente da pesquisa, o senhor(a) está assegurado de acordo com as leis de indenização vigentes no país.

Sua privacidade e identidade serão preservadas, e a fim de evitar qualquer risco de quebra de sigilo, todos os participantes serão identificados pelos pesquisadores através de códigos. Dessa forma, o anonimato é garantido inclusive quando os resultados forem publicados em revistas científicas. Em qualquer momento, se desejar, o(a) senhor(a) poderá entrar em contato com os pesquisadores por meio de telefone ou e-mail para esclarecer quaisquer dúvidas a respeito dos procedimentos que serão realizados. Asseguramos, ainda, que se for de sua vontade, estaremos sempre à disposição para manter as informações acerca do estudo atualizadas, mesmo que isso afete o seu desejo de participar da pesquisa. E se, assim o desejar, poderá retirar o consentimento para uso de sua amostra em qualquer situação, sem que isso traga prejuízos a você ou a seu tratamento no HC.

Todo o material coletado será armazenado apenas para a realização dos experimentos necessários para o estudo do diabetes, sendo logo após descartado em local apropriado.

Este documento deverá ser assinado pelo pesquisador e participante em duas vias, sendo que uma delas ficará com o(a) senhor(a).

Tendo ciência do exposto acima, favor assinar abaixo.

Nome do pesquisador: _____

Assinatura: _____ Data: _____

Nome do participante: _____

Assinatura: _____ Data: _____

Anexo D – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) – Pacientes DM2

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – PARTICIPANTE DA PESQUISA

NOME DA PESQUISA: INFLUÊNCIA DA HIPERGLICEMIA CRÔNICA NOS PERFIS DE EXPRESSÃO GÊNICA E ESTUDO DO ESTRESSE OXIDATIVO EM PACIENTES COM DIABETES MELLITUS TIPO 2.

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Jéssica Ellen Barbosa de Freitas Lima
ENDEREÇO PARA CONTATO: Av. Bandeirantes, 3900; CEP: 14049-900; Laboratório de Citogenética e Mutagênese, Bloco G
Departamento de Genética - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP/USP).
Telefone: (16) 3315-3082
E-mail: jessicaellen.lima@usp.br

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DO HCFMRP-USP: (16) 3602-2228

O(a) senhor(a) está sendo convidado(a) para participar, como voluntário, de uma pesquisa relacionada ao diabetes mellitus tipo 2 que está sendo realizada pelo departamento de Genética da FMRP/USP. O diabetes atinge cerca de 415 milhões de pessoas em todo o mundo, sendo uma doença cuja característica principal é o aumento do nível do açúcar no sangue. Em condições normais, o corpo é capaz de controlar os níveis de glicose (açúcar no sangue) por meio da produção de um hormônio chamado insulina. No entanto, em casos em que o organismo não consegue produzir a quantidade de hormônio necessário para o controle da glicose, ou quando o corpo já não responde à insulina, o diabetes se desenvolve.

Os altos valores de açúcar no sangue durante um longo período de tempo podem provocar uma série de modificações no indivíduo, causando danos ao corpo. Portanto, a presente pesquisa objetiva estudar as alterações e danos causados pelos altos valores de açúcar no sangue de pacientes com diabetes, buscando abordar vários aspectos da doença, que em conjunto com outros estudos pode levar a melhor compreensão do diabetes bem como sua prevenção e tratamento.

Caso concorde participar da pesquisa, será necessário apenas a coleta de cerca de 20mL de seu sangue (equivalente a duas colheres de sopa) utilizando uma seringa descartável, realizado por profissional qualificado e, portanto, com riscos mínimos à sua saúde. Haverá somente o incômodo da dor da “picada” da agulha e há um pequeno risco de formação de um hematoma (marca “roxa” localizada na pele) devido a colheita do sangue. A coleta será realizada apenas uma vez quando o(a) senhor(a) vier ao ambulatório do Hospital das Clínicas em retorno de consultas agendadas. Sua participação não acarretará em nenhum custo e/ou benefício direto para o(a) senhor(a), e se desejar não participar da pesquisa, você não será penalizado de nenhuma forma, não tendo influência alguma

em seu tratamento ou acompanhamento da doença. Quaisquer custos adicionais ocorrerão por conta do pesquisador. Além disso, caso ocorra dano decorrente da pesquisa, o senhor(a) está assegurado de acordo com as leis de indenização vigentes no país.

Sua privacidade e identidade serão preservadas, e a fim de evitar qualquer risco de quebra de sigilo, todos os participantes serão identificados pelos pesquisadores através de códigos. Dessa forma, o anonimato é garantido inclusive quando os resultados forem publicados em revistas científicas.

Em qualquer momento, se desejar, o(a) senhor(a) poderá entrar em contato com os pesquisadores por meio de telefone ou e-mail para esclarecer quaisquer dúvidas a respeito dos procedimentos que serão realizados. Asseguramos, ainda, que se for de sua vontade, estaremos sempre à disposição para manter as informações acerca do estudo atualizadas, mesmo que isso afete o seu desejo de participar da pesquisa. E se, assim o desejar, poderá retirar o consentimento para uso de sua amostra em qualquer situação, sem que isso traga prejuízos a você ou a seu tratamento no HC.

Todo o material coletado será armazenado apenas para a realização dos experimentos necessários para o estudo do diabetes, sendo logo após descartado em local apropriado.

Este documento deverá ser assinado pelo pesquisador e participante em duas vias, sendo que uma delas ficará com o(a) senhor(a).

Tendo ciência do exposto acima, favor assinar abaixo.

Nome do pesquisador: _____

Assinatura: _____ Data: _____

Nome do participante: _____

Assinatura: _____ Data: _____

Anexo E – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) – Controles

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – CONTROLES

NOME DA PESQUISA: INFLUÊNCIA DA HIPERGLICEMIA CRÔNICA NOS PERFIS DE EXPRESSÃO GÊNICA E ESTUDO DO ESTRESSE OXIDATIVO EM PACIENTES COM DIABETES MELLITUS TIPO 2.

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Jéssica Ellen Barbosa de Freitas Lima
ENDEREÇO PARA CONTATO: Av. Bandeirantes, 3900; CEP: 14049-900; Laboratório de Citogenética e Mutagênese, Bloco G
Departamento de Genética - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP/USP).
Telefone: (16) 3315-3082
E-mail: jessicaellen.lima@usp.br

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DO HCFMRP-USP: (16) 3602-2228

O(a) senhor(a) está sendo convidado(a) para participar, como voluntário, de uma pesquisa relacionada ao diabetes mellitus tipo 2 que está sendo realizada pelo departamento de Genética da FMRP/USP. O diabetes atinge cerca de 415 milhões de pessoas em todo o mundo, sendo uma doença cuja característica principal é o aumento do nível do açúcar no sangue. Em condições normais, o corpo é capaz de controlar os níveis de glicose (açúcar no sangue) por meio da produção de um hormônio chamado insulina. No entanto, em casos em que o organismo não consegue produzir a quantidade de hormônio necessário para o controle da glicose, ou quando o corpo já não responde à insulina, o diabetes se desenvolve.

Os altos valores de açúcar no sangue durante um longo período de tempo podem provocar uma série de modificações no indivíduo, causando danos ao corpo. Portanto, a presente pesquisa objetiva estudar as alterações e danos causados pelos altos valores de açúcar no sangue de pacientes com diabetes, buscando abordar vários aspectos da doença, que em conjunto com outros estudos pode levar a melhor compreensão do diabetes bem como sua prevenção e tratamento. No entanto, é necessário que indivíduos sem o diabetes também participem da pesquisa, para que os resultados possam ser comparados e atribuídos aos níveis anormais de açúcar que pacientes com diabetes possuem.

Caso concorde participar da pesquisa, será necessário apenas a coleta de cerca de 20mL de seu sangue (equivalente a duas colheres de sopa) utilizando uma seringa descartável, realizado por profissional qualificado e, portanto, com riscos mínimos à sua saúde. Haverá somente o incômodo da dor da “picada” da agulha e há um pequeno risco de hematoma (marca “roxa” localizada na pele) devido a colheita do sangue. A coleta será realizada apenas uma vez quando o(a) senhor(a) vier ao ambulatório do Hospital das Clínicas, como acompanhante de algum paciente do setor da

Endocrinologia. Sua participação não acarretará em nenhum custo e/ou benefício direto para o(a) senhor(a), e se desejar não participar da pesquisa, você não será penalizado de nenhuma forma. Quaisquer custos adicionais ocorrerão por conta do pesquisador. Além disso, caso ocorra dano decorrente da pesquisa, o senhor(a) está assegurado de acordo com as leis de indenização vigentes no país.

Sua privacidade e identidade serão preservadas, e a fim de evitar qualquer risco de quebra de sigilo, todos os participantes serão identificados pelos pesquisadores através de códigos. Dessa forma, o anonimato é garantido inclusive quando os resultados forem publicados em revistas científicas.

Em qualquer momento, se desejar, o(a) senhor(a) poderá entrar em contato com os pesquisadores por meio de telefone ou e-mail para esclarecer quaisquer dúvidas a respeito dos procedimentos que serão realizados. Asseguramos, ainda, que se for de sua vontade, estaremos sempre à disposição para manter as informações acerca do estudo atualizadas, mesmo que isso afete o seu desejo de participar da pesquisa. E se, assim o desejar, poderá retirar o consentimento para uso de sua amostra em qualquer situação, sem que isso traga prejuízos a você.

Todo o material coletado será armazenado apenas para a realização dos experimentos necessários para o estudo do diabetes, sendo logo após descartado em local apropriado.

Este documento deverá ser assinado pelo pesquisador e participante em duas vias, sendo que uma delas ficará com o(a) senhor(a).

Tendo ciência do exposto acima, favor assinar abaixo.

Nome do pesquisador: _____

Assinatura: _____ Data: _____

Nome do participante: _____

Assinatura: _____ Data: _____