

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

GUSTAVO SICONELLO DOS SANTOS

Estudo sobre a expressão de genes/proteínas chaves com papel no estresse oxidativo, inflamação e reparo do DNA em células mononucleares de pacientes com diabetes mellitus do tipo 2

**RIBEIRÃO PRETO
2023**

GUSTAVO SICONELLO DOS SANTOS

Estudo sobre a expressão de genes/proteínas chaves com papel no estresse oxidativo, inflamação e reparo do DNA em células mononucleares de pacientes com diabetes mellitus do 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: Prof^a. Dr^a. Elza Tiemi Sakamoto-Hojo

**RIBEIRÃO PRETO
2023**

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

FICHA CATALOGRÁFICA

Santos, Gustavo Siconello dos

Estudo sobre a expressão de genes/proteínas chaves com papel no estresse oxidativo, inflamação e reparo do DNA em células mononucleares de pacientes com diabetes mellitus do tipo 2. Ribeirão Preto, 2022.
69 f.: 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. Diabetes do tipo 2; Via da insulina; Sistema antioxidante; Reparo do DNA; Inflamação; Resistência à insulina.

Nome: SANTOS, Gustavo Siconello dos

Título: Estudo sobre a expressão de genes/proteínas chaves com papel no estresse oxidativo, inflamação e reparo do DNA em células mononucleares de pacientes com diabetes mellitus do 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

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 das seguintes entidades e instituições:

CAPES, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (Bolsa de mestrado/ Proc. 88887.469094/2019-00) – Código de Financiamento 001.

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq.

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

Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – FMRP.

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

À minha orientadora, **Prof^a. Dr^a. Elza Tiemi Sakamoto-Hojo**, pela oportunidade de realizar o mestrado em seu laboratório, pela orientação durante o mestrado, pelos conselhos e conversas. Sou muito grato a tudo!

À **Prof^a. Dr^a. Catarina Satie Takahashi** pelo apoio, companheirismo e pelos momentos lúdicos no laboratório.

À **Prof^a. Dr^a. Ester Silveira Ramos**, ex-coordenadora da PG-Genética e atual chefe do departamento de Genética, FMRP-USP e ao **Prof. Dr. Klaus Hartmann Hartfelder**, atual coordenador do curso de Pós-Graduação do Departamento de Genética, pelo apoio e dedicação ao Programa.

Ao **Prof. Dr. Geraldo Aleixo Passos**, pela compreensão e disponibilização de uso de alguns equipamentos de seu laboratório, sem os quais este trabalho não teria sido realizado.

Aos **Professores membros da banca examinadora**, pela disponibilidade em avaliar este trabalho e por todos os conselhos e dicas oferecidas para a melhoria deste e de futuros trabalhos.

À **CAPES** pela bolsa de mestrado e ao **CNPq** e à **FAPESP** pelo suporte financeiro que contribuiu para a realização deste projeto.

Ao técnico do laboratório, **Luís Augusto da Costa Júnior**, pelo melhor companheirismo que qualquer aluno de pós graduação poderia desejar ter.

Às **Meninas**, de iniciação científica, mestrandas e doutorandas, do laboratório, pela amizade, conselhos, momentos de descontração, ensinamentos e direcionamentos. Especial agradecimento à **Natália Chermont Moreira dos Santos** e à **Jéssica Ellen Barbosa de Freitas Lima** (sem a qual este trabalho não teria sido possível), vocês sabem quão significativa foi a ajuda de vocês. Muito obrigado.

Ao pessoal da secretaria do Departamento de Genética, principalmente à **Susie Adriana Nalon** pelo apoio e excelente atendimento prestados.

Aos funcionários do **Departamento de Genética** e da **FMRP-USP** por toda gentileza, apoio e estrutura disponibilizados ao longo do processo.

À minha **Família**, Edna, Belmiro e Henrique, que, com muito amor, têm me apoiado com carinho e consistência.

À minha **Namorada**, Ana, pelo companheirismo, carinho, amor e por acreditar em minha trajetória.

Cada um de vocês, em particular, conhece o peso dos meus agradecimentos!

RESUMO

Santos, G. S. **Estudo sobre a expressão de genes/proteínas chaves com papel no estresse oxidativo, inflamação e reparo do DNA em células mononucleares de pacientes com diabetes mellitus do tipo 2.** 2023, 69f. Dissertação de mestrado – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2023.

O Diabetes Mellitus (DM) é uma doença crônica multifatorial, que resulta em diversas alterações metabólicas e moleculares, levando à hiperglicemia, característica marcante no diabetes, ocorrendo como consequência da resistência à insulina ou produção insuficiente da mesma. A resistência insulínica no diabetes do tipo 2 (DM2) está associada a uma produção desregulada de insulina pelas células β -pancreáticas, o que pode prejudicá-las e levá-las à morte. Nessa doença, várias vias de sinalização moleculares são alteradas, levando a um declínio metabólico. Com o objetivo de estudar o papel dessas vias no desenvolvimento do DM2, o presente estudo consistiu em analisar a expressão de genes e proteínas chaves envolvidas na via da insulina, bem como nas vias de resposta ao estresse oxidativo, reparo do DNA e vias inflamatórias em PBMCs (*Peripheral blood mononuclear cells*) de amostras de sangue de pacientes com DM2 ($n = 12$) em comparação ao grupo controle ($n = 11$). As amostras foram coletadas no hospital das clínicas (FMRP/USP). A média de idade dos pacientes com DM2 não diferiu daquela do grupo controle, mas os níveis glicêmicos, o IMC e valores de Hemoglobina glicada (HbA1c) diferiram significativamente entre os grupos. Os resultados das análises de expressão proteica revelaram um aumento significativo na expressão da SOD2 ($p < 0,05$), sugerindo uma ativação da resposta antioxidante mitocondrial no grupo de pacientes com DM2. Também foi observado um aumento significativo ($p < 0,05$) na expressão da proteína PARP1 em pacientes com DM2; como a PARP1 atua na iniciação de vias de reparo do DNA, os dados indicaram uma maior necessidade de reparo em pacientes com DM2. No entanto, não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos avaliados quanto à proteína TP53, da mesma forma que para as proteínas AKT total, pAKT e pPTEN, que atuam na via da insulina. No entanto, foi observado um aumento significativo ($p < 0,05$) na expressão de pNF- $\kappa\beta$ nos pacientes com DM2, indicando uma possível ativação das vias de inflamação. Além disso, não houve diferença significativa entre os grupos em relação à proteína pSAPK/JNK, que atua como sensor de estresse celular, recrutada em condições de estresse oxidativo. Nas análises de expressão gênica ao nível transcricional, foi observada redução significativa na expressão dos genes *SOD1* e

mTOR em PBMCs dos pacientes com DM2, sugerindo alterações no sistema antioxidante e na via de sinalização do metabolismo celular. No entanto, os genes essenciais da via da insulina (INSR, PI3K e AKT) não apresentaram diferenças significativas nos níveis de expressão entre os grupos estudados. Desta forma, os resultados obtidos das análises realizadas em PBMCs indicaram um aumento na expressão relativa de proteínas envolvidas na resposta ao estresse oxidativo mitocondrial (SOD2), reparo de danos no DNA (PARP1) e modulação da resposta inflamatória (pNF- κ β) em pacientes com DM2. Além disso, a análise da expressão relativa de genes (*SOD1* e *mTOR*) ao nível transcricional sugeriram outras vias alteradas em DM2, ligadas ao sistema antioxidante e metabolismo celular. Assim, os resultados obtidos indicam a relevância em aprofundar pesquisas ao nível molecular para uma melhor compreensão dos elementos chaves da via da insulina e sua relação com outras vias da cascata de sinalização, cujas alterações levam ao desenvolvimento e progressão do DM2.

Palavras chave: Diabetes do tipo 2; Via da insulina; Sistema antioxidante; Reparo do DNA; Inflamação; Resistência à insulina.

ABSTRACT

Santos, G. S. **Study on the expression of key genes/proteins with a role in oxidative stress, inflammation and DNA repair in mononuclear cells from patients with type 2 diabetes mellitus.** 2023, 69f. Dissertação de mestrado – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2023.

Diabetes Mellitus (DM) is a multifactorial chronic disease, which results in several metabolic and molecular changes, leading to hyperglycemia, a hallmark of diabetes, occurring as a result of insulin resistance or insufficient insulin production. Insulin resistance in type 2 diabetes (T2DM) is associated to deregulation in insulin production by pancreatic β cells, which can lead to β cell death. Several signaling pathways are altered in this disease, leading to a metabolic decline. In this work, the objective was to study the role of critical signaling pathways in T2DM development. The study consisted of analyzing the expression of key genes and proteins involved in the insulin pathway, as well as in cell responses to oxidative stress, DNA repair and inflammatory pathways in PBMCs (Peripheral blood mononuclear cells) from blood samples of T2DM patients ($n = 12$) compared to the control group ($n = 11$). Samples were collected at the Clinic Hospital (FMRP/USP). The mean age of patients with T2DM did not differ from that of the control group; however, glycemic levels, BMI and glycated hemoglobin (HbA1c) values differed significantly between the two groups. The results of protein expression assay revealed a significant increase in SOD2 expression ($p < 0.05$), suggesting an activation of the mitochondrial antioxidant response in patients with T2DM. A significant increase ($p < 0.05$) in PARP1 protein expression was also observed in patients with T2DM; as PARP1 acts in the initiation of DNA repair pathways, the data indicated a greater need for repair in patients with T2DM. However, no significant differences were found between the evaluated groups regarding the TP53 protein, as well as for the total AKT, pAKT and pPTEN proteins, which play roles in the insulin pathway. Although, a significant increase ($p < 0.05$) in pNF- κ B expression was observed in T2DM patients, indicating a possible activation of inflammation pathways. Furthermore, there was no significant difference between the groups regarding the expression of pSAPK/JNK protein, which acts as a cellular stress sensor, recruited under conditions of oxidative stress. The gene expression assay at the transcriptional level revealed a significant reduction in the expression of *SOD1* and *mTOR* genes in PBMCs from patients with T2DM, suggesting alterations in the

antioxidant system and in the signaling pathway related to cellular metabolism. However, the essential genes participating in the insulin pathway (INSR, PI3K and AKT) did not show significant differences between the studied groups. Therefore, the results obtained from the analyzes carried out on PBMCs indicated an increase in the relative expression of proteins involved in the response to mitochondrial oxidative stress (SOD2), DNA repair (PARP1) and modulation of the inflammatory response (pNF- κ β) in patients with DM2. In addition, the analysis of the relative transcript expression of *SOD1* and *mTOR* genes suggested other altered pathways in T2DM, linked to the antioxidant system and cellular metabolism. As a whole, the results obtained indicate a need for further research at the molecular level for a better understanding of the key elements participating in the insulin pathway, their relationship with other pathways and implications of the molecular alterations in the development and progression of DM2.

Keywords: Type 2 diabetes; Insulin pathway; Antioxidant system; DNA repair; Inflammation; Insulin resistance.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Sobrecarga mitocondrial em virtude da hiperglicemia e seus impactos na célula. O estado hiperglicêmico sobrecarrega a mitocôndria, induzindo um aumento na produção de ROS e, em resposta, o organismo recruta as enzimas antioxidantes SOD1 e SOD2 para metabolizar o excesso de ROS. Danos ao DNA podem ocorrer pelo excesso de ROS mitocondrial produzido em virtude da hiperglicemia.....23
- Figura 2:** Via de sinalização da insulina. Ao reconhecer a insulina, o IR induz uma fosforilação na proteína IRS, que tem como função ativar a PI3K para que esta possa converter PIP2 em PIP3. A PIP3 induz a ativação de AKT que possui ação em diferentes vias, tais como a ativação de mTOR e CK2, porém a principal função de AKT na via da insulina é induzir a translocação de GLUT para captação de glicose. PTEN atua como antagonista da via da insulina, inibindo a ativação desta. CK2, ativado pela AKT, atua inibindo a PTEN. JNK pode impedir a ativação da via da insulina também impedindo a fosforilação da IRS.....25
- Figura 3:** Expressão proteica avaliada em PBMCs do grupo de pacientes com DM2 (n=12) e grupo controle (n=11) analisada por *Western Blotting* e posteriormente quantificada pelo *software Image Studio Lite ver 5.0 (Lite Software)*. Expressão de SOD1 (~18 kDa) e SOD2 (~25 kDa). Para as análises estatísticas foi utilizado o Teste t. *p<0,05. C: Indivíduos do grupo Controle; DM2: Pacientes com DM2; 01: Representa o número dos indivíduos dentro de cada grupo.....40
- Figura 4:** Expressão proteica avaliada em PBMCs do grupo de pacientes com DM2 (n=12) e grupo controle (n=11) analisada por *Western Blotting* e posteriormente quantificada pelo *software Image Studio Lite ver 5.0 (Lite Software)*. Expressão de PARP1 (~116 kDa) e TP53 (~53 kDa). Para as análises estatísticas foi utilizado o Teste t. *p<0,05. C: Indivíduos do grupo Controle; DM2: Pacientes com DM2; 01: Representa o número dos indivíduos dentro de cada grupo.....41
- Figura 5:** Expressão proteica avaliada em PBMCs do grupo de pacientes com DM2 (n=12) e grupo controle (n=11) analisada por *Western Blotting* e posteriormente quantificada pelo *software Image Studio Lite ver 5.0 (Lite Software)*. Expressão de AKT (~60 kDa) e Fosfo-AKT_(S473) (~60 kDa). Para as análises estatísticas foi utilizado o Teste t. *p<0,05. C: Indivíduos do grupo Controle; DM2: Pacientes com DM2; 01: Representa o número dos indivíduos dentro de cada grupo.....42
- Figura 6:** Expressão proteica avaliada em PBMCs do grupo de pacientes com DM2 (n=12) e grupo controle (n=11) analisada por *Western Blotting* e posteriormente quantificada pelo *software Image Studio Lite ver 5.0 (Lite Software)*. Expressão de Fosfo-PTEN_(S380/T382/T383) (~54 kDa) e Fosfo-NF- κ B_(p65) (~65 kDa). Para as análises estatísticas foi utilizado o Teste t. *p<0,05. C: Indivíduos do grupo Controle; DM2: Pacientes com DM2; 01: Representa o número dos indivíduos dentro de cada grupo.....43
- Figura 7:** Expressão proteica avaliada em PBMCs do grupo de pacientes com DM2 (n=12) e grupo controle (n=11) analisada por *Western Blotting* e posteriormente quantificada pelo *software Image Studio Lite ver 5.0 (Lite Software)*. Expressão de Fosfo-SAPK/JNK (~54 kDa). Para as análises estatísticas foi utilizado o Teste t. *p<0,05. C: Indivíduos do grupo Controle; DM2: Pacientes com DM2; 01: Representa o número dos indivíduos dentro de cada grupo.....44
- Figura 8:** Expressão gênica transcricional relativa avaliada em PBMCs de pacientes com grupo DM2 (n=12) e o grupo controle (n=11) e analisadas por *qRT-PCR* e pelo programa *Relative Quantification app (Thermo Fisher)*. **(A)** Expressão gênica de *INSR (Insulin Receptor)*, **(B)** *PI3K (Phosphoinositide 3-kinase)* **(C)** *AKT (Protein Kinase B)* **(D)** *CK2 (Casein Kinase 2)* **(E)** *SOD1 (Superoxide Dismutase 1)* **(F)** *mTOR (mammalian Target of Rapamycin)*. Os valores de expressão foram normalizados de acordo com a expressão dos genes endógenos *HPRT* e *B2M*. Para as análises estatísticas foi utilizado o Teste t. *p < 0,05.....47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Sequência dos <i>primers</i> para a realização da PCR em tempo real.....	36
Tabela 2: Comparação das características clínicas (médias) e idade dos indivíduos do grupo controle (Grupo-01; n=11) e de pacientes com DM2 (Grupo-02; n=12).....	38
Tabela 3: Características clínicas do grupo controle (Grupo-01).....	38
Tabela 4: Características clínicas dos pacientes com DM2 (Grupo-02).....	39
Tabela 5: Valores de expressão proteica em PBMCs de indivíduos do grupo controle (Grupo-01; n=11) e de pacientes com DM2 (Grupo-02; n=12).....	44
Tabela 6: Valores de expressão gênica transcricional em PBMCs de indivíduos do grupo controle (Grupo-01; n=11) e de pacientes com DM2 (Grupo-02; n=12).....	46

LISTA DE APÊNDICES

Apêndice A: Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa do HCRP (Processo 747/2018).....	66
Apêndice B: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) – Pacientes com DM2.....	67
Apêndice C: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) – Controles.....	69

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AGE	<i>Advanced Glycation End-product</i>
AKT	<i>Alpha serine/threonine-protein kinase</i>
AKT2	<i>AKT serine/threonine kinase 2</i>
AS160	<i>AKT Substrate 160</i>
ATP	<i>Adenosine Triphosphate</i>
B2M	<i>Beta-2-Microglobulin</i>
CK2	<i>Casein Kinase 2</i>
CSNK2A1	<i>Casein Kinase 2 catalytic subunit alpha 1</i>
DM	Diabetes Mellitus
DM1	Diabetes Mellitus tipo 1
DM2	Diabetes Mellitus tipo 2
DMG	Diabetes Mellitus Gestacional
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i>
GLUT4	<i>Glucose Transporter</i>
Hb1Ac	Hemoglobina glicada
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HPRT	<i>Hypoxanthine Phosphoribosyltransferase</i>
IL-1	Interleukin-1
IL-6	Interleukin-6
INSR	<i>Insulin Receptor</i>
IR	<i>Insulin Resistance</i>
IRS	<i>Insulin Receptor Substrate</i>
mTOR	<i>Mammalian Target of Rapamycin</i>
NAD ⁺	<i>Nicotinamide Adenine Dinucleotide</i>
NADH	<i>1,4-Nicotinamide Adenine Dinucleotide</i>
NF-κβ	<i>Nuclear Factor κβ</i>
O ₂ ⁻	Ânion Superóxido
OH	Hidroxila

PARP1	<i>Poly (ADP-ribose) Polymerase 1</i>
PBMC	<i>Células Mononucleares de Sangue Periférico</i>
PI3K	<i>Phosphoinositide 3-Kinase</i>
<i>PIK3R1</i>	<i>Phosphoinositide 3-Kinase Regulatory Subunit 1</i>
PIP2	<i>Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase</i>
PIP3	<i>Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate</i>
PTEN	<i>Phosphatase and Tensin Homolog</i>
RAGE	<i>Receptor for Advanced Glycation End-product</i>
RIN	<i>RNA Integrity Number</i>
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i>
SAPK/JNK	<i>Stress-activated protein kinases/ Jun N-terminal kinase</i>
SOD1	<i>Superoxide Dismutase 1</i>
SOD2	<i>Superoxide Dismutase 2</i>
TNF- α	<i>Tumor Necrosis Factor Alpha</i>
TP53	<i>Tumor Protein P53</i>

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
1.1 Diabetes <i>mellitus</i>	18
1.2 Equilíbrio redox e via de sinalização de reparo do DNA no DM2	19
1.3 Via de sinalização da insulina	22
HIPÓTESE	25
2. OBJETIVO	27
2.1 Objetivo geral	27
2.2 Objetivos específicos	27
3. MATERIAIS E MÉTODOS	29
3.1 Casuística	29
3.2 Coleta e separação de células mononucleares de sangue periférico (PBMCs)	29
3.3 Extração, quantificação e avaliação da integridade de RNA	299
3.4 Avaliação da expressão proteica através de Western blotting	30
3.4.1 Isolamento e quantificação de proteínas	30
3.4.2 Preparo das amostras e eletroforese de proteínas	31
3.4.3 Imunodeteção e análise das proteínas	32
3.5 Avaliação da expressão gênica através da PCR em real time	32
3.5.1 Reação de transcrição reversa	32
3.5.2 Delineamento para a construção de primers	33
3.5.3 Avaliação da expressão gênica via PCR em tempo real	35
3.6 Análise estatística	35
4. RESULTADOS	37
4.1 Caracterização dos grupos estudados	37
4.2 Avaliação do nível de expressão proteica	38
4.3 Avaliação da expressão gênica transcricional	44
5. DISCUSSÃO	47
6. CONCLUSÕES	55
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56
APÊNDICES	65

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1 Diabetes *mellitus*

O Diabetes *mellitus* (DM) é uma doença crônica de elevada prevalência global. No ano de 2021 foi estimado cerca de 537 milhões de pessoas portadoras da doença, havendo 15,7 milhões só no Brasil. Estima-se que até o ano de 2045, aproximadamente 783 milhões de pessoas serão afetadas com DM no mundo, sendo que no Brasil esse número pode chegar a 23,2 milhões (IDF, 2021). O DM é uma fisiopatologia crônica, multifatorial e complexa, na qual fatores genéticos, ambientais e o estilo de vida estão envolvidos em diversas alterações metabólicas que contribuirão para o estabelecimento da doença (Oliveira et al., 2017; IDF, 2021).

A principal característica do DM é a hiperglicemia, condição na qual o organismo deixa de responder à insulina, um hormônio produzido pelas células β -pancreáticas, responsável por facilitar a entrada da glicose nas células, ou não consegue produzi-la de modo adequado (Boscariol et al., 2017). Dentre os tipos de diabetes, os mais comuns são o Diabetes *mellitus* tipo 1 (DM1), tipo 2 (DM2) e gestacional (DMG) (Colberg et al, 2016, IDF, 2021).

O DM1 representa cerca de 5 a 10% dos casos e é caracterizado pela destruição autoimune das células β -pancreáticas, inviabilizando a produção necessária de insulina pelo pâncreas (Katsarou et al., 2017). Essa condição acomete crianças com mais frequência, sendo necessário o uso diário de insulina para a manutenção de níveis adequados de glicemia (Maiese, 2015; IDF, 2021). O DM2 é a forma mais prevalente da doença, representando cerca de 90 a 95% dos casos totais. É mais comum em adultos e idosos, caracterizado pelo aumento progressivo da resistência à insulina, decorrente da dessensibilização dos receptores de insulina à presença do hormônio (IDF, 2021). Em consequência, a insulina se torna progressivamente ineficaz, fazendo com que as células β -pancreáticas aumentem a produção do hormônio de maneira desregulada. Como resultado, a produção excessiva de insulina pode, ao longo do tempo, prejudicar e induzir a morte das células β -pancreáticas (Leibowitz et al., 2008; Blake & Trounce, 2014, IDF, 2021).

Diferentemente do DM1 e do DM2, o DMG ocorre durante a gestação, sendo mais facilmente detectado no primeiro trimestre gestacional. Essa condição tende a ser transitória, sendo encerrada ao final da gestação (Buchanan & Xiang, 2005). No entanto, mulheres que apresentaram DMG durante a gestação, apresentam um risco

maior de apresentar esse mesmo quadro em uma gestação futura, além de maiores chances de desenvolver DM2 nos anos subsequentes (Buchanan & Xiang, 2005, IDF, 2021).

1.2 Equilíbrio redox e via de sinalização de reparo do DNA no DM2

Entre os diferentes tipos de DM, o DM2 é o mais prevalente na população (IDF, 2021). O quadro hiperglicêmico decorrente da doença é capaz de provocar diversas alterações moleculares no organismo, sendo as mitocôndrias, as organelas mais afetadas por esse quadro (Veza et al., 2022). O funcionamento inadequado das mitocôndrias está atrelado ao desequilíbrio do metabolismo da glicose, contribuindo para o comprometimento da integridade celular, afetando, desse modo, as células β -pancreáticas, favorecendo o avanço do DM2 (Hurrle et al., 2017).

Além disso, na presença de elevadas taxas de glicose, a mitocôndria pode sofrer importantes alterações de modo a se adaptar ao elevado aporte de glicose e ser capaz de metabolizar o excedente dessa molécula (Rolo et al., 2006; Veza et al., 2022). Em decorrência das elevadas taxas de metabolização da glicose, há uma maior ativação da cadeia transportadora de elétrons mitocondrial, que por sua vez, induz uma maior produção de ROS (do inglês: *Reactive Oxygen Species*) via fosforilação oxidativa, tais como peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical hidroxila (OH), ânion superóxido (O_2^-), entre outras (**Figura 1**) (Sims-Robinson et al., 2010; Bosco et al., 2011; Hurrle et al., 2017).

Em condições glicêmicas normais, a produção de ROS pela mitocôndria via fosforilação oxidativa é fisiológica e normalmente compensada pelo sistema antioxidante, que inclui enzimas como catalase, glutathione peroxidase, SOD1 (do inglês: *Superoxide Dismutase 1*) e SOD2 (do inglês: *Superoxide dismutase 2*) (Ma et al., 2012; Aguer et al., 2013). Contudo, nas condições hiperglicêmicas, o aumento na produção de ROS pode resultar em um desequilíbrio entre as taxas de produção e eliminação das ROS, favorecendo o estado pró-oxidante das células e provocando o estresse oxidativo, o qual constitui uma condição em que o sistema antioxidante não é capaz de metabolizar o excesso de ROS produzido (Grindel et al., 2016; Cucak et al., 2019).

Além da hiperglicemia crônica sobrecarregar a cadeia transportadora de elétrons, elevando a produção de ROS, a condição hiperglicêmica contribui também para o aumento da quantidade de reações de glicação não enzimáticas, afetando

proteínas, lipídios e as moléculas de DNA, contribuindo para a formação dos AGEs (do inglês: *Advanced glycation endproducts*) (Biemel et al., 2002; Lin et al., 2012). A interação dos AGEs com seu receptor, RAGEs (do inglês: *Receptor of AGEs*) também contribui para aumentar a geração de ROS, além da ativação de proteínas ligadas a vias inflamatórias, tal como a proteína NF- κ B (do inglês: *Nuclear Factor κ B*), que modula a expressão de citocinas pró-inflamatórias, acentuando o estresse oxidativo (Zhou et al., 2016; Byun et al., 2017). O nível aumentado de citocinas pró-inflamatórias associado à condição de estresse oxidativo está relacionado ao aumento de danos no DNA (Tatsch, et al., 2012). Além disso, a maior ativação da proteína NF- κ B tem o potencial de comprometer a via de sinalização da insulina por meio de uma fosforilação aberrante da proteína IRS (do inglês: *Insulin receptor substrate*) (Blaser 2016; Asadipooya et al., 2019).

A proteína IRS é responsável por dar continuidade à via da insulina e alterações na fosforilação dessa proteína podem contribuir para o aumento da resistência à insulina (Abu-Farha et al., 2015). Uma das proteínas responsáveis pela fosforilação aberrante da proteína IRS é a proteína SAPK/JNK (do inglês: *Stress-activated protein kinases/ Jun N-terminal kinase*), um indicador de estresse celular que reage às alterações do meio. Devido ao aumento do estresse oxidativo e do aumento do perfil inflamatório no DM2, a proteína SAPK/JNK passa a ser recrutada com maior frequência, levando ao aumento da fosforilação da proteína IRS (Kaneto et al., 2005). Além disso, a maior ativação da proteína SAPK/JNK também contribui para a inibição da síntese de insulina pelas células β -pancreáticas, contribuindo para a progressão do DM2 (Choudhury et al., 2015).

A condição hiperglicêmica associada ao estresse oxidativo contribui ainda para a degradação dos receptores de insulina (IRs) responsáveis por reconhecer a presença da insulina e por contribuir para a ativação da via da insulina e subsequente captação de glicose (Mayer & Belsham, 2010; Yuasa et al., 2014). A degradação dos IRs resulta em hiperinsulinemia, agravando ainda mais o estado de hiperglicemia (Hançer et al., 2014).

No estado homeostático, o excesso de glicose circulante, normalmente metabolizada pela via da glicólise, é armazenado na forma de glicogênio no fígado e no músculo, bem como na forma de ácidos graxos nos adipócitos. Contudo, em casos de hiperglicemia crônica, como ocorre no DM2, há um aumento da ativação da via do Poliols, uma via de sinalização na qual a glicose é convertida em frutose via consumo

de NAD⁺ e produção de NADH (Aslan & Beydemir, 2017; Yan, 2018). Com isso, há uma queda nos níveis celulares de NAD⁺, o que contribui para o desequilíbrio redox na célula e o excedente de NADH contribui para uma maior produção de ROS mitocondrial ao sobrecarregar o complexo I da mitocôndria (Yan, 2018).

As ROS são moléculas altamente instáveis que têm o potencial de causar danos celulares ao DNA e outras macromoléculas (Wlodarczyk & Nowicka, 2019). O aumento na indução de danos no DNA promove a ativação da proteína PARP1 (do inglês: *Poly (ADP-ribose) polymerase 1*), que atua como sensor de danos ao DNA (**Figura 1**) (Aleksandrov et al., 2018). A proteína PARP1, por meio do consumo de NAD⁺, participa da iniciação dos vários mecanismos de reparo do DNA, incluindo o reparo por excisão de bases (BER), reparo por excisão de nucleotídeos (NER) e reparo por recombinação homóloga (HRR) (Giansanti et al., 2010; Jangra et al., 2013; Aleksandrov et al., 2018). Desse modo, a maior ativação de PARP1 contribui, juntamente à via do Polirol, para a depleção de NAD⁺. Esse desequilíbrio do metabolismo energético da célula compromete o seu funcionamento adequado e pode induzir morte celular (Huang et al., 2008; Yan, 2018).

Além da atuação da proteína PARP1, a proteína TP53 também possui um papel essencial na regulação do ciclo celular e vias de reparo do DNA, pois atua bloqueando a progressão do ciclo celular, possibilitando a sinalização para o reparo do DNA (Huang., 2008; Turacli et al., 2018; Aleksandrov et al., 2018). Em pacientes com DM2, o estresse oxidativo é um fator crítico no desenvolvimento de complicações relacionadas à doença; alguns estudos sugerem que a ativação excessiva da proteína TP53 em virtude do estresse oxidativo pode estar relacionada ao aumento da resistência à insulina e da condição inflamatória, o que contribui para um agravamento da doença nos pacientes (Shimizu et al., 2012; Beyfuss & Hood, 2018). Desse modo, por reagirem ao estresse fisiológico provocado pelo desenvolvimento do DM2 a proteína PARP1 e a proteína TP53 se mostram importantes indicadores celulares no contexto do DM2, embora os mecanismos moleculares ainda requeiram investigação.

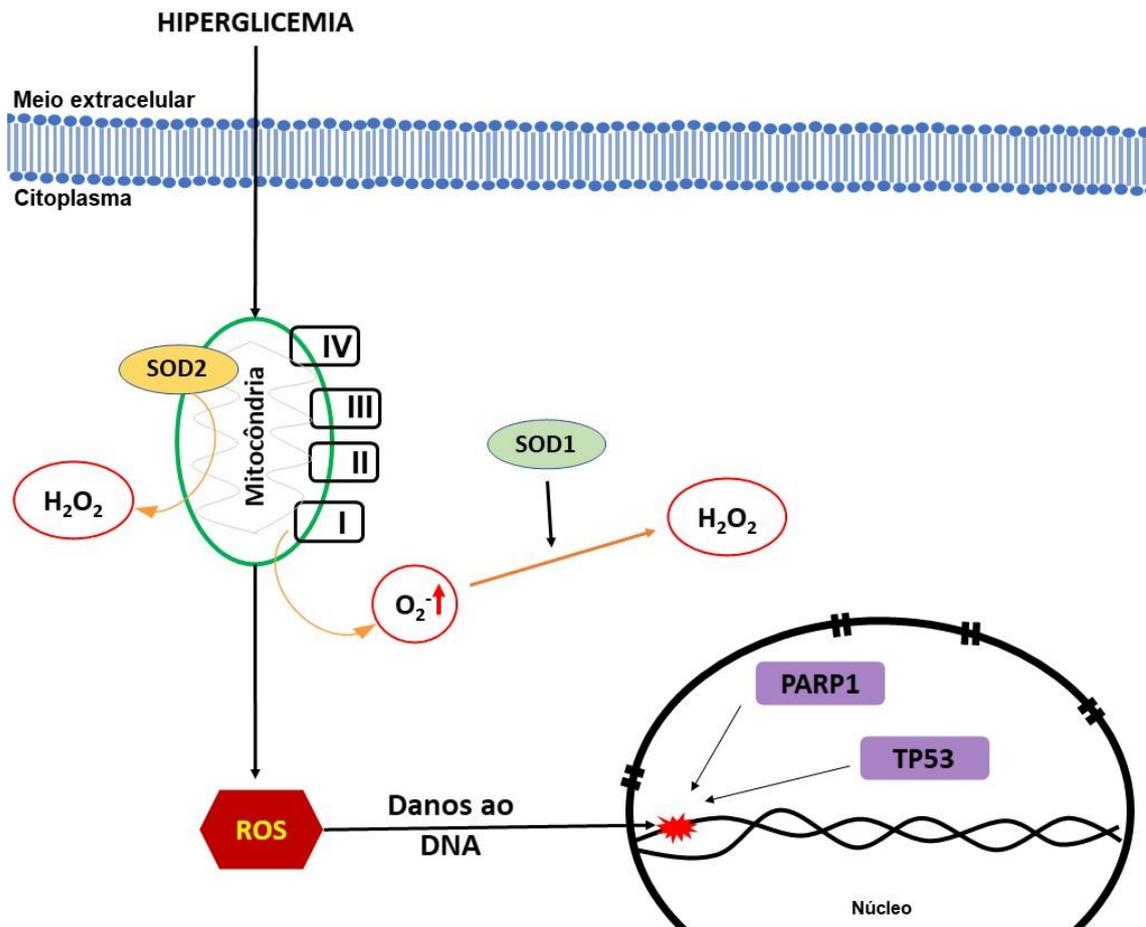


Figura 1: Sobrecarga mitocondrial em virtude da hiperglicemia e seus impactos na célula. O estado hiperglicêmico sobrecarrega a mitocôndria, induzindo um aumento na produção de ROS e, em resposta, o organismo recruta as enzimas antioxidantes SOD1 e SOD2 para metabolizar o excesso de ROS. Danos ao DNA podem ocorrer pelo excesso de ROS mitocondrial produzido em virtude da hiperglicemia (Hurrle et al., 2017; Aleksandrov et al., 2018).

1.3 Via de sinalização da insulina

A ativação da via de sinalização da insulina é imprescindível para a manutenção da homeostase relativa ao metabolismo da glicose (Huang et al., 2018). De modo geral, para a captação de glicose, a insulina precisa primeiramente se ligar e ser reconhecida pelo IR. Essa ligação induz a fosforilação do IRS, uma proteína acoplada na porção intracelular do IR (Belfiore, et al, 2017; Huang, et al, 2018). Após sofrer fosforilação, a proteína IRS fosforila e ativa a proteína PI3K (do inglês: *Phosphoinositide 3-kinase*), uma quinase responsável pela conversão de PIP2 (do inglês: *Phosphatidylinositol-3, 4-bisphosphate*) em PIP3 (do inglês:

Phosphatidylinositol-3, 4, 5-triphosphate). PIP3, por sua vez, catalisa a ativação de AKT (do inglês: *Serine/threonine protein kinase*) e, uma vez ativada, a AKT fosforila a AS160 (do inglês: *AKT substrate of 160 kDa*). A fosforilação de AS160 é importante para o processo de translocação de GLUT4 (do inglês: *Glucose transporter 4*) do citoplasma para a membrana plasmática, o qual será responsável pela captação da glicose circulante (**Figura 2**) (Osorio-Fuentealba et al, 2012; Huang, et al, 2018).

A principal função do IR é reconhecer a presença da insulina (Escribano et al., 2017). Quando o IR perde a sua função e deixa de responder adequadamente à insulina, pode ocorrer um comprometimento da sinalização da via PI3K/AKT, podendo levar a uma significativa redução da translocação de GLUT4 para a superfície da célula, prejudicando a captação da glicose e, conseqüentemente, contribuindo para a hiperglicemia (Schultze et al., 2012). Desta forma, qualquer alteração na homeostase dessa via pode afetar de modo severo o metabolismo da glicose, bem como o metabolismo de lipídios e de proteínas, alterando de maneira significativa o metabolismo energético, o que contribui para agravar o estado de saúde do indivíduo (Escribano et al., 2017).

Além disso, a AKT também modula a ação da proteína CK2 (do inglês: *Protein kinase 2*) e da proteína mTOR (do inglês: *mammalian Target of Rapamycin*) (Ma et al., 2014; Vatseba et al., 2020). A CK2 atua modulando o metabolismo da glicose e a via de sinalização da insulina, via fosforilação da própria AKT e da proteína PTEN (do inglês: *Phosphatase and tensin homologue*), ativando a primeira e inibindo a ação da segunda. PTEN é um importante regulador negativo da via PI3K/AKT, atuando na conversão de PIP3 em PIP2, impedindo a ativação da proteína AKT (**Figura 2**) (Borgo et al., 2017). A ausência de regulação de PTEN pode resultar em uma ativação inadequada da via da insulina, desse modo, a proteína CK2 é também crucial para o adequado funcionamento da via da insulina (Ma et al., 2014).

Já a proteína mTOR atua na regulação do metabolismo celular e, sendo ativada pela proteína AKT, contribui para a manutenção do crescimento e da proliferação da célula (Vatseba et al., 2020). Contudo, com o estabelecimento da resistência à insulina a proteína AKT, que ativa mTOR, passa a ser menos recrutada resultando em menor ativação de mTOR. A redução na atividade de mTOR pode comprometer a secreção de insulina, o que contribui para o agravo do DM2 (Paris et al., 2003; Kleinert et al., 2014; Weichhart et al., 2015). Além disso, a ativação de mTOR, através da fosforilação aberrante dessa proteína, tem o potencial de inibir a proteína IRS impedindo a ativação da proteína PI3K e, conseqüentemente, da via da insulina, contribuindo para a progressão do DM2, o que torna a proteína mTOR um alvo de extensivos estudos (Park et al., 2009).

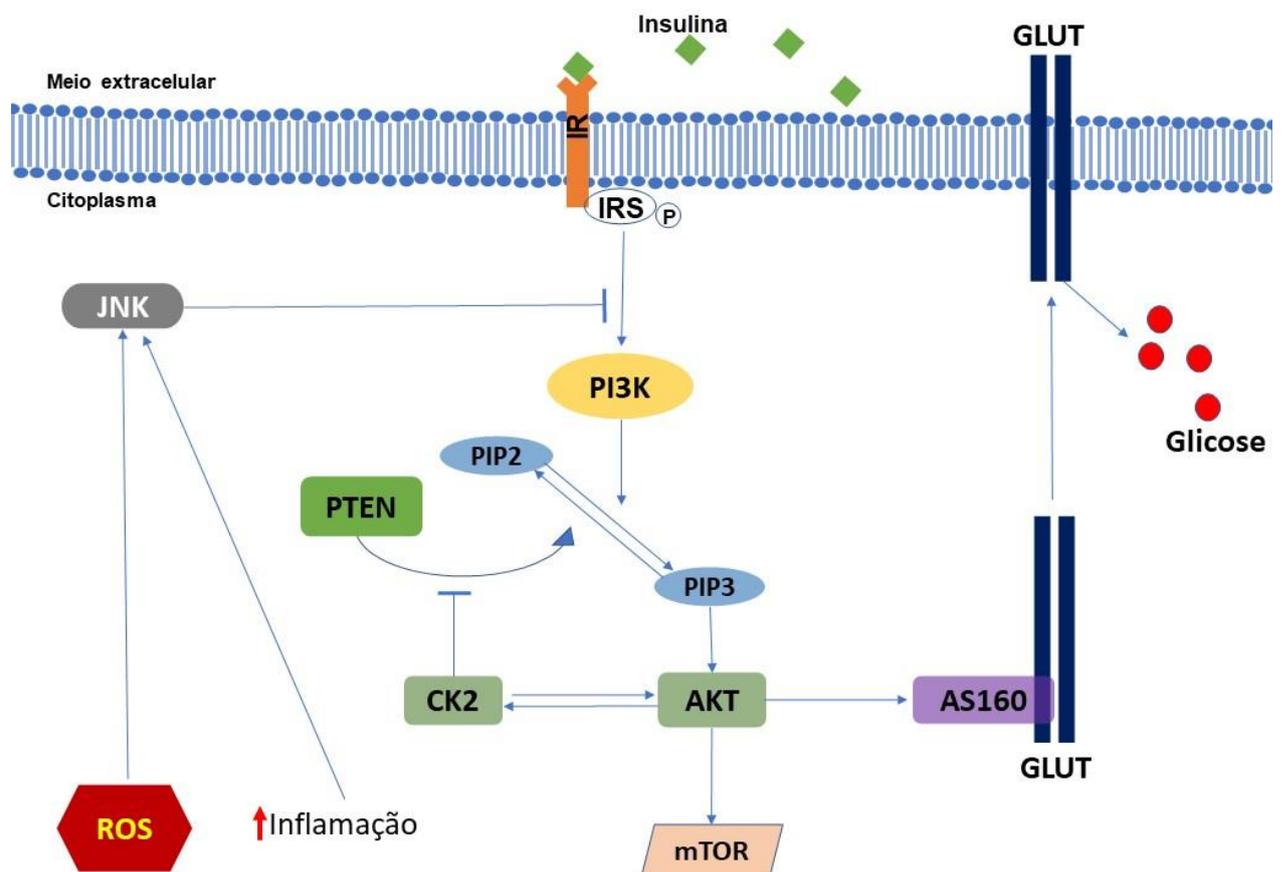


Figura 2: Via de sinalização da insulina. Ao reconhecer a insulina, o IR induz uma fosforilação na proteína IRS, que tem como função ativar a PI3K para que esta possa converter PIP2 em PIP3. A PIP3 induz a ativação de AKT que possui ação em diferentes vias, tais como a ativação de mTOR e CK2, porém a principal função de AKT na via da insulina é induzir a translocação de GLUT para captação de glicose. PTEN atua como antagonista da via da insulina, inibindo a ativação desta. CK2, ativado pela AKT, atua inibindo a PTEN. JNK pode impedir a ativação da via da insulina também impedindo a fosforilação da IRS (Huang, et al, 2018).

Conforme dados da literatura, a compreensão dos mecanismos envolvidos na resistência à insulina é crucial para compreender a etiofisiopatologia do DM2 e o desenvolvimento de terapias mais eficazes para o tratamento dos pacientes (Tahrani, 2017; Kobylak et al., 2018; Wu & Bellantyne, 2020). De acordo com DeFronzo e colaboradores (2015), a regulação anormal da via da insulina tem sido associada a uma ampla gama de fatores, incluindo mudanças no metabolismo, inflamação, estresse oxidativo e modificações na expressão gênica e proteica. Entretanto, os mecanismos moleculares envolvendo essa intrincada sinalização ainda necessitam de uma ampla investigação. Dessa forma, é importante continuar investigando a via da insulina e seus componentes para melhor compreender o papel que estes desempenham no estabelecimento e no desenvolvimento do DM2.

HIPÓTESE

A hipótese deste trabalho é que pacientes com DM2 apresentam alterações no padrão de expressão de genes e proteínas em células mononucleares de sangue periférico (PBMCs, do inglês: *Peripheral blood mononuclear cells*), responsáveis por desequilibrar o padrão de expressão de genes e proteínas de várias vias de sinalização, tais como a via da insulina, de respostas ao estresse oxidativo e de resposta a danos ao DNA.

OBJETIVOS

2. OBJETIVO

2.1 Objetivo geral

O presente trabalho tem por objetivo avaliar os perfis de expressão de proteínas envolvidas na sinalização de processos ligados ao estresse oxidativo, danos ao DNA e inflamação, bem como os perfis de expressão gênica, ao nível transcricional, de componentes chaves da via da insulina, analisados em PBMCs de pacientes com DM2, visando a comparação entre os diferentes grupos: pacientes com DM2 (Grupo-02) e o grupo controle, composto por indivíduos sadios (Grupo-01).

2.2 Objetivos específicos

- Analisar e comparar o perfil de expressão de genes da via da insulina (*INSR*, *PIK3R1*, *AKT2* e *CSNK2A1*), sinalização de resposta ao estresse oxidativo (*SOD1*) e metabolismo celular (*MTOR*) em PBMCs de pacientes com DM2 (Grupo-02) e indivíduos sadios (Grupo-01, Controle).
- Mensurar e comparar os níveis de expressão de proteínas da via da insulina (AKT, pAKT e pPTEN), sinalização de resposta ao estresse oxidativo (*SOD1* e *SOD2*), de resposta a danos ao DNA (TP53 e PARP-1), ao perfil inflamatório (NF- κ B) e estresse celular (SAPK/JNK), em PBMCs de pacientes com DM2 (Grupo-02) e indivíduos sadios (Grupo-01, Controle).

MATERIAIS E MÉTODOS

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Casuística

O presente trabalho foi aprovado 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, processo nº 747/2018 – **APÊNDICE- A**). Foram selecionados pacientes com DM2 (Grupo-02; n=12) e indivíduos saudáveis (Grupo-01; n=11) que aceitaram participar da pesquisa e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (**APÊNDICE - B e APÊNDICE- C**), que contém informações a respeito da pesquisa, destino de suas amostras, sigilo das informações pessoais e telefone para contato em caso de dúvidas. O diagnóstico de DM2 (Grupo-02) foi realizado pela equipe médica do departamento de Clínica Médica do HC-FMRP/USP, setor de Endocrinologia e Metabologia. Segundo a Sociedade Brasileira de Diabetes (SBD) (2022), é considerado portador de DM2 aquele indivíduo que apresenta níveis glicêmicos em jejum (>126 mg/dL), porcentagem de hemoglobina glicada (HbA1c $>6,5\%$) e alterações no teste oral de tolerância à glicose (OGTT) (>200 mg/dL).

3.2 Coleta e separação de células mononucleares de sangue periférico (PBMCs, do Inglês: *peripheral blood mononuclear cells*)

De cada indivíduo foram coletados aproximadamente 20 mL de sangue em tubos *Vacutainer* (*Beckton & Dickinson, EUA*), contendo EDTA. Os tubos com EDTA foram empregados para separação de PBMCs e, *a posteriori*, à extração de RNA e proteínas. A separação de PBMCs foi realizada com a homogeneização do sangue em solução salina na proporção de 1:1, sendo em seguida transferida para um tubo contendo Histopaque 1077 (*Sigma Chemical Co, EUA*), que foi submetido à centrifugação a $447 \times g$ por 20 min. Devido ao gradiente de densidade, foi formado um anel de PBMCs entre o plasma e o reagente Histopaque, o qual foi extraído e transferido a outro tubo, com o auxílio de uma pipeta descartável, para ser diluído em solução salina e centrifugado a $112 \times g$ por 5 min. para lavagem das PBMCs. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* formado foi homogeneizado para os ensaios subsequentes.

3.3 Extração, quantificação e avaliação da integridade de RNA

Para a extração de RNA, primeiramente foram adicionados 2 mL de Trizol (*Invitrogen*) ao *pellet* de PBMCs. Após a homogeneização completa das PBMCs com

o Trizol, foi acrescido 200 µL de salina DEPC e 200 µL de clorofórmio para cada 1 mL de Trizol utilizado, seguido de agitação intensa por 15 seg. e repouso por 5 min. As amostras foram centrifugadas a 12000 x g por 15 min. a 4°C, a fase aquosa foi cuidadosamente retirada e transferida para outro tubo. Neste último, a fase aquosa foi homogeneizada com 800 µL de isopropanol para cada 1 mL de Trizol e foi armazenado sob refrigeração a -20°C *overnight*.

No dia seguinte, as amostras foram centrifugadas a 12000 x g por 10 min. a 4°C, o sobrenadante foi descartado, sendo adicionado 1 mL de etanol 75% DEPC para cada 1 mL de Trizol. Posteriormente as amostras foram levadas ao vórtex por 1 minuto e meio e centrifugadas por três vezes a 4°C, 7500 x g por 5 min. O etanol foi retirado e as amostras foram secadas em temperatura ambiente. Em seguida, o *pellet* foi eluído em cerca de 15 µL de água *nuclease free* e, por fim, as amostras foram quantificadas em um espectrofotômetro *NanoDrop ND-1000 (Uniscience)*. As razões de proteína (260/230) e fenol (260/280) foram verificadas para todas as amostras e somente as que apresentaram valores de razão entre 1,8–2,2 e 1,8–2,0, respectivamente, foram utilizadas. A integridade do RNA foi avaliada por meio do kit RNA 6000 Nano (*Agilent*) utilizando o bioanalisador 2100 (*Agilent*), onde as amostras foram aplicadas em chips e analisadas segundo um valor de RIN (*RNA Integrity Number*), no qual somente as amostras que apresentaram valores de RIN>7,0 foram utilizadas.

3.4 Avaliação da expressão proteica através de Western blotting

3.4.1 Isolamento e quantificação de proteínas

Durante a fase de extração de RNA com o Trizol ocorre a formação de uma fase inferior, a fase orgânica, que contém as proteínas. Após a transferência e armazenamento do RNA, foi removida toda a fase aquosa remanescente, sendo em seguida, adicionados 0,3 mL de etanol 100% para cada 1 mL de Trizol utilizado. As amostras foram homogeneizadas vagarosamente por inversão do tubo e deixadas em repouso por cerca de 3 min. e centrifugadas por 5 min. a 2000 x g a 4°C para precipitação do DNA remanescente. Após a centrifugação, somente o sobrenadante de fenol-etanol foi transferido cuidadosamente para um novo tubo e mantido a -80°C até o momento de extração das proteínas.

Três alíquotas contendo 500 µL de cada amostra foram transferidas para três microtubos. Posteriormente, foi adicionada acetona em uma proporção de 3:1 em

cada um dos microtubos sendo a amostra homogeneizada por inversão por cerca de 15 seg. e deixada em repouso por 10 min. em temperatura ambiente. Após o período de incubação, as amostras foram centrifugadas a 12000 x g a 4°C para precipitação do *pellet* das proteínas. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e foram adicionados 500 µL de *Protein wash 1* (300mM de cloreto de guanidina em etanol 95% + 2,5% de glicerol) aos *pellets*, que foram cuidadosamente ressuspensos. Ao final do processo, mais 500 µL de *Protein wash 1* foram adicionados em cada uma das três amostras, que foram mantidas em repouso por 10 min. em temperatura ambiente. As proteínas foram novamente sedimentadas via centrifugação a 8000 x g por 5 min. e o sobrenadante foi descartado.

Em seguida, foram realizadas duas lavagens das amostras com a adição de 1 mL de *Protein wash 1* em cada um dos microtubos para ressuspensão do *pellet* e remoção de fenol residual. Após incubação por 10 min. em temperatura ambiente, as amostras foram centrifugadas a 8000 x g por 5 min. e tiveram os respectivos sobrenadantes descartados. Posteriormente, foram adicionados 1 ml de *Protein wash 2* (etanol 100% contendo 2,5% de glicerol) nas amostras, as quais foram incubadas por 10 min. e então centrifugadas a 8000 x g por 5 min. a 4°C. O sobrenadante foi descartado e os *pellets* foram deixados em temperatura ambiente secando por cerca de 10 min. Em seguida, 120 µL de dodecil sulfato de sódio (SDS) 1% (50 mg de SDS + 5 mL de água *MilliQ*) foram adicionados em um dos três *pellets*, seguindo uma homogeneização seriada e armazenamento a -20°C. As proteínas foram quantificadas utilizando o kit BSA (*Pierce*), no qual as amostras foram comparadas com a curva padrão (controle), obtida com a albumina de soro bovino, sendo a absorbância das amostras lida em um espectrofotômetro Epoch (*BioTek*).

3.4.2 Preparo das amostras e eletroforese de proteínas

A eletroforese foi realizada a 100 V por 1 hora na cuba (*XCell SureLock™ Mini-Cell – Invitrogen*) com o auxílio do gel *NuPAGE Bis-Tris Gels (Invitrogen)* com cada amostra contendo 20 µg de proteínas previamente desnaturadas a 90°C por 5 min. para, por fim, serem aplicadas no gel de eletroforese. Foram aplicados também 10 µL do marcador de peso molecular (*Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder – Thermo Fisher Scientific*). Posteriormente, foi realizada a transferência das proteínas contidas no gel para a membrana *Invitrolon PVDF (Invitrogen)* com o auxílio do sistema *XCell II™ Blot Module (Invitrogen)* com emprego de 30 V por cerca de 5 horas

para transferência completa. Por fim, a membrana foi lavada com água *MilliQ* e armazenada.

3.4.3 Imunodeteção e análise das proteínas

A imunodeteção foi realizada com o kit *Western Breeze Chromatic (Invitrogen)*. Primeiramente, foi realizado o bloqueio da membrana com 8 mL de solução de bloqueio e foi incubada por 60 min. em um agitador rotatório. Em seguida, a membrana foi lavada por duas vezes com 5 mL de água *MilliQ* por 5 min. e incubada com 4 mL do anticorpo primário *overnight*. A posteriori, foram feitas quatro lavagens de 5 min. com 5 mL de solução de lavagem *Wash Solution (Invitrogen)* e, ao final das lavagens, o excesso de solução foi retirado com auxílio de 10 mL de água *MilliQ* por 5 min. para que a membrana pudesse ser incubada com 4 mL de solução de anticorpo secundário *anti-rabbit* ou *anti-mouse (Invitrogen)* por 30 min. Novamente, a membrana foi lavada com solução de lavagem mais quatro vezes por 5 min., e logo em seguida, com água *MilliQ* por 5 min. para que as membranas fossem armazenadas para posterior marcação. Foram utilizados os seguintes anticorpos: Anti-rabbit β -Actina (proporção 1:1000 - *Cell Signaling Technology*); Anti-rabbit SOD1 (proporção 1:1000 - *Cell Signaling Technology*); Anti-rabbit SOD2 (proporção 1:5000 - *Abcam*); Anti-rabbit fosfo-NF- $\kappa\beta$ _(p65) (proporção 1:1000 - *Cell Signaling Technology*); Anti-rabbit TP53 (proporção 1:500 - *Cell Signaling Technology*); Anti-rabbit AKT (proporção 1:1000 - *Cell Signaling Technology*); Anti-rabbit fosfo-AKT_(S473) (proporção 1:1000 - *Cell Signaling Technology*); Anti-rabbit fosfo-PTEN_(S380/T382/T383) (proporção 1:1000 - *Cell Signaling Technology*); Anti-rabbit SAPK/JNK (proporção 1:1000 - *Cell Signaling Technology*); Anti-rabbit PARP (proporção 1:1000 - *Cell Signaling Technology*). A análise dos resultados foi realizada por escaneamento em um fotodocumentador *ImageQuant LAS 500 (GE Healthcare Life Sciences)* e a quantificação das bandas de proteínas foram realizadas pelo programa *Image Studio Lite Ver 5.0 (Lite Software)*. Todos os valores de expressão relativa obtidos foram normalizados com o auxílio da proteína endógena β -Actina.

3.5 Avaliação da expressão gênica através da PCR em real time

3.5.1 Reação de transcrição reversa

Inicialmente, 1 μ g de RNA de cada amostra do grupo controle (Grupo-01; n=11) e do grupo dos pacientes com DM2 (Grupo-02; n=12) foi tratado com o kit

Deoxyribonuclease I Amplification Grade (Invitrogen) para a remoção de DNA genômico por 15 min., sendo adicionados 1 μ L de tampão de reação 10x DNase I e 1 μ L de DNase I *Amplification Grade* (1 U/ μ L) para cada 1 μ g de RNA compondo um volume total de 10 μ L. Após 15 min., foi adicionado 1 μ L de EDTA em cada amostra para inativação da DNase e em seguida as amostras foram levadas ao termociclador por 10 min. a 65°C. Para proceder com a transcrição reversa das amostras foi utilizado o kit Transcriptase Reversa *High Capacity (Thermo Fisher Scientific)*, do qual foram adicionados 2 μ L de tampão de reação *10x RT buffer*, 0,8 μ L de 25x dNTP Mix (100 mM), 2 μ L de *10x RT Random Primers*, 1 μ L da enzima *Multiscribe Reverse Transcriptase* e 4,2 μ L de água *nuclease free* para cada amostra, totalizando 20 μ L de solução. Desse modo, as amostras foram submetidas ao termociclador em um processo de três etapas, sendo um ciclo de 10 min. a 25°C; um ciclo de 120 min. a 37°C e um ciclo de 5 min. a 85°C. As amostras foram armazenadas a -20°C.

3.5.2 Delineamento para construção de *primers*

Inicialmente, os genes de interesse foram selecionados no banco de dados *gene ensemble* (<http://www.ensembl.org/>), e a sequência dos éxons dos transcritos foram utilizados para gerar diferentes *primers in silico* através do software *Primer-BLAST* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). Ainda no *Primer-BLAST*, verificou-se a correspondência entre os *primers* gerados e os respectivos genes. No caso em que a sequência do *primer* pré-selecionado não correspondeu ao gene de interesse, foi considerado que o *primer* pode ser inespecífico e, desse modo, o procedimento acima foi repetido em busca de um *primer* específico.

Para a seleção dos *primers* foram utilizados os seguintes parâmetros: 1) um *amplicon* entre 80 e 150 pares de bases; 2) apresentar uma proporção entre 50 a 60% de guanina e citosina; 3) ter uma temperatura de *melting* (T_m) entre 58 e 60°C com uma variação menor que 4°C entre os *primers forward* e *reverse*; 4) priorizar a presença de guanina e citosina nas extremidades dos *primers*; 5) evitar repetições de quatro ou mais nucleotídeos iguais em sequência; 6) priorizar um comprimento entre 18 e 23 nucleotídeos; e 7) evitar que a auto complementariedade entre os nucleotídeos do *primer* seja maior ou igual a 5.

Após a seleção dos *primers* foi avaliado a presença de estruturas secundárias (*hairpin loops*, *dimers*, *bulge loops*, *internal loops*, *match sites*) no software

Generunner ver 6.5.52. Quando presentes, a T_m das estruturas secundárias deveriam estar abaixo de 0°C . No caso da T_m ser positiva os *primers* foram redesenhados. Em seguida, os *primers* foram submetidos a uma análise das estruturas secundárias com o *software Oligo Analyzer* (<https://www.idtdna.com/pages/tools/oligoanalyzer>). Nessa análise, foram escolhidos os *primers* que apresentaram estruturas secundárias com uma T_m inferior às temperaturas da reação da PCR. Outro aspecto analisado das estruturas secundárias foi o valor de ΔG , no qual foi priorizado um valor mais próximo de zero. Os *primers* foram redesenhados caso o valor de ΔG fosse igual ou menor que -9 , sendo a especificidade destes analisada pelo *Homo sapiens* (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Para isso, foram selecionados os *primers* que apresentaram uma compatibilidade com o *Homo sapiens* de 100% e uma diferença para o próximo organismo menor ou igual a 60%.

A validação dos *primers* foi realizada através da reação de PCR em tempo real, no qual foram verificadas a ausência de dímeros de *primers* ou amplificações inespecíficas por meio da análise da curva de *melting*, o qual gerou apenas um único pico. O produto da reação foi submetido a uma eletroforese em gel de agarose a 3% para verificar se o tamanho do produto correspondeu ao tamanho esperado do *amplicon* e checar a presença de uma única banda. Para análise do tamanho do produto foi empregado o *O'rangeruler 50bp DNA ladder (Sinapse)*.

3.5.3 Avaliação da expressão gênica via PCR em tempo real

A análise da expressão de genes envolvidos na via de sinalização da insulina e da via *PI3K/AKT* foi realizada em triplicata para cada amostra do grupo controle (Grupo-01; $n=11$) e do grupo dos pacientes com DM2 (Grupo-02; $n=12$). Os genes endógenos utilizados foram o *HPRT* e o *B2M* e os genes de interesse selecionados foram: *INSR*, *PIK3R1 (PI3K)*, *AKT2*, *CSNK2A1 (CK2)*, *SOD1* e *mTOR*; as sequências de *primers* são apresentadas na **tabela 1**. Inicialmente, um mix foi preparado para cada gene, no qual foram adicionados $7,5 \mu\text{L}$ de *Sybr Green*, $0,75 \mu\text{L}$ de *Primer Forward* (750 nM) e de *Primer Reverse* (750 nM), $3 \mu\text{L}$ de água *nuclease free*, totalizando um volume final de $12 \mu\text{L}$. O mix foi homogeneizado com o auxílio do vórtex e as amostras foram centrifugadas. $12 \mu\text{L}$ do mix previamente preparado foram adicionados a cada um dos poços da placa *MicroAmp™ Optical 96-well Reaction Plate (Thermo Fisher)* e, em seguida, foram adicionados $3 \mu\text{L}$ de cDNA (30 ng) de cada amostra, compondo um volume final de $15 \mu\text{L}$. Após a adição do mix e das amostras,

a placa foi selada com *MicroAmp® Optical Adhesive Film*, centrifugada a 699 x g por 1 min. Por fim, a placa foi submetida ao termociclador *QuantStudio 3 (Applied Biosystems)* no qual as amostras passaram por 1 ciclo a 50°C por 2 min., 1 ciclo a 95°C por 2 min., 40 ciclos a 95°C por 1 seg. e 60°C por 30 seg. Para a curva de *melting*, a reação ocorreu por 1 ciclo a 95°C por 15 seg., 1 ciclo a 60°C por 1 min. e, por último, 1 ciclo a 95°C por 15 seg.

Os genes endógenos HPRT e B2M foram utilizados para a normalização da expressão gênica e o programa *Relative Quantification app (Thermo Fisher)* foi empregado para o cálculo de normalização e quantificação da expressão gênica relativa.

Tabela 1: Sequências dos *primers* para a realização da PCR em tempo real

<i>Primers</i>	5' – <i>Forward</i> – 3'	5' – <i>Reverse</i> – 3'
<i>INSR</i>	AAC TAC TCC TTC TAT GCC TTG G	TGA GTG ATG GTG AGG TTG TG
<i>PIK3R1</i>	GAT ACA GCA GAC GGG ACC TT	AGG TTA ATG GGT CAG AGA AGC
<i>AKT2</i>	CCA AAC TGT CCT CAC CCT AT	TGG AAG GAA GCC CTA GTA AG
<i>CSNK2A1</i>	TGA AGG ACC AGG CTC GAA TG	GCA CTG AAG AAA TCC CTG ACA T
<i>SOD1</i>	GGG CCT CAG ACT ACA TCC AA	GGC AAA GGT GGA AAT GAA GA
<i>MTOR</i>	GGA CCA CAG TGC CAG AAT CT	CAT GAG AGA AGT CCC GAC CA
<i>HPRT</i>	TGG ACA GGA CTG AAC GTC TT	GAG CAC ACA GAG GGC TAC AA
<i>B2M</i>	AGG CTA TCC AGC GTA CTC CA	TCA ATG TCG GAT GGA TGA AA

3.6 Análise estatística

Os dados de expressão proteica ou transcricional, os quais foram obtidos para as amostras analisadas de ambos os grupos de indivíduos, pacientes com DM2 e controles, foram apresentados como média ± erro padrão (EP). A normalidade foi testada pelo teste de Shapiro-Wilk e para as variáveis com distribuição normal, a análise empregada foi o teste paramétrico, teste-t; para análises com distribuição assimétrica, aplicou-se o teste não paramétrico de Mann-Whitney, considerando um nível de significância de 5% para ambos os métodos. Todas as análises foram realizadas utilizando o software *Prism v. 5.0 (GraphPad Software)*.

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1 Caracterização dos grupos estudados

Inicialmente, foram realizadas comparações entre os grupos com relação à idade, glicemia, IMC (Índice de massa corporal) e HbA1c para a caracterização dos portadores de DM2 (Grupo-02) e indivíduos controles (Grupo-01). Não houve diferença significativa entre a idade média dos pacientes com DM2 (58 ± 5 anos) comparada com a apresentada pelos indivíduos do grupo controle (57 ± 7 anos). Foram observadas diferenças significativas quanto aos valores médios da glicemia (188 ± 75 , $p < 0,01$), IMC (27 ± 2 , $p < 0,001$) e HbA1c (9 ± 2 , $p < 0,0001$) dos pacientes com DM2 quando comparados ao grupo controle (glicemia: 101 ± 13 ; IMC: 23 ± 2 ; e HbA1c: $5 \pm 0,3$) (Tabela 2, 3 e 4).

Tabela 2: Comparação das características clínicas (médias) e idade dos indivíduos do grupo controle (Grupo-01; n=11) e de pacientes com DM2 (Grupo-02; n=12)

Variáveis	Controle	Pacientes com DM2	p-valor
Idade	$57,0 \pm 5,0$	$58,0 \pm 5,0$	N.S.
IMC (Kg/m ²)	$23,0 \pm 2,0$	$27,0 \pm 2,0^{**}$	0,0005
Glicemia (mg/dL)	$101,0 \pm 13,0$	$188,0 \pm 75,0^*$	0,0017
Hb1Ac (%)	$5,0 \pm 0,3$	$9,0 \pm 2,0^{***}$	<0,0001

IMC: Índice de massa corporal; Hb1Ac: Hemoglobina glicada; N.S.: Não significativo. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,0001$ indicam diferenças significativas quando comparados ao grupo controle.

Tabela 3: Características clínicas do grupo controle (Grupo-01)

Indivíduo	Sexo	Idade (anos)	IMC	Glicemia (mg/dL)	Hb1Ac (%)
C-01	M	50	23,4	80,0	4,7
C-02	M	59	27,8	85,0	4,8
C-03	F	56	22,1	N.E.*	5,0
C-04	F	67	22,5	99,0	5,6
C-05	M	63	22,1	99,0	5,5
C-06	F	63	25,5	126,0	5,6
C-07	M	48	N.E.*	88,0	5,0
C-08	M	56	22,2	102,0	5,3
C-09	F	57	22,2	89,0	5,5
C-10	F	47	21,8	104,0	5,0
C-11	M	59	18,5	95,0	5,4

*N.E.: Não especificado; IMC: Índice de massa corporal; Hb1Ac: Hemoglobina glicada.

Tabela 4: Características clínicas dos pacientes com DM2 (Grupo-02)

Indivíduo	Sexo	Idade (anos)	IMC	Glicemia (mg/dL)	Hb1Ac (%)
DM2-01	F	56	26,6	359,5	11,6
DM2-02	F	64	26,6	146,0	7,8
DM2-03	F	54	29,9	245,0	10,1
DM2-04	M	54	29,9	240,0	9,4
DM2-05	F	53	24,9	193,0	13,4
DM2-06	M	54	28,6	168,0	8,5
DM2-07	M	62	28,7	107,0	8,1
DM2-08	F	55	28,1	245,0	10,7
DM2-09	M	62	25,9	139,6	7,8
DM2-10	M	52	26,9	147,7	7,7
DM2-11	M	67	23,4	189,9	9,4
DM2-12	M	62	29,1	87,0	6,9

*N.E.: Não especificado; IMC: Índice de massa corporal; Hb1Ac: Hemoglobina glicada.

4.2 Avaliação dos níveis de expressão proteica

Os seguintes resultados foram obtidos quanto às análises dos níveis de expressão de proteínas envolvidas no sistema antioxidante (SOD1 e SOD2; **Figura 3**), vias de resposta a danos ao DNA (PARP1 e TP53; **Figura 4**), via da insulina (AKT, pAKT; **Figura 5** e pPTEN; **Figura 6**), via de inflamação (NF- κ B; **Figura 6**) e via de estresse celular (SAPK/JNK; **Figura 7**).

Foi observado um aumento significativo na expressão de SOD2 (~24%, **Figura 3** e **Tabela 5**, $p < 0,05$) nos pacientes com DM2 em relação aos indivíduos saudáveis. O aumento de expressão de SOD2 mostra que os pacientes com DM2 apresentaram um aumento na resposta antioxidante mitocondrial. No entanto, apesar de uma tendência de aumento da SOD1 ($p = 0,08$), proteína antioxidante presente no citosol da célula, esta não apresentou uma diferença significativa entre os dois grupos estudados (**Figura-3**).

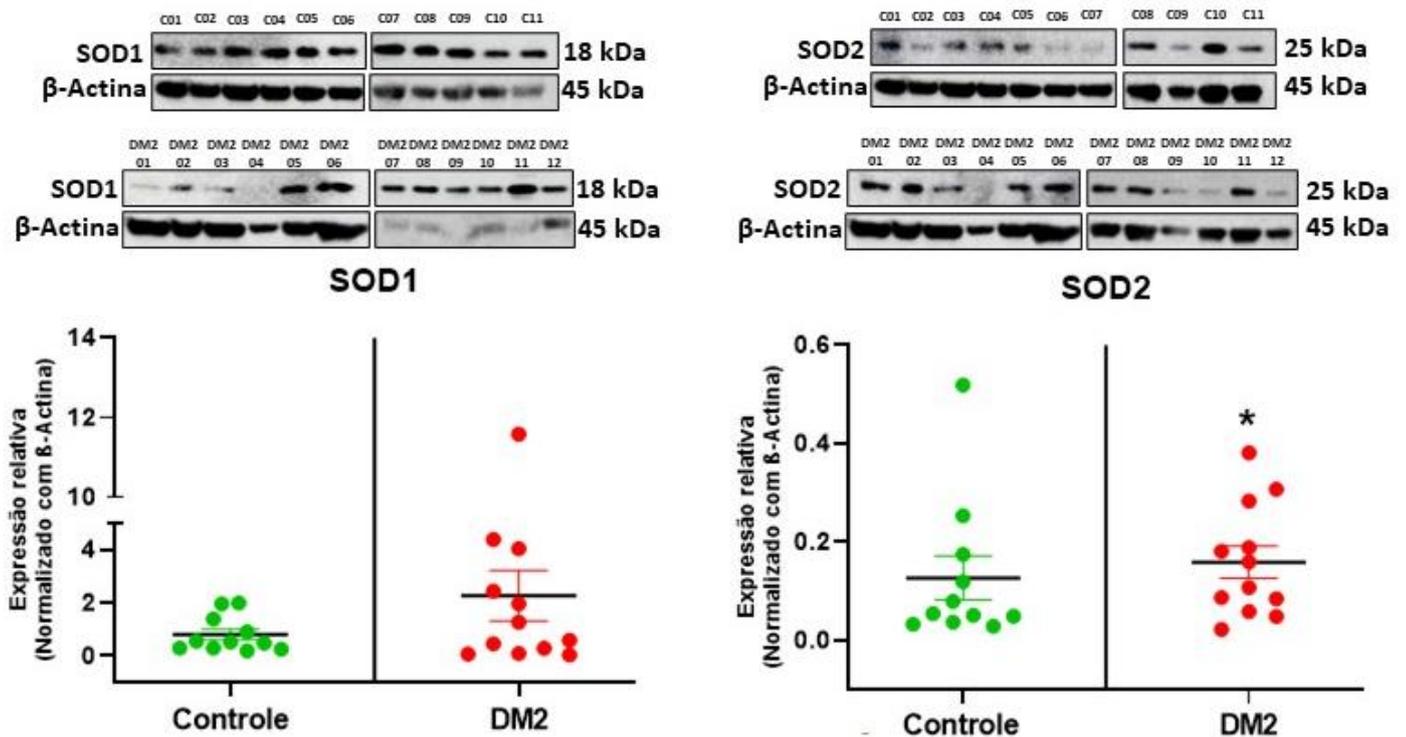


Figura 3: Expressão proteica avaliada em PBMCs do grupo de pacientes com DM2 (n=12) e grupo controle (n=11) analisada por *Western Blotting* e posteriormente quantificada pelo *software Image Studio Lite ver 5.0 (Lite Software)*. Expressão de SOD1 (~18 kDa) e SOD2 (~25 kDa). Para as análises estatísticas foi utilizado o Teste t. * $p < 0,05$. C: Indivíduos do grupo Controle; DM2: Pacientes com DM2; 01: Representa o número dos indivíduos dentro de cada grupo.

Foi também avaliada a expressão de proteínas envolvidas nas vias de resposta a danos no DNA, sendo observado um aumento significativo na expressão de PARP1 (~385%, **Figura 4**, $p < 0,05$) nos pacientes com DM2 em relação aos indivíduos saudáveis. Esse resultado indica um maior recrutamento de PARP1 (proteína que atua na iniciação de vias de reparo do DNA) em pacientes com DM2, podendo indicar a necessidade de reparo de danos no DNA. Porém, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos avaliados quanto à proteína TP53 (**Figura 4** e **Tabela 5**), que atua bloqueando a progressão do ciclo celular. Entretanto, houve uma grande variação nos valores de expressão entre os pacientes com DM2, sendo que 50% deles apresentaram níveis mais elevados.

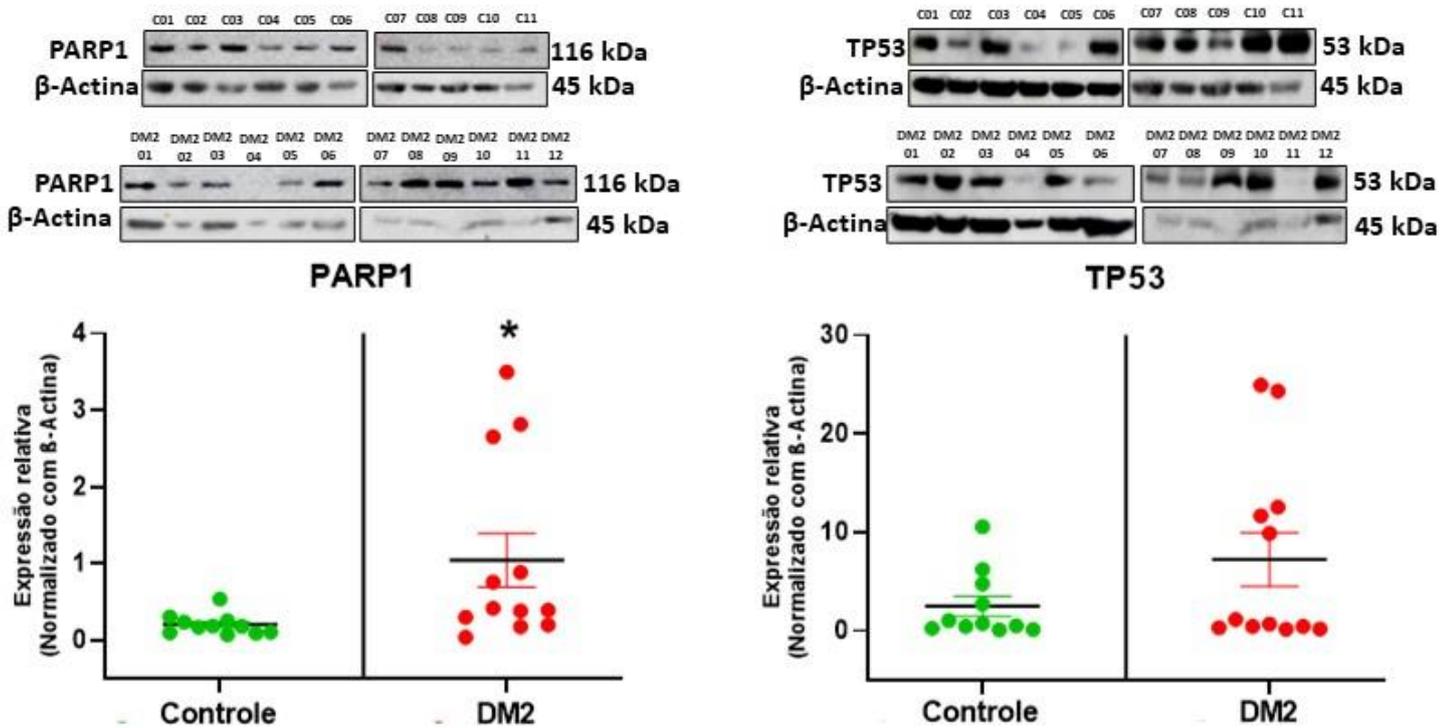


Figura 4: Expressão proteica avaliada em PBMCs do grupo de pacientes com DM2 (n=12) e grupo controle (n=11) analisada por *Western Blotting* e posteriormente quantificada pelo *software Image Studio Lite ver 5.0 (Lite Software)*. Expressão de PARP1 (~116 kDa) e TP53 (~53 kDa). Para as análises estatísticas foi utilizado o Teste t. * $p < 0,05$. C: Indivíduos do grupo Controle; DM2: Pacientes com DM2; 01: Representa o número dos indivíduos dentro de cada grupo.

Para as proteínas AKT total, que atuam na via da insulina, e para a proteína pAKT, forma ativa da proteína AKT, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos avaliados (**Figura 5 e Tabela 5**), havendo uma grande variação de expressão entre indivíduos, em ambos os grupos.

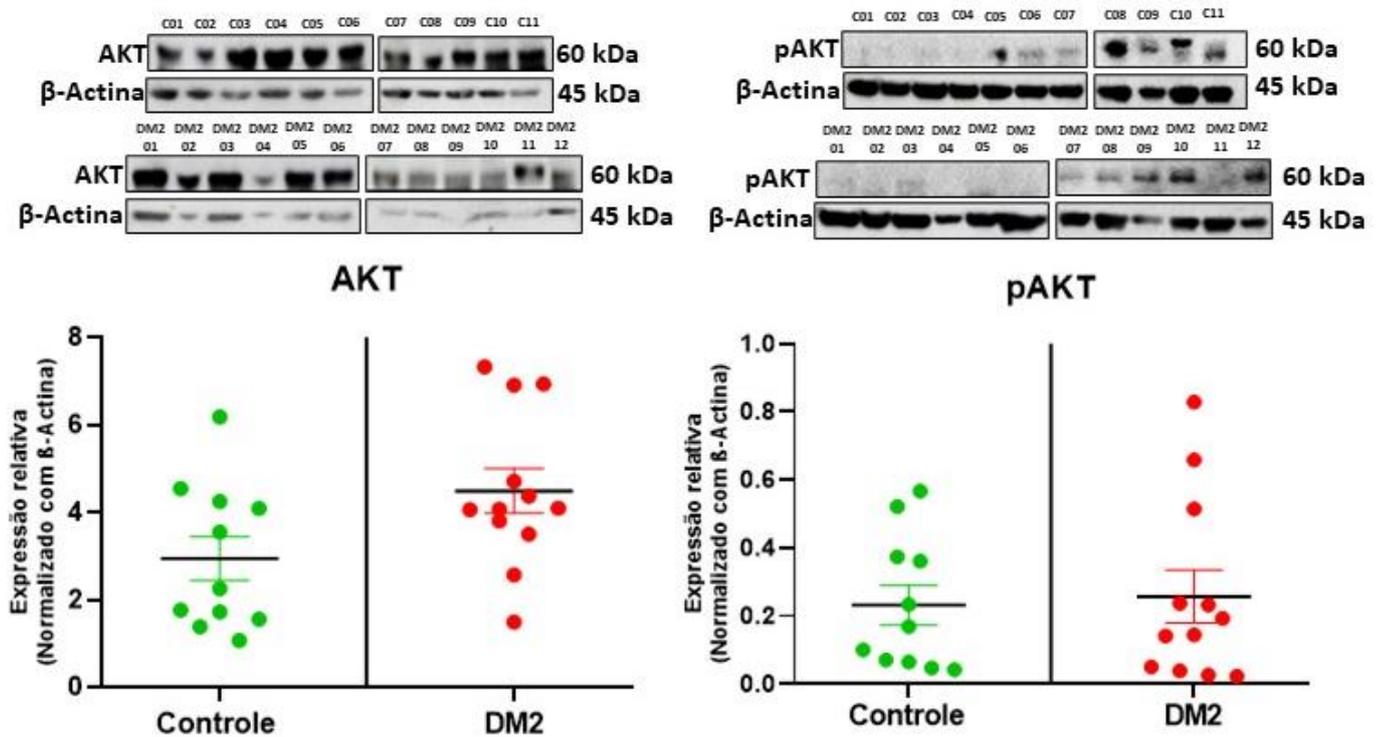


Figura 5: Expressão proteica avaliada em PBMCs do grupo de pacientes com DM2 (n=12) e grupo controle (n=11) analisada por *Western Blotting* e posteriormente quantificada pelo *software Image Studio Lite ver 5.0 (Lite Software)*. Expressão de AKT (~60 kDa) e Fosfo-AKT_(S473) (~60 kDa). Para as análises estatísticas foi utilizado o Teste t. *p < 0,05. C: Indivíduos do grupo Controle; DM2: Pacientes com DM2; 01: Representa o número dos indivíduos dentro de cada grupo.

Ainda, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos avaliados quanto à proteína pPTEN (**Figura 6 e Tabela 5**), principal antagonista da via da insulina e que atua impedindo a sua ativação. No entanto, foi observado um aumento significativo (cerca de 4 vezes) na expressão de fosfo-NF- κ B (**Figura 6 e Tabela 5**) nos pacientes com DM2 em relação aos indivíduos saudáveis. O aumento na expressão de fosfo-NF- κ B pode indicar maior ativação de vias de inflamação nos pacientes com DM2. Nota-se que para os indivíduos controles, houve pouca variação interindividual, ao contrário dos pacientes com DM2.

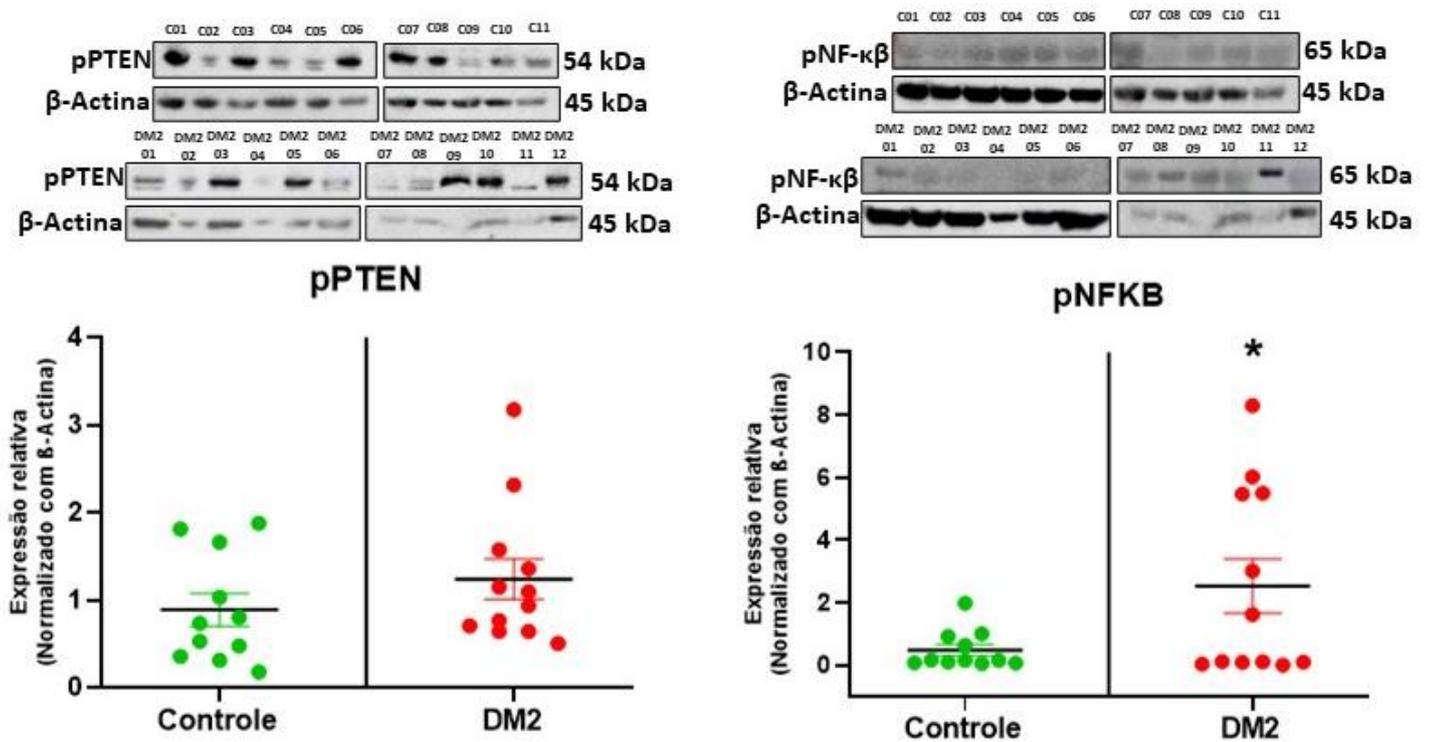


Figura 6: Expressão proteica avaliada em PBMCs do grupo de pacientes com DM2 (n=12) e grupo controle (n=11) analisada por *Western Blotting* e posteriormente quantificada pelo *software Image Studio Lite ver 5.0 (Lite Software)*. Expressão de Fosfo-PTEN_(S380/T382/T383) (~54 kDa) e Fosfo-NF-κβ_(p65) (~65 kDa). Para as análises estatísticas foi utilizado o Teste t. *p < 0,05. C: Indivíduos do grupo Controle; DM2: Pacientes com DM2; 01: Representa o número dos indivíduos dentro de cada grupo.

Por fim, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos avaliados quanto à proteína pSAPK/JNK (**Figura 7 e Tabela 5**), que atua como sensor de estresse celular, sendo recrutada em condições de estresse oxidativo.

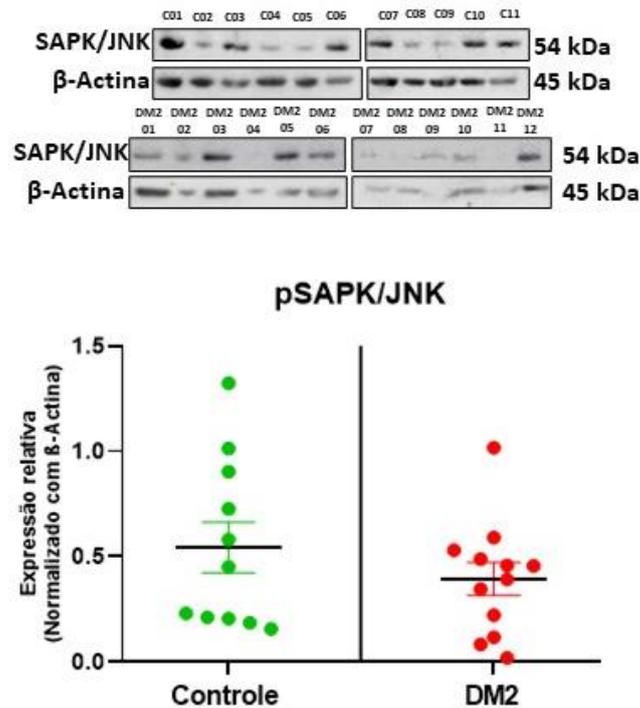


Figura 7: Expressão proteica avaliada em PBMCs do grupo de pacientes com DM2 (n=12) e grupo controle (n=11) analisada por *Western Blotting* e posteriormente quantificada pelo *software Image Studio Lite ver 5.0 (Lite Software)*. Expressão de Fosfo-SAPK/JNK (~54 kDa). Para as análises estatísticas foi utilizado o Teste t. *p < 0,05. C: Indivíduos do grupo Controle; DM2: Pacientes com DM2; 01: Representa o número dos indivíduos dentro de cada grupo.

Tabela 5: Valores de expressão proteica em PBMCs de indivíduos do grupo controle (Grupo-01; n=11) e de pacientes com DM2 (Grupo-02; n=12)

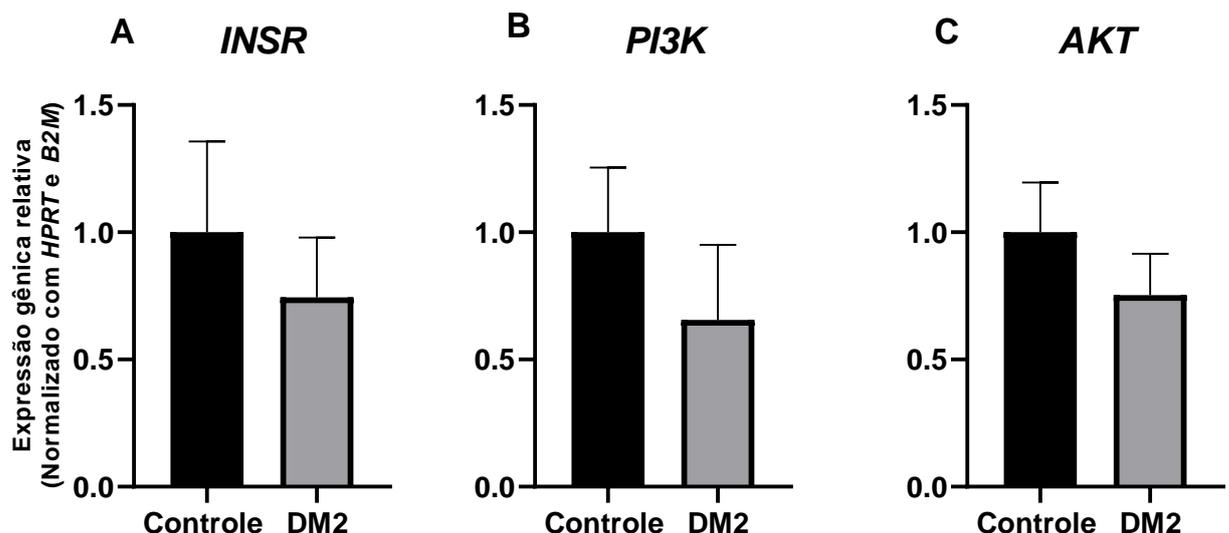
Valores de expressão proteica relativa normalizados com a proteína endógena β -Actina		
Proteínas	Controle	Pacientes com DM2
SOD1	0,80 \pm 0,20	2,26 \pm 0,92
SOD2	0,13 \pm 0,04	0,16 \pm 0,03*
PARP1	0,20 \pm 0,04	1,04 \pm 0,34*
TP53	2,49 \pm 1,02	7,22 \pm 2,62
AKT	2,94 \pm 0,50	4,49 \pm 0,49
pAKT	0,23 \pm 0,06	0,26 \pm 0,07
pPTEN	0,89 \pm 0,19	1,24 \pm 0,22
pNF- κ B	0,48 \pm 0,18	2,53 \pm 0,84*
pSAPK/JNK	0,54 \pm 0,12	0,39 \pm 0,08

*p<0,05, indica diferença significativa quando comparados ao grupo controle. Valores representados em média \pm erro padrão.

4.3 Avaliação da expressão gênica transcricional

A expressão de genes ao nível transcricional foi avaliada para genes participantes de vias de resposta ao estresse oxidativo (*SOD1*), da via da insulina (*INSR*, *PI3K*, *AKT* e *CK2*) e do metabolismo celular (*mTOR*) (**Figura 4** e **Tabela 6**). Os valores médios da expressão dos genes endógenos, o *HPRT* e o *B2M*, foram utilizados para a normalização dos dados e na obtenção do valor de ΔCt , que é necessário para posterior quantificação relativa da expressão dos genes de interesse.

Nos pacientes com DM2 foi observada uma redução significativa nos níveis de expressão gênica transcricional do gene *SOD1* ($p < 0,05$, *Fold-change* = 0,597, **Figura 4E** e **Tabela 6**), que codifica a SOD1, a qual atua no sistema antioxidante. O nível de expressão do gene *mTOR* também revelou uma redução significativa ($p < 0,05$, *Fold-change* = 0,553, **Figura 4F** e **Tabela 6**) nos níveis de expressão gênica, comparada ao grupo controle, indicando uma possível alteração na via de sinalização do metabolismo celular de pacientes com DM2. Contudo, as análises dos genes essenciais para a via da insulina, *INSR*, *PI3K* e *AKT*, não mostraram alterações significativas nos níveis de expressão gênica entre os grupos analisados.



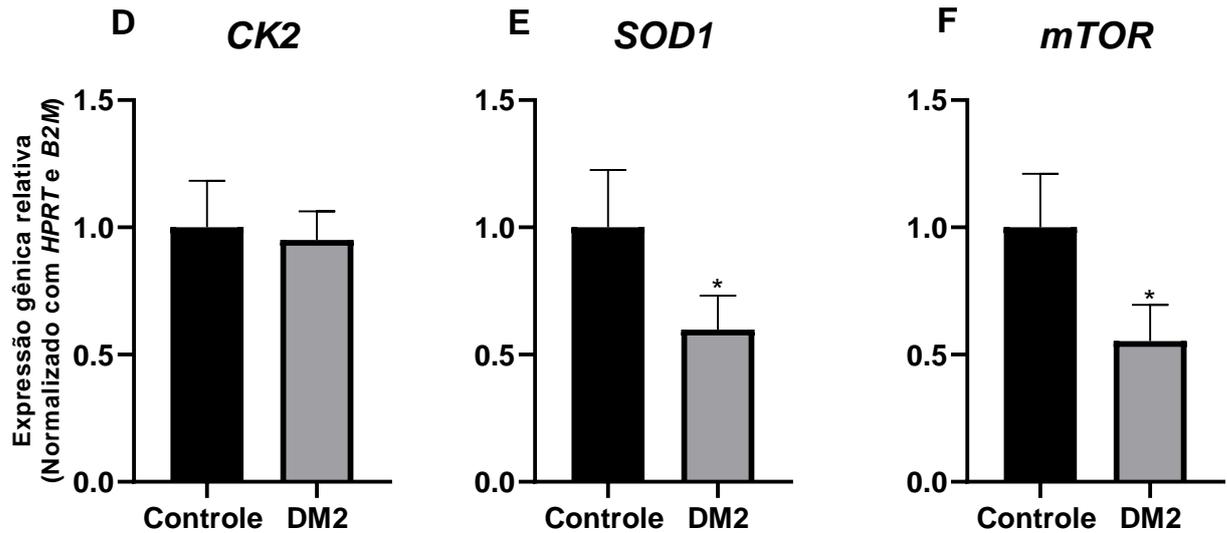


Figura 8: Expressão gênica transcricional relativa avaliada em PBMCs de pacientes com grupo DM2 (n=12) e o grupo controle (n=11) e analisadas por *qRT-PCR* e pelo programa *Relative Quantification app* (*Thermo Fisher*). **(A)** Expressão gênica de *INSR* (*Insulin Receptor*), **(B)** *PI3K* (*Phosphoinositide 3-kinase*) **(C)** *AKT* (*Protein Kinase B*) **(D)** *CK2* (*Casein Kinase 2*) **(E)** *SOD1* (*Superoxide Dismutase 1*) **(F)** *mTOR* (*mammalian Target of Rapamycin*). Os valores de expressão foram normalizados de acordo com a expressão dos genes endógenos *HPRT* e *B2M*. Para as análises estatísticas foi utilizado o Teste t. * $p < 0,05$.

Tabela 6: Valores de expressão gênica transcricional em PBMCs de indivíduos do grupo controle (Grupo-01; n=11) e de pacientes com DM2 (Grupo-02; n=12)

Valores de expressão gênica relativa normalizados com os genes <i>HPRT</i> e <i>B2M</i>		
Gene	Nome	Log2 (FC)
<i>INSR</i>	<i>Insulin receptor</i>	0,75
<i>PI3K</i>	<i>Phosphoinositide 3-kinase</i>	0,65
<i>AKT</i>	<i>Serin/threonine protein kinase</i>	0,75
<i>CK2</i>	<i>Casein kinase II</i>	0,95
<i>SOD1</i>	<i>Superoxide dismutase type 1</i>	0,60*
<i>mTOR</i>	<i>Mammalian target of rapamycin</i>	0,55*

* $p < 0,05$, indica diferença significativa em comparação ao grupo controle. Valores representados em \log^2 – *Fold-Change* (FC).

DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

A maior prevalência de DM2 ocorre entre 50 e 70 anos de idade dos pacientes, sendo essa faixa etária mais crítica para o desenvolvimento da doença (IDF, 2021).

Os indivíduos com DM2 que não conseguem controlar os níveis glicêmicos apresentam a condição de hiperglicemia crônica ao longo dos anos (Huang, 2018), o que contribui progressivamente para o aumento na produção de ROS e de citocinas pró-inflamatórias, que estão envolvidas com a maior ocorrência de danos ao DNA (Rolo et al., 2006). O estado hiperglicêmico junto ao declínio metabólico, a redução das defesas antioxidantes e de reparo no DNA, e o avanço progressivo da idade, tornam os portadores de DM2 mais suscetíveis ao acúmulo de danos moleculares e celulares, ocorrendo inevitavelmente a progressão da doença ao longo dos anos (Hançer et al., 2014).

Nesse estudo, foram avaliadas amostras de sangue de 12 indivíduos com de DM2 e 11 indivíduos controles. Utilizando a técnica de Western blotting, o qual detecta a presença de níveis relativos de proteínas específicas, e PCR em tempo real, que detecta os níveis relativos de expressão gênica, buscamos possíveis alterações nos níveis de expressão de proteínas e genes da via da insulina, do sistema de reparo do DNA e do sistema antioxidante em PBMCs de pacientes com DM2 e controles.

É conhecido na literatura científica que em pacientes com DM2 os níveis de pró oxidantes, tais como o ânion superóxido (O_2^-) e a hidroxila (OH), são mais elevados (Aguer et al., 2013; Cucak et al., 2019). Em níveis aumentados, estes são capazes de provocar estresse oxidativo, condição na qual o estado pró oxidante ultrapassa a capacidade antioxidante do organismo (Włodarczyk & Nowicka, 2019). O estresse oxidativo tem como consequência a indução de danos oxidativos no DNA, além de contribuir para um aumento da condição inflamatória do paciente (Zhou et al., 2016). Desse modo, torna-se pertinente analisar o papel de algumas proteínas antioxidantes em pacientes com DM2

Neste estudo foi observado que os pacientes com DM2 apresentaram um aumento significativo na expressão da proteína SOD2, a qual faz parte do sistema antioxidante e é responsável por catalisar a reação do ânion superóxido em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e oxigênio (O_2) (Jabeen et al., 2012). O aumento na expressão de proteínas do sistema antioxidante é condizente com o estado de hiperglicemia crônica, uma vez que um maior fluxo de glicose circulante tem o potencial de induzir a disfunção mitocondrial (Ma et al., 2012), condição que está atrelada à maior

produção de ROS pela mitocôndria, principalmente de ânion superóxido. Desse modo, é possível que o aumento da expressão de SOD2 nos pacientes com DM2 tenha ocorrido em consequência da geração aumentada de ROS na mitocôndria. Outros autores observaram aumento na expressão do gene *SOD2* em células epiteliais (Takematsu et al., 2020) e em PBMCs (Lima et al., 2019) de pacientes com DM2, enquanto em outros estudos nenhuma variação significativa na expressão transcricional do gene *SOD2* foi encontrada em adipócitos cultivados *in vitro* (Michurina et al., 2020) e em PBMCs (Xavier et al., 2015) de pacientes com DM2. Essas informações também ressaltam a necessidade de verificar o mesmo marcador em diferentes tecidos e tipos celulares de pacientes com DM2.

Ao avaliar a presença de ânion superóxido, Seyyedebrahimi et al. (2018) observaram maiores níveis em PBMCs de pacientes com DM2 em relação aos controles. Sendo assim, níveis aumentados de SOD2, que catalisa a conversão de superóxido em peróxido de hidrogênio, em pacientes com DM2 pode indicar uma ativação da resposta antioxidante nos pacientes.

Ainda, ao analisar o nível relativo da expressão da proteína SOD1, enzima antioxidante encontrada principalmente no citosol das células, curiosamente esta não apresentou diferença significativa entre os grupos estudados. Contudo, foi observada uma redução significativa no nível de expressão do gene que codifica essa proteína. Semelhante ao que foi encontrado neste estudo, Suri et al. (2021) também observaram uma redução significativa da expressão do gene *SOD1* em sangue total de pacientes com DM2. Além disso, Michurina et al. (2020) e Xavier et al. (2015) não detectaram diferenças significativas no nível de expressão transcricional do gene *SOD1* em adipócitos cultivados *in vitro* e em PBMCs, respectivamente, de pacientes com DM2. A redução da expressão da proteína SOD1 em pacientes com DM2 tem o potencial de contribuir para a intolerância à glicose ao não catalisar adequadamente os pró-oxidantes (Muscogiuri et al., 2013). Desse modo, é possível que a menor expressão de *SOD1* possa contribuir para a progressão da doença. Para isso, um maior número amostral é essencial para melhor compreender o papel da SOD1 no DM2.

Ressalta-se que poucos estudos avaliaram as isoformas da proteína SOD (SOD1 e SOD2) no DM2 (Mozzini et al., 2015; El-Gharbawy et al., 2016; Grindel et al., 2016; Sindhu et al., 2018; Sireesh et al., 2018; Liu et al., 2019) tal como foi realizado neste estudo. Ambas as isoformas de SOD estão localizadas em regiões celulares

diferentes; enquanto a SOD1 está presente no citosol da célula, a SOD2 se localiza especificamente no interior da mitocôndria, uma organela amplamente afetada pelo DM2, o que ressalta a necessidade de SOD1 e SOD2 serem avaliadas de forma distinta.

Há um amplo corpo de informações na literatura que demonstram que elevados níveis de ROS têm o potencial de provocar danos às macromoléculas, como o DNA, lipídios e proteínas (Rolo et al., 2006; Wlodarczyk & Nowicka, 2019). Nesse contexto, destaca-se a proteína PARP1, que é conhecida por atuar como um sensor de danos ao DNA e por participar da ativação das vias de reparo por excisão de nucleotídeos e de bases, bem como do reparo de quebras simples e duplas (Chaitanya et al., 2010; Aleksandrov et al., 2018). Neste trabalho, os pacientes com DM2 apresentaram níveis aumentados da expressão da proteína PARP1 quando comparados aos controles. Similarmente, outros autores também observaram elevada expressão do gene *PARP1* em PBMCs de pacientes com DM2 (Tempera et al., 2005; Adaikalakoteswari et al., 2007).

Alguns estudos relataram que a atividade enzimática de PARP1 foi reduzida em pacientes com DM2 (Tempera et al., 2005; Tarquini et al., 2013), indicando uma possível redução da ativação das vias de reparo do DNA em pacientes. Sendo assim, a expressão aumentada dessa proteína em pacientes com DM2 pode ser um indicador de danos frequentes ao DNA, quadro condizente com maiores níveis de ROS presentes em pacientes com DM2 (Jabeen et al., 2012). De fato, já foi observado que pacientes com DM2 apresentam níveis aumentados de danos no DNA, incluindo danos por lesões oxidativas (Xavier et al., 2014; 2015). Há evidências de que a via de reparo por excisão de bases é a via mais ativa para o reparo de lesões de bases oxidadas em pacientes com DM2 (Merecz et al., 2015), o que explicaria uma maior ativação de PARP1.

Alguns estudos relatam uma redução significativa de TP53 em PBMCs de pacientes portadores de DM2 (Turacli et al., 2018; Dubayee et al., 2020). Entretanto, ao avaliar os níveis de expressão da proteína TP53 no presente estudo não foram observadas diferenças significativas entre os grupos de pacientes com DM2 e controles, de modo semelhante ao que foi visto por Lima et al. (2019). A proteína TP53 é conhecida por atuar no bloqueio do ciclo celular em resposta ao estresse celular para permitir a atividade de reparo de danos ao DNA (Huang., 2008; Turacli et al., 2018). Além disso, TP53 pode também atuar em vias pró-apoptóticas, auxiliando na

indução de morte da célula a depender dos níveis de estresse celular (Shimizu et al., 2012). A ativação de NF- κ B é capaz de reduzir a atividade de TP53 (Dubayee et al., 2020). No presente estudo, foi observado um aumento significativo da proteína NF- κ B fosforilada, sugerindo que a mesma possa estar relacionada à ação de TP53, mas a interação entre NF- κ B e TP53 ainda requer estudos adicionais.

Em concordância com este estudo, Cheng et al. (2022) também observaram níveis aumentados de NF- κ B fosforilada em PBMCs de pacientes com DM2, sendo esta associada ao aumento da resistência à insulina devido à inibição da proteína IRS (Cheng et al., 2022). Tem sido relatado na literatura que a hiperglicemia crônica, bem como o estresse oxidativo, têm o potencial de induzir o aumento da inflamação por meio da via de NF- κ B (Huang, et al., 2008), indicando que níveis aumentados de NF- κ B observados em pacientes deste estudo possam estar relacionados com o processo de inflamação em DM2.

Por outro lado, há evidências de que a redução da geração de ROS mitocondrial em PBMCs contribui para a redução da ativação da proteína NF- κ B (Dasu et al., 2008; Kuzmicki et al., 2013), indicando que, ao contrário, o aumento de ROS possa estar correlacionado à ativação de NF- κ B. Ainda, foi demonstrado que a interação física da proteína PARP1 com NF- κ B, formando um complexo PARP1/NF- κ B, aumenta a afinidade desta última com o DNA, modulando positivamente a expressão de algumas citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-1 e IL-6) (Huang, et al., 2008; Giansanti, et al., 2010). Desse modo, é possível inferir que a expressão aumentada e interação entre NF- κ B e PARP1 possam provavelmente contribuir para o aumento do estado inflamatório em pacientes com DM2.

A via da insulina é a mais afetada com o estabelecimento do DM2, sendo, portanto, relevante o estudo dos principais componentes dessa via, as proteínas INSR, PI3K, AKT e PTEN (Huang, et al., 2018), as quais foram analisadas neste estudo. O adequado acoplamento da insulina em seu receptor é crucial para o recrutamento da via da insulina. Neste estudo, não foram observadas diferenças significativas quanto ao nível de expressão do gene *INSR*, que codifica a proteína INSR, entre os grupos de pacientes com DM2 e controles analisados. Por outro lado, Modestino et al. (2018) observaram uma redução nos níveis de expressão da proteína INSR em PBMCs de pacientes com DM2. Em análises *in vitro* de células HepG2 foi observada uma maior clivagem da proteína INSR quando as células foram expostas a elevados níveis de glicose (Yuasa et al., 2014). É possível que a expressão reduzida

da proteína INSR possa estar relacionada a uma menor expressão gênica ao nível transcricional, cabendo futuras investigações.

Com relação ao estudo de expressão transcricional, neste estudo não foram observadas diferenças significativas nos níveis de expressão do gene *PIK3R1*, que codifica a proteína PI3K, em PBMCs de pacientes com DM2. Por outro lado, Lu et al. (2021) observaram uma redução significativa na expressão do gene *PIK3R1* em PBMCs de pacientes com DM2, indicando uma possível redução da atividade transcricional desse gene em virtude da menor ativação da via da insulina no DM2. Sua função na via da insulina se dá pela conversão da proteína PIP2 em PIP3 e, por conseguinte, PIP3 fosforila e ativa AKT. Para uma melhor compreensão do papel da expressão transcricional *PIK3R1* se faz necessário um número amostral maior, uma vez que este estudo não observou diferenças significativas entre os grupos estudados.

De modo semelhante à PI3K, a análise não revelou diferença significativa quanto aos níveis proteicos de AKT2 e AKT2 fosforilada (pAKT) nos PBMCs dos pacientes analisados. Alguns autores observaram uma redução da proteína AKT (Lima-Cabello et al., 2016; Yin et al. 2018), embora alguns estudos apontem uma maior expressão da proteína pAKT (Wang et al., 2018), outros indicaram a falta de alterações significativas em PBMCs de pacientes com DM2 (Pietrani et al., 2015; Vatseba et al., 2020). Também não foi observada diferença significativa quanto à expressão do gene *AKT2*, que codifica a proteína AKT2. Lu et al. (2021) observaram uma redução da expressão do gene *AKT* em PBMCs de pacientes. Ainda não há consenso na literatura em relação aos níveis de expressão da proteína AKT e pAKT. Essas discrepâncias entre os resultados obtidos por diferentes autores indicam a necessidade de estudos mais específicos e aprofundados, usando outros métodos de análise, visando compreender o papel da proteína AKT no DM2.

A análise da proteína PTEN fosforilada (pPTEN) não revelou diferença quanto aos níveis de expressão proteica em PBMCs de pacientes com DM2 e controles, ao contrário do observado por Yin et al. (2018); esses autores observaram aumento significativo na expressão da proteína PTEN total em PBMCs de pacientes. Outros autores (Su et al., 2015) relataram aumento na expressão transcricional de *PTEN* em camundongos com DM2. A proteína PTEN possui um papel fundamental na regulação da via da insulina, atuando como antagonista da atividade da proteína PI3K, impedindo a ativação da proteína AKT via conversão de PIP3 em PIP2. Com o aumento da expressão de PTEN relatado por Yin et al. (2018) e do aumento da

expressão transcricional observado por Su et al (2015), também era esperado um provável aumento na expressão de pPTEN, o que não foi observado neste estudo. Pode-se supor que algum mecanismo de regulação possa estar atuando. Além disso, o gene *CSNK2A1* (que codifica a proteína CK2, é responsável por fosforilar e inativar PTEN) (Miller et al., 2002) não apresentou diferenças quanto aos níveis de expressão gênica em PBMCs de pacientes com DM2 no presente estudo. Análises adicionais são requeridas para melhor compreender a relação entre a proteína PTEN e a proteína CK2 relativas ao papel destas na via da insulina.

Os resultados do estudo de Borgo et al. (2017) mostram que a proteína CK2, quando inibida *in vitro* em adipócitos, hepatócitos e tecido muscular esquelético de camundongos, resulta na redução da atividade da proteína AKT e no aumento da atividade da proteína PTEN. Existem dados na literatura que demonstram a relevância da proteína CK2 pela sua atuação direta na via da insulina, assim como por participar do processo de depleção da proteína GLUT4, que atua na captação de glicose extracelular, através da estimulação crônica da insulina *in vitro* em adipócitos da linhagem 3T3-L1 (Ma et al., 2014; Borgo et al., 2017).

A proteína CK2 pode ser ativada pela citocina TNF- α , cuja expressão é modulada por NF- κ B, resultando na modulação da inflamação via fosforilação da proteína SIRT1, que inibe a atividade da proteína NF- κ B *in vivo* em camundongos (Shu et al., 2017). Desse modo, a atuação da proteína CK2 em vias que estão relacionadas à via da insulina e, por conseguinte, ao DM2, ressalta a importância da avaliação dessa proteína e de seu papel em humanos.

Neste trabalho, foi observada uma expressão reduzida do gene *mTOR*, que codifica a proteína mTOR, em PBMCs de pacientes com DM2. Por outro lado, contrariamente, Alizadeh et al. (2018) observou um aumento nos níveis da proteína mTOR fosforilada em PBMCs de pacientes com DM2. A proteína mTOR é fosforilada pela AKT; havendo um comprometimento da via da insulina no DM2, provavelmente a proteína mTOR não seja adequadamente recrutada, o que é compatível com os baixos níveis de expressão de *mTOR*. Além disso, a proteína mTOR participa de vias celulares relacionadas à síntese proteica, proliferação, sobrevivência e senescência celular. Sendo assim, é possível sugerir que tais vias celulares estejam comprometidas nos PBMCs de pacientes com DM2, sendo que de fato, o gene *mTOR* apresentou níveis reduzidos de expressão.

Vale ressaltar que a proteína mTOR possui diferentes efeitos em diferentes tecidos, incluindo a mitigação do desenvolvimento do diabetes. Alguns estudos demonstraram que a ativação de mTOR nas células β pancreáticas estimula a proliferação destas e auxilia na regulação da secreção de insulina (Paris et al., 2003; Kulkarn et al., 2012; Bartolome et al., 2014; Weichhart et al., 2015). Nas células do sistema imune a ativação de mTOR exerce um potencial pró-inflamatório, favorecendo o desenvolvimento do DM2 frente à desregulação da modulação da proteína mTOR (Poirot et al., 2004; Martinez et al., 2008; Richardson et al., 2009; Eguchi et al., 2013; Cucak et al., 2014). Nesse sentido, pode-se questionar se o nível de expressão do gene *mTOR* nas células β pancreáticas se assemelha ao nível da expressão observada neste estudo em PBMCs de pacientes com DM2, cabendo investigações futuras.

A proteína SAPK/JNK não apresentou diferença significativa em PBMCs de pacientes com DM2, o que vai de encontro aos achados de Vinué et al. (2019) em PBMCs de pacientes com DM2. Outros autores também não observaram diferenças nos níveis da proteína SAPK/JNK fosforilada *in vitro* em adipócitos da linhagem 3T3-L1 (Abu-Farha et al., 2015). Contudo, Ayala et al. (2019) observaram aumento nos níveis da proteína SAPK/JNK fosforilada *in vivo* em macrófagos de camundongos com DM2. A SAPK/JNK é uma proteína que pode ser recrutada pelas células frente a diferentes agentes causadores de estresse, incluindo a ação de citocinas pró-inflamatórias, estresse oxidativo e a hiperglicemia (Choudhury et al., 2015; Ahmad et al., 2019). Quando ativa, a proteína SAPK/JNK tem o potencial de fosforilar a proteína IRS1, comprometendo a continuidade da via da insulina. Tal ação pode resultar do aumento da resistência à insulina e de tolerância à glicose (Kaneto et al., 2005; Hassanin et al., 2018). Ou seja, é possível que menores níveis de expressão de SAPK/JNK possam contribuir para uma melhora na sensibilidade à insulina em pacientes com DM2. Portanto, se faz necessário averiguar, não só os níveis totais de SAPK/JNK, mas também as subunidades fosforiladas, visando compreender o seu papel no desenvolvimento do DM2.

CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

As análises de expressão de genes ou proteínas chaves realizadas em PBMCs de pacientes com DM2 permitiram concluir que estes apresentaram um aumento na expressão relativa de proteínas envolvidas na resposta ao estresse oxidativo mitocondrial (*SOD2*), no reparo de danos no DNA (*PARP1*) e na modulação da resposta inflamatória (*NF-κβ*). Além disso, os resultados da análise da expressão relativa de genes ao nível transcricional para amostras dos mesmos pacientes mostraram uma redução nos níveis de expressão dos genes *SOD1* e *mTOR*. Entre as proteínas analisadas, cinco delas (*AKT*, *pAKT*, *pPTEN*, *pSAPK/JNK* e *TP53*) não demonstraram alterações em sua expressão relativa na comparação entre o grupo dos pacientes com DM2 e o grupo controle. De modo semelhante, três genes (*INSR*, *PI3K* e *AKT2*) analisados quanto aos perfis transcricionais não apresentaram diferenças significativas na comparação entre os grupos estudados.

Foi interessante notar que somente algumas proteínas/genes de vias adjacentes à via da insulina diferiram significativamente em termos de níveis de expressão. Nesse sentido, é importante ressaltar que os diferentes pacientes com DM2 analisados neste estudo possuem diferentes graus de desenvolvimento da doença, havendo uma variação interindividual importante a ser considerada, o que reforça a necessidade de um maior número de indivíduos amostrados, visando contornar o problema de heterogeneidade entre os pacientes. Apesar disso, os resultados obtidos neste estudo são relevantes e indicam a importância de aprofundar e ampliar as pesquisas em nível molecular, visando uma melhor compreensão do papel de componentes chaves das vias da insulina e de resposta ao estresse e inflamação, entre outras vias correlacionadas, em PBMCs e outros tecidos de pacientes com DM2.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abu-farha, M., et al. DNAJB3/HSP-40 cochaperone improves insulin signaling and enhances glucose uptake in vitro through JNK repression. **Scientific Reports**, v. 5, n. 1, p. 1-12, 24 set. 2015.
- Adaikalakoteswari, A., et al. Oxidative DNA damage and augmentation of poly(ADP-ribose) polymerase/nuclear factor-kappa B signaling in patients with Type 2 diabetes and microangiopathy. **The International Journal Of Biochemistry & Cell Biology**, v. 39, n. 9, p. 1673-1684, 2007.
- Aguer, C., et al. Increased proton leak and SOD2 expression in myotubes from obese non-diabetic subjects with a family history of type 2 diabetes. **Biochimica Et Biophysica Acta (Bba)**, v. 1832, n. 10, p. 1624-1633, out. 2013.
- Ahmad, R., et al. TNF- α Drives the CCL4 Expression in Human Monocytic Cells: involvement of the sapk/jnk and nf-kb signaling pathways. **Cellular Physiology And Biochemistry**, v. 52, n. 4, p. 908-921, 10 abr. 2019.
- Aleksandrov, R., et al. Protein Dynamics in Complex DNA Lesions. **Molecular Cell**, v. 69, n. 6, p. 1046-1061, mar. 2018.
- Alizadeh, S., et al. Evidence for the link between defective autophagy and inflammation in peripheral blood mononuclear cells of type 2 diabetic patients. **Journal Of Physiology And Biochemistry**, v. 74, n. 3, p. 369-379, 13 abr. 2018.
- Asadipooya, K.; Uy, E. M. Advanced Glycation End Products (AGEs), Receptor for AGEs, Diabetes, and Bone: review of the literature. **Journal Of The Endocrine Society**, v. 3, n. 10, p. 1799-1818, 10 jul. 2019.
- Aslan, H. E.; Beydemir, Ş. Phenolic compounds: the inhibition effect on polyol pathway enzymes. **Chemico-Biological Interactions**, v. 266, p. 47-55, mar. 2017.
- Ayala, T. S., et al. High Glucose Environments Interfere with Bone Marrow-Derived Macrophage Inflammatory Mediator Release, the TLR4 Pathway and Glucose Metabolism. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1-15, 7 ago. 2019.
- Bartolome, A., et al. Role of the Mammalian Target of Rapamycin (mTOR) Complexes in Pancreatic β -Cell Mass Regulation. **The Pancreatic Beta Cell**, p. 425-469, 2014.
- Belfiore, A., et al. Insulin Receptor Isoforms in Physiology and Disease: an updated view. **Endocrine Reviews**, v. 38, n. 5, p. 379-431, 19 jun. 2017.
- Beyfuss, K.; Hood, D. A. A systematic review of p53 regulation of oxidative stress in skeletal muscle. **Redox Report**, v. 23, n. 1, p. 100-117, 1 jan. 2018.
- Biemel, K. M., et al. Identification and Quantification of Major Maillard Cross-links in Human Serum Albumin and Lens Protein. **Journal Of Biological Chemistry**, v. 277, n. 28, p. 24907-24915, jul. 2002.

- 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.
- Blaser, H., et al. TNF and ROS Crosstalk in Inflammation. **Trends In Cell Biology**, v. 26, n. 4, p. 249-261, abr. 2016.
- Borgo, C., et al. CK2 modulates adipocyte insulin-signaling and is up-regulated in human obesity. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1-15, dez. 2017.
- Boscariol, R., et al. Diabetes mellitus tipo 2: educação, prática de exercícios e dieta no controle glicêmico. **Saúde em Foco**, v. 10, p. 138-150, out. 2018.
- Bosco, D., et al. Possible implications of insulin resistance and glucose metabolism in Alzheimer's disease pathogenesis. **Journal Of Cellular And Molecular Medicine**, v. 15, n. 9, p.1807-1821, ago. 2011.
- Buchanan, T. A.; Xiang, A. H. Gestational diabetes mellitus. **Journal Of Clinical Investigation**, v. 115, n. 3, p. 485-491, 1 mar. 2005.
- Byun, K. et al. Advanced glycation end-products produced systemically and by macrophages: a common contributor to inflammation and degenerative diseases. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 177, p. 44-55, set. 2017.
- Chaitanya, G. V.; Alexander, J.; Babu, P.P. PARP-1 cleavage fragments: signatures of cell-death proteases in neurodegeneration. **Cell Communication And Signaling**, v. 8, n. 1, p. 1-11, dez. 2010.
- Cheng, H.; Tsai, S.; Liu, H. Activation of inflammatory pathways in PBMCs linking type 2 diabetes in older adults without obesity. **Experimental Gerontology**, v. 163, p. 11-20, jun. 2022.
- Choudhury, S., et al. Inflammation-induced ROS generation causes pancreatic cell death through modulation of Nrf2/NF- κ B and SAPK/JNK pathway. **Free Radical Research**, v. 49, n. 11, p. 1371-1383, 2 set. 2015.
- Colberg, S. R., et al. Physical Activity/Exercise and Diabetes: a position statement of the american diabetes association. **Diabetes Care**, v. 39, n. 11, p. 2065-2079, 11 out. 2016.
- Cucak, H., et al. Macrophage Contact Dependent and Independent TLR4 Mechanisms Induce β -Cell Dysfunction and Apoptosis in a Mouse Model of Type 2 Diabetes. **Plos One**, v. 9, n. 3, p. 1-14, 3 mar. 2014.
- Cucak, H., et al. Oxidative stress and inflammatory markers in prediabetes and diabetes. **Journal Of Physiology And Pharmacology**, p. 809-824, abr. 2019.
- Dasu, M. R., et al. High Glucose Induces Toll-Like Receptor Expression in Human Monocytes: mechanism of activation. **Diabetes**, v. 57, n. 11, p. 3090-3098, 23 jul. 2008.

DeFronzo, R. A., et al. Type 2 diabetes mellitus. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 1, n. 1, p. 1-22, 23 jul. 2015.

Dubayee, M. A., et al. Metformin alters peripheral blood mononuclear cells (PBMC) senescence biomarkers gene expression in type 2 diabetic patients. **Journal Of Diabetes And Its Complications**, v. 35, n. 1, p. 1-8, jan. 2021.

Eguchi, K., et al. Macrophages and islet inflammation in type 2 diabetes. **Diabetes, Obesity And Metabolism**, v. 15, n. 3, p. 152-158, set. 2013.

El-Gharbawy, R. M., et al. Zinc oxide nanoparticles and a standard antidiabetic drug restore the function and structure of beta cells in Type-2 diabetes. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 84, n. 0, p. 810-820, dez. 2016.

Escribano, O., et al. The Role of Insulin Receptor Isoforms in Diabetes and Its Metabolic and Vascular Complications. **Journal Of Diabetes Research**, v. 2017, p. 1-12, 2017.

Giansanti, V., et al. PARP inhibitors: new tools to protect from inflammation. **Biochemical Pharmacology**, v. 80, n. 12, p. 1869-1877, dez. 2010.

Grindel, A., et al. Oxidative Stress, DNA Damage and DNA Repair in Female Patients with Diabetes Mellitus Type 2. **Plos One**, v. 11, n. 9, p. 1-17, 6 set. 2016.

Guillén, C., et al. mTORC1 Overactivation as a Key Aging Factor in the Progression to Type 2 Diabetes Mellitus. **Frontiers In Endocrinology**, v. 9, p. 1-7, 16 out. 2018.

Hançer, N. J., et al. Insulin and Metabolic Stress Stimulate Multisite Serine/Threonine Phosphorylation of Insulin Receptor Substrate 1 and Inhibit Tyrosine Phosphorylation. **Journal Of Biological Chemistry**, v. 289, n. 18, p. 12467-12484, maio 2014.

Hassanin, K. M. A., et al. *Balanites aegyptiaca* ameliorates insulin secretion and decreases pancreatic apoptosis in diabetic rats: role of sapk/jnk pathway. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 102, p. 1084-1091, jun. 2018.

Huang, D., et al. Activation and Overexpression of PARP-1 in Circulating Mononuclear Cells Promote TNF- α and IL-6 Expression in Patients with Unstable Angina. **Archives Of Medical Research**, v. 39, n. 8, p. 775-784, nov. 2008.

Huang, X., et al. The PI3K/AKT pathway in obesity and type 2 diabetes. **International Journal Of Biological Sciences**, v. 14, n. 11, p. 1483-1496, 2018.

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

IDF. **IDF DIABETES ATLAS**. Tenth edition 2021. 2021. Disponível em: https://diabetesatlas.org/idfawp/resource-files/2019/07/IDF_diabetes_atlas_ninth_edition_en.pdf. Acesso em: 22 nov. 2022.

Jabeen, F.; Rizvi H.A.; Subhan A. Effect of hyperglycemia on superoxide dismutase defense system and erythrocyte indices in diabetic patients. **Pakistan Journal Of Biochemistry And Molecular Biology**, v. 2, n. 45, p. 85-89, 12 abr. 2012.

Jangra, A., et al. Amelioration of diabetes-induced neurobehavioral and neurochemical changes by melatonin and nicotinamide: implication of oxidative stress parg pathway. **Pharmacology Biochemistry And Behavior**, v. 114-115, p. 43-51, dez. 2013.

Kaneto, H., et al. Oxidative stress, ER stress, and the JNK pathway in type 2 diabetes. **Journal Of Molecular Medicine**, v. 83, n. 6, p. 429-439, 10 mar. 2005.

Katsarou, A., et al. Type 1 diabetes mellitus. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 3, n. 1, p. 1-17, 30 mar. 2017.

Kleinert, M., et al. Acute mTOR inhibition induces insulin resistance and alters substrate utilization in vivo. **Molecular Metabolism**, v. 3, n. 6, p. 630-641, set. 2014.

Kobyliak, N., et al. Effect of alive probiotic on insulin resistance in type 2 diabetes patients: randomized clinical trial. **Diabetes & Metabolic Syndrome**, v. 12, n. 5, p. 617-624, set. 2018.

Kulkarni, R. N., et al. Human β -Cell Proliferation and Intracellular Signaling. **Diabetes**, v. 61, n. 9, p. 2205-2213, 17 ago. 2012.

Kuzmicki, M., et al. The expression of genes involved in NF- κ B activation in peripheral blood mononuclear cells of patients with gestational diabetes. **European Journal Of Endocrinology**, v. 168, n. 3, p. 419-427, mar. 2013.

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.

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. Dissertação (Mestrado em Genética) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2019. doi:10.11606/D.17.2019.tde-01082019-101404. Acesso em: 2023-02-13.

Lima-Cabello, E., et al. Narrow-leafed lupin (*Lupinus angustifolius*L.) β -conglutin proteins modulate the insulin signaling pathway as potential type 2 diabetes treatment and inflammatory-related disease amelioration. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 61, n. 5, p. 1-37, 13 fev. 2017.

Lin, N.; Zhang, H.; Su, Q. Advanced glycation end-products induce injury to pancreatic beta cells through oxidative stress. **Diabetes & Metabolism**, v. 38, n. 3, p. 250-257, jun. 2012.

Liu, H. T., et al. Efficacy of short-term intensive treatment with insulin pump to improve islet β -cell function in newly diagnosed type 2 diabetes via inhibition of oxidative stress. **Experimental And Therapeutic Medicine**, v. 18, p. 2293-2298, 26 jul. 2019.

Lu, Y. K., et al. Identification of Circulating hsa_circ_0063425 and hsa_circ_0056891 as Novel Biomarkers for Detection of Type 2 Diabetes. **The Journal Of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 106, n. 7, p. 2688-2699, 20 fev. 2021.

Ma, J., et al. Prolonged Insulin Stimulation Down-regulates GLUT4 through Oxidative Stress-mediated Retromer Inhibition by a Protein Kinase CK2-dependent Mechanism in 3T3-L1 Adipocytes. **Journal Of Biological Chemistry**, v. 289, n. 1, p. 133-142, jan. 2014.

Ma, Z. A.; Zhao, Z.; Turk, J. Mitochondrial Dysfunction and β -Cell Failure in Type 2 Diabetes Mellitus. **Experimental Diabetes Research**, v. 2012, p. 1-11, 2012.

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

Martinez, F. O. et al. Macrophage activation and polarization. **Frontiers In Bioscience**, v. 13, p. 453-461, jan. 2008.

Mayer, C. M.; Belsham, D. D. Central Insulin Signaling Is Attenuated by Long-Term Insulin Exposure via Insulin Receptor Substrate-1 Serine Phosphorylation, Proteasomal Degradation, and Lysosomal Insulin Receptor Degradation. **Endocrinology**, v. 151, n. 1, p. 75-84, 1 jan. 2010.

Merecz, A., et al. Analysis of oxidative DNA damage and its repair in Polish patients with diabetes mellitus type 2: role in pathogenesis of diabetic neuropathy. **Advances In Medical Sciences**, v. 60, n. 2, p. 220-230, set. 2015.

Michurina, S. et al. Decreased UCP-1 expression in beige adipocytes from adipose-derived stem cells of type 2 diabetes patients associates with mitochondrial ROS accumulation during obesity. **Diabetes Research And Clinical Practice**, v. 169, n. 168, p. 1-10, nov. 2020.

Miller, S. J., et al. Direct identification of PTEN phosphorylation sites. **Febs Letters**, v. 528, n. 1-3, p. 145-153, 29 ago. 2002.

Modestino, A. E., et al. Elevated Resting and Postprandial Digestive Proteolytic Activity in Peripheral Blood of Individuals With Type-2 Diabetes Mellitus, With Uncontrolled Cleavage of Insulin Receptors. **Journal Of The American College Of Nutrition**, v. 38, n. 6, p. 485-492, 9 abr. 2019.

Mozzini, C., et al. Endoplasmic reticulum stress and Nrf2 repression in circulating cells of type 2 diabetic patients without the recommended glycemic goals. **Free Radical Research**, v. 49, n. 3, p. 244-252, 6 fev. 2015.

Muscogiuri, G., et al. Genetic Disruption of SOD1 Gene Causes Glucose Intolerance and Impairs β -Cell Function. **Diabetes**, v. 62, n. 12, p. 4201-4207, 5 set. 2013.

Oliveira J. E. P., et al. **Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes: 2017-2018**. São Paulo: Clannad, 2017. 383 p.

Osorio-Fuentealba, C., et al. Electrical Stimuli Release ATP to Increase GLUT4 Translocation and Glucose Uptake via PI3K -Akt-AS160 in Skeletal Muscle Cells. **Diabetes**, v. 62, n. 5, p. 1519-1526, 28 dez. 2012.

Öst, A., et al. Retinol-binding protein-4 attenuates insulin-induced phosphorylation of IRS1 and ERK1/2 in primary human adipocytes. **The FASEB Journal**, v. 21, n. 13, p. 3696-3704, 15 jun. 2007.

Ouchi, N., et al. Adipokines in inflammation and metabolic disease. **Nature Reviews Immunology**, v. 11, n. 2, p. 85-97, 21 jan. 2011.

Paris, M., et al. Specific and Combined Effects of Insulin and Glucose on Functional Pancreatic β -Cell Mass in Vivo in Adult Rats. **Endocrinology**, v. 144, n. 6, p. 2717-2727, 1 jun. 2003.

Park, S., et al. RIP1 Activates PI3K-Akt via a Dual Mechanism Involving NF- κ B-Mediated Inhibition of the mTOR-S6K-IRS1 Negative Feedback Loop and Down-regulation of PTEN. **Cancer Research**, v. 69, n. 10, p. 4107-4111, 15 maio 2009.

Pietrani, N.T., et al. Peripheral activation of inflammatory intracellular signaling pathways and their correlation with IL6, IL10 and TNF α in obesity and type 2 diabetes mellitus. **Inflammation And Cell Signaling**, v. 2, p. 926-934, 27 out. 2015.

Poirot, L., et al. Natural killer cells distinguish innocuous and destructive forms of pancreatic islet autoimmunity. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, v. 101, n. 21, p. 8102-8107, 12 maio 2004.

Richardson, S. J. et al. Islet-associated macrophages in type 2 diabetes. **Diabetologia**, v. 52, n. 8, p. 1686-1688, 6 jun. 2009.

Rolo, A. P.; PALMEIRA, C.M. Diabetes and mitochondrial function: role of hyperglycemia and oxidative stress. **Toxicology And Applied Pharmacology**, v. 212, n. 2, p. 167-178, abr. 2006.

Schultze, S. M., et al. PI3K/AKT, MAPK and AMPK signalling: protein kinases in glucose homeostasis. **Expert Reviews In Molecular Medicine**, v. 14, n. 0, p.1-21, jan. 2012.

Seyyedbrahimi, S., et al. The effects of resveratrol on markers of oxidative stress in patients with type 2 diabetes: a randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial. **Acta Diabetologica**, v. 55, n. 4, p. 341-353, 22 jan. 2018.

Shimizu, I., et al. P53-Induced Adipose Tissue Inflammation Is Critically Involved in the Development of Insulin Resistance in Heart Failure. **Cell Metabolism**, v. 15, n. 1, p. 51-64, jan. 2012.

Shu, Y. N., et al. CKII-SIRT1-SM22 α loop evokes a self-limited inflammatory response in vascular smooth muscle cells. **Cardiovascular Research**, v. 113, n. 10, p. 1198-1207, 16 abr. 2017.

Sims-Robinson, C., et al. How does diabetes accelerate Alzheimer disease pathology? **Nature Reviews Neurology**, v. 6, n. 10, p.551-559, set. 2010.

Sindhu, S., et al. Increased Expression of the Innate Immune Receptor TLR10 in Obesity and Type-2 Diabetes: association with ros-mediated oxidative stress. **Cellular Physiology And Biochemistry**, v. 45, n. 2, p. 572-590, fev. 2018.

Sireesh, D., et al. Association of NF-E2 Related Factor 2 (Nrf2) and inflammatory cytokines in recent onset Type 2 Diabetes Mellitus. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1-10, 23 mar. 2018.

Su, D., et al. Gene Expression and Correlation of PTEN and FABP4 in Liver, Muscle, and Adipose Tissues of Type 2 Diabetes Rats. **Medical Science Monitor**, v. 21, p. 3616-3621, 22 nov. 2015.

Suri, S., et al. Altered expression of specific antioxidant (SOD1 and SOD2) and DNA repair (XRCC1 and OGG1) genes in patients with newly diagnosed type-2 diabetes mellitus. **Minerva Endocrinology**, v. 5, p. 1-9, jun. 2021.

Tahrani, A. Novel therapies in type 2 diabetes: insulin resistance. **Practical Diabetes**, v. 34, n. 5, p. 161-166, jun. 2017.

Takematsu, E., et al. Genome wide analysis of gene expression changes in skin from patients with type 2 diabetes. **Plos One**, v. 15, n. 2, p. 1-22, 21 fev. 2020.

Tarquini, F., et al. Caspase 3 activation and PARP cleavage in lymphocytes from newborn babies of diabetic mothers with unbalanced glycaemic control. **Cell Biochemistry And Function**, v. 32, n. 1, p. 87-95, 25 abr. 2013.

Tatsch, E., et al. Association between DNA strand breakage and oxidative, inflammatory and endothelial biomarkers in type 2 diabetes. **Mutation Research/Fundamental And Molecular Mechanisms Of Mutagenesis**, v. 732, n. 1-2, p. 16-20, abr. 2012.

Tempera, I., et al. Poly(ADP-ribose)polymerase activity is reduced in circulating mononuclear cells from type 2 diabetic patients. **Journal Of Cellular Physiology**, v. 205, n. 3, p. 387-392, 2005.

Tiwari, B. K., et al. Markers of Oxidative Stress during Diabetes Mellitus. **Journal Of Biomarkers**, v. 2013, p. 1-8, 17 dez. 2013.

Turacli, I. D., et al. Potential effects of metformin in DNA BER system based on oxidative status in type 2 diabetes. **Biochimie**, v. 154, p. 62-68, nov. 2018.

Vatseba, T.S., et al. Activation of the PI3K/AKT/MTOR/p70S6K1 Signaling Cascade in Peripheral Blood Mononuclear Cells in Patients With Type 2 Diabetes. **Ssrn**, v. 92, n. 6, p. 54-59, nov. 2020.

Veza, T., et al. The Role of Mitochondrial Dynamic Dysfunction in Age-Associated Type 2 Diabetes. **The World Journal Of Men'S Health**, v. 40, n. 3, p. 399-411, 2022.

Vinué, Á., et al. Changes in CDKN2A/2B expression associate with T-cell phenotype modulation in atherosclerosis and type 2 diabetes mellitus. **Translational Research**, v. 203, p. 31-48, jan. 2019.

Wang, P., et al. Type 2 Diabetes Promotes Cell Centrosome Amplification via AKT-ROS-Dependent Signalling of ROCK1 and 14-3-3 σ . **Cellular Physiology And Biochemistry**, v. 47, n. 1, p. 356-367, maio 2018.

Weichhart, T., et al. Regulation of innate immune cell function by mTOR. **Nature Reviews Immunology**, v. 15, n. 10, p. 599-614, 25 set. 2015.

Włodarczyk, M.; Nowicka, G. Obesity, DNA Damage, and Development of Obesity-Related Diseases. **International Journal Of Molecular Sciences**, v. 20, n. 5, p. 1146-1164, 6 mar. 2019.

Wu, H.; Ballantyne, C. M.. Metabolic Inflammation and Insulin Resistance in Obesity. **Circulation Research**, v. 126, n. 11, p. 1549-1564, 22 maio 2020.

Xavier, D. J., et al. Assessment of DNA damage and mRNA/miRNA transcriptional expression profiles in hyperglycemic versus non-hyperglycemic patients with type 2 diabetes mellitus. **Mutation Research/Fundamental And Molecular Mechanisms Of Mutagenesis**, v. 776, p. 98-110, jun. 2015.

Xavier, D. J., et al. 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.

Yan, L. Redox imbalance stress in diabetes mellitus: role of the polyol pathway. **Animal Models And Experimental Medicine**, v. 1, n. 1, p. 7-13, mar. 2018.

Yin, L., et al. Analysis of PTEN expression and promoter methylation in Uyghur patients with mild type 2 diabetes mellitus. **Medicine**, v. 97, n. 49, p. 1-9, dez. 2018.

Yuasa, T., et al. Development of in vitro model of insulin receptor cleavage induced by high glucose in HepG2 cells. **Biochemical And Biophysical Research Communications**, v. 445, n. 1, p. 236-243, fev. 2014.

Zhou, Z., et al. Metformin Inhibits Advanced Glycation End Products-Induced Inflammatory Response in Murine Macrophages Partly through AMPK Activation and RAGE/NF κ B Pathway Suppression. **Journal Of Diabetes Research**, v. 2016, p. 1-10, 2016.

APÊNDICES

Apêndice 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



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 da 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
14045-900 - Ribeirão Preto - SP

Comitê de Ética em Pesquisa do HCRP e FMRP-USP
FUA-00002733; IRIS-00002156 e Registro SISNEPICONEP nº 4
(016) 3602-2220
cep@hcrp.usp.br

www.hcrp.usp.br

Apêndice B – 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: _____

Apêndice C – 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: _____