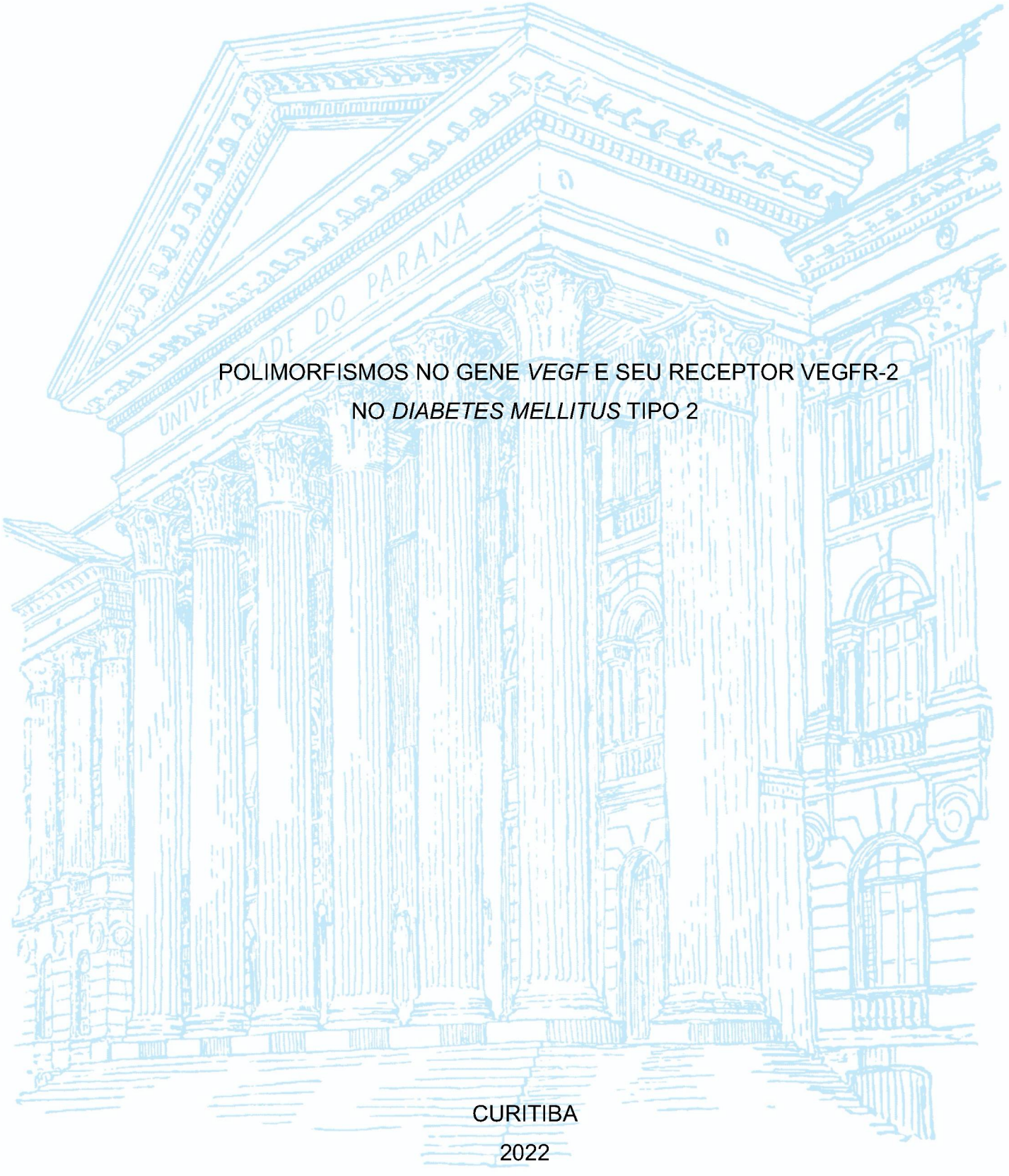
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

CHRISTIANE MAYRHOFER GROCOSKE DE LIMA



POLIMORFISMOS NO GENE *VEGF* E SEU RECEPTOR VEGFR-2 NO *DIABETES MELLITUS* TIPO 2

CURITIBA

2022

CHRISTIANE MAYRHOFER GROCOSKE DE LIMA

POLIMORFISMOS NO GENE *VEGF* E SEU RECEPTOR VEGFR-2 NO *DIABETES MELLITUS* TIPO 2

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de mestre em Ciências Farmacêuticas, no Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde, da Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Profª. Drª. Fabiane G. de M. Rego
Coorientadores: Prof. Dr. Geraldo Picheth
Profª. Drª. Mauren Isfer Anghebem

CURITIBA
2022

Lima, Christiane Mayrhofer Grocoske de
Polimorfismos no gene VEGF e seu receptor VEGFR 2 no *Diabetes mellitus* tipo 2 [recurso eletrônico] / Christiane Mayrhofer Grocoske de Lima – Curitiba, 2022.
1 recurso online: PDF.

Dissertação (mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, 2022.

Orientador: Profa. Dra. Fabiane G. de M. Rego
Coorientadores: Prof. Dr. Geraldo Picheth
Profa. Dra. Mauren Isfer Anghebem

1. *Diabetes mellitus* tipo 2. 2. Hiperglicemia. 3. Fator A de crescimento do endotélio vascular. I. Rego, Fabiane Gomes de Moraes. II. Picheth, Geraldo. III. Anghebem, Mauren Isfer. IV. Universidade Federal do Paraná. V. Título.

CDD 616.4624

Maria da Conceição Kury da Silva CRB 9/1275

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS - 40001016042P8

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **CHRISTIANE MAYRHOFER GROCOSKE DE LIMA** intitulada: **POLIMORFISMOS NO GENE *VEGF* E SEU RECEPTOR VEGFR-2 NO *DIABETES MELLITUS* TIPO 2** , sob orientação da Profa. Dra. FABIANE GOMES DE MORAES REGO, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestra está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 11 de Abril de 2022.

Assinatura Eletrônica
11/04/2022 18:53:15.0
FABIANE GOMES DE MORAES REGO
Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica
12/04/2022 10:17:52.0
GRACIELE CRISTIANE MORE MANICA BENETTI
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA)

Assinatura Eletrônica
12/04/2022 10:32:18.0
DARLENE CAMATI PERSUHN
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA - UFPB)

Documento assinado eletronicamente de acordo com o disposto na legislação federal Decreto 8539 de 08 de outubro de 2015.
Gerado e autenticado pelo SIGA-UFPR, com a seguinte identificação única: 173895
Para autenticar este documento/assinatura, acesse https://www.prppg.ufpr.br/siga/visitante/autenticacaoassinaturas.jsp e insira o codigo 173895

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a DEUS, por ter estado presente comigo em toda a jornada e por ter permitido mais essa conquista.

Ao meu esposo Tulio e meus filhos Gabrielle e João Victor pela paciência, carinho e amor e por sempre me incentivarem na busca pelos meus sonhos. Vocês foram fundamentais para a obtenção deste título, pois em todos os momentos me apoiaram e não me deixaram desistir, nem mesmo nos momentos mais difíceis em meio a uma pandemia que nos deixou em certos momentos sem rumo.

A minha orientadora Profª. Fabiane pela oportunidade de orientação, suporte e ensinamentos para o meu crescimento acadêmico e pelo incentivo e confiança na minha capacidade para a condução deste projeto.

Aos meus Coorientadores Prof. Geraldo e Profª. Mauren que contribuíram direta ou indiretamente para a conclusão deste trabalho.

Aos demais professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas por toda contribuição no decorrer do projeto.

Aos meus colegas de laboratório Louryana, Susan e Mateus que estiveram sempre prontos para todo auxílio e conselhos, sem a ajuda e incentivo de vocês teria sido muito difícil esta caminhada.

A Universidade Federal do Paraná, ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela oportunidade e apoio.

“Tudo posso naquele que me fortalece.”

Filipenses 4:13

RESUMO

O *Diabetes mellitus* tipo 2 (DM2) é uma doença complexa, crônica e multifatorial que é caracterizado pela hiperglicemia. A prevalência e incidência do DM2, representando mais de 90% de todos os casos de diabetes, estão aumentando rapidamente em todo o mundo. Há um acúmulo de evidências de que o risco de DM2 é fortemente influenciado por fatores genéticos. O fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) contribui para a patogênese do DM2, e as variações genéticas no gene *VEGFA* foram sugeridas por influenciar a secreção de VEGF e a patogênese do DM2. O presente estudo teve como objetivo investigar as frequências genotípicas e alélicas dos polimorfismo de nucleotídeos único (SNP) rs2146323 e rs2305948 do gene *VEGFA* e rs3025039 do gene *VEGFR2* e verificar a sua associação com o DM2, parâmetros bioquímicos e antropométricos e complicações microvasculares e macrovasculares diabéticas. Estudo tipo caso-controle foi realizado em 268 mulheres, 134 DM2 e 134 controle saudáveis. As concentrações plasmáticas de VEGF-A e sVEGFR-2 foram medidos através do sistema Luminex e a genotipagem das variantes de *VEGFA* e *VEGFR2* foi feita pela técnica de reação em cadeia da polimerase seguida de digestão com enzimas de restrição (PCR-RFLP) e PCR em tempo real usando a plataforma TaqMan®. O projeto teve aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFPR (CAAE: 01038112.0.0000.0102). Os polimorfismos rs2146323 e rs3025039 não apresentaram associação de risco ou proteção ao DM2 e não houve associação em relação as complicações micro e macrovasculares, porém os indivíduos portadores do genótipo CC do polimorfismo rs2146323 do gene *VEGFA* apresentaram aumento do IMC no grupo controle (P=0,014). O polimorfismo rs2305948 não apresentou associação ao DM2 e na análise dos genótipos também não ocorreu associação para as complicações micro ou macrovasculares, porém na análise do biomarcador sérico sVEGFR-2 ocorreu uma diferença significativa (P=0,034) para indivíduos diabéticos com histórico de infarto agudo do miocárdio (IAM) como evidenciado em estudos semelhantes. Em conclusão os polimorfismos estudados na população de mulheres brasileiras não tiveram associação ao DM2 e suas complicações.

Palavras-chave: *Diabetes mellitus* tipo 2; *VEGFA*; *VEGFR2*; polimorfismos.

ABSTRACT

Type 2 Diabetes mellitus (T2DM) is a complex, chronic and multifactorial disease that is characterized by hyperglycemia. The prevalence and incidence of T2DM, representing >90% of all cases of diabetes, are increasing rapidly throughout the world. There is accumulating evidence that the risk of T2DM is strongly influenced by genetic factors. Vascular endothelial growth factor (VEGF) contributes to T2DM pathogenesis, and genetic variations in *VEGFA* gene were suggested to influence VEGF secretion and T2DM pathogenesis. The present study aimed to investigate the genotypic and allelic frequencies of the single nucleotide polymorphisms (SNP) rs2146323 and rs2305948 of the *VEGFA* gene and rs3025039 of the *VEGFR2* gene and verify their association with T2DM, biochemical and anthropometric parameters and diabetic microvascular and macrovascular complications. Case-control study was performed on 268 women, 134 T2DM and 134 healthy controls. Plasma concentrations of VEGF and sVEGFR-2 were measured by Luminex system and the genotyping of *VEGFA* and *VEGFR2* variants was done by polymerase chain reaction technique followed by restriction enzyme digestion (PCR-RFLP) and real-time PCR using the TaqMan® platform. The project was approved by the UFPR Research Ethics Committee (CAAE: 01038112.0.0000.0102). The rs2146323 and rs3025039 polymorphisms did not present an association of risk or protection for T2DM and there was no association in relation to micro and macro vascular complications, but individuals with the CC genotype of the rs2146323 polymorphism of the VEGF gene showed an increase in BMI in the control group (P=0.014). The rs2305948 polymorphism was not associated with T2DM and in the analysis of the genotypes there was also no association for micro or macro vascular complications, but in the analysis of the serum biomarker sVEGFR-2 there was a significant difference (P=0.034) for diabetic individuals with a history of acute myocardial infarction (AMI) as evidenced in similar studies. In conclusion, the polymorphisms studied in the population of Brazilian women were not associated with TD2M and its complications.

Keywords: Type 2 diabetes mellitus; *VEGFA*; *VEGFR2*; polymorphisms

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - PREVALÊNCIA E PROJEÇÃO GLOBAL DO *DIABETES MELLITUS*...21
FIGURA 2 - FISIOPATOLOGIA DO *DIABETES MELLITUS* TIPO 2 28
FIGURA 3 - VIAS DE SINALIZAÇÃO ENVOLVIDAS NA SECREÇÃO DE INSULINA EM CONDIÇÕES FISIOLÓGICAS E MECANISMOS QUE LEVAM À DISFUNÇÃO DAS CÉLULAS B 30
FIGURA 4 - FATORES DE RISCO DO DIABETES MELLITUS TIPO 2 (DM2) E AS ALTERAÇÕES PATOLÓGICAS QUE LEVAM À PERPETUAÇÃO DA DISFUNÇÃO DA INSULINA 39
FIGURA 5 - DISFUNÇÃO MITOCONDRIAL E CONTRIBUIÇÃO PARA O DESENVOLVIMENTO DO DM2 41
FIGURA 6 - EFEITOS DA ESTIMULAÇÃO DA INSULINA NO TECIDO ADIPOSO SAUDÁVEL E HIPERTRÓFICO 48
FIGURA 7 - VIAS DE SINALIZAÇÃO ENVOLVIDAS NA SINALIZAÇÃO DA INSULINA NOS HEPATÓCITOS 49
FIGURA 8 - MECANISMOS MOLECULARES POSSÍVEIS NAS COMPLICAÇÕES DIABÉTICAS 52
FIGURA 9 - LIGANTES E RECEPTORES DE VEGF 58
FIGURA 10 - ILUSTRAÇÃO ESQUEMÁTICA DAS ESTRUTURAS DAS ISOFORMAS DE VEGF-A 60
FIGURA 11 - VIAS DE SINALIZAÇÃO INTRACELULAR DO COMPLEXO VEGF-A-VEGFR-2 64
FIGURA 12 - . SINALIZAÇÃO VEGF-A/VEGFR-2 NO DIABETES 69
FIGURA 13 - LOCALIZAÇÃO CROMOSSOMAL DO GENE VEGFA E DOS POLIMORFISMOS rs2146323 E rs3025039 72
FIGURA 14 - . LOCALIZAÇÃO CROMOSSOMAL DO GENE VEGFR2 E DO POLIMORFISMO rs2305948 73
FIGURA 15 - FLUXOGRAMA DE TRABALHO 75
FIGURA 16 - RESULTADO DE GENOTIPAGEM DO POLIMORFISMO rs2146323 (+5092 C/A) DO GENE VEGFA POR PCR EM TEMPO REAL 91
FIGURA 17 - EFEITO ENTRE GENÓTIPOS DE VEGFA rs2146323 SOBRE O ÍNDICE DE MASSA CORPÓREA (IMC) 97

FIGURA 18 - PERFIL DE RESTRIÇÃO OBTIDO PELO TRATAMENTO DO FRAGMENTO AMPLIFICADO COM A ENZIMA NIAIII PARA O POLIMORFISMO rs3025039 DO GENE VEGFA 98
FIGURA 19 - PERFIL ELETROFORÉTICO OBTIDO PELO TRATAMENTO DO FRAGMENTO AMPLIFICADO COM A ENZIMA NIAIII PARA O POLIMORFISMO rs3025039 DO GENE VEGFA 99
FIGURA 20 - PERFIL DE RESTRIÇÃO OBTIDO PELO TRATAMENTO DO FRAGMENTO AMPLIFICADO COM A ENZIMA BSTZ17I PARA O POLIMORFISMO rs2305948 DO GENE VEGFR2 101
FIGURA 21 - PERFIL ELETROFORÉTICO OBTIDO PELO TRATAMENTO DO FRAGMENTO AMPLIFICADO COM A ENZIMA BSTZ17I PARA O POLIMORFISMO rs2305948 DO GENE VEGFR2 102

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 - CRITÉRIOS PARA O DIAGNÓSTICO DO *DIABETES MELLITUS* 23
QUADRO 2 - CARACTERIZAÇÃO DOS POLIMORFISMOS EM ESTUDO 77
QUADRO 3 - PROTOCOLO PARA ENSAIO TAQMAN® DO POLIMORFISMO rs2146323 DO GENE VEGFA 78
QUADRO 4 - PROTOCOLO UTILIZADO PARA GENOTIPAGEM POR PCR-RFLP DO POLIMORFISMO rs3025039 DO GENE VEGFA.....79
QUADRO 5 - PROTOCOLO UTILIZADO PARA GENOTIPAGEM POR PCR-RFLP DO POLIMORFISMO rs2305498 DO GENE VEGFR2 80
QUADRO 6 - PROTOCOLO PARA A REAÇÃO DE RESTRIÇÃO E DETECÇÃO DOS POLIMORFISMOS rs3025039 E rs2305498 80
QUADRO 7 - PARÂMETROS BIOQUÍMICOS AVALIADOS (PRINCÍPIO METODOLÓGICO, COEFICIENTE DE VARIAÇÃO E INTERVALO DE REFERÊNCIA) 81

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - DADOS ANTROPOMÉTRICOS DE MULHERES CTRL E DM2 84
TABELA 2 - CONCENTRAÇÕES SÉRICAS DE PARÂMETROS BIOQUÍMICOS PARA OS GRUPOS CTRL E DM2.....84
TABELA 3 - CONCENTRAÇÕES SÉRICAS DOS BIOMARCADORES VEGF-A E SVEGFR-2 PARA OS GRUPOS CTRL E DM2.....89
TABELA 4 - CONCENTRAÇÕES SÉRICAS DOS BIOMARCADORES VEGF-A E SVEGFR-2 DESCRITOS NA LITERATURA. 89
TABELA 5 - VALORES DE SIGNIFICÂNCIA PARA AS CONCENTRAÇÕES SÉRICAS DOS BIOMARCADORES VEGF-A E SVEGFR-2 PARA AS COMPLICAÇÕES DIABÉTICAS DO GRUPO DM2 91
TABELA 6 - FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS DO POLIMORFISMO rs2146323 (+5092 C/A) DO GENE VEGFA 93
TABELA 7 - FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS DO POLIMORFISMO rs3025039 (+936 C/T) DO GENE VEGFA.....93
TABELA 8 - FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS DO POLIMORFISMO rs2305948 (+1192 C/T) DO GENE VEGFR2 93
TABELA 9 - FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS DO POLIMORFISMO rs2146323 EM COMPARAÇÃO COM AS COMPLICAÇÕES DIABÉTICAS 95
TABELA 10 - FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS DO POLIMORFISMO rs3025039 EM COMPARAÇÃO COM AS COMPLICAÇÕES DIABÉTICAS 95
TABELA 11 - FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS DO POLIMORFISMO rs2305948 EM COMPARAÇÃO COM AS COMPLICAÇÕES DIABÉTICAS 95
TABELA 12 - COMPARAÇÃO DAS FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS DO POLIMORFISMO rs2146323 DO GENE VEGFA COM DADOS DA LITERATURA 96
TABELA 13 - COMPARAÇÃO DAS FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS DO POLIMORFISMO rs3025039 DO GENE VEGFA COM DADOS DA LITERATURA 100

TABELA 14 - COMPARAÇÃO DAS FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS DO POLIMORFISMO rs2305948 DO GENE VEGFR2 COM DADOS DA LITERATURA 104

LISTA DE ABREVIATURAS OU SIGLAS

ADA	- *American Diabetes Association* - Associação Americana de Diabetes
ALT	- Alanina amino transferase
AMD	- *Age-related macular degeneration* – degeneração macular da retina
AST	- Aspartato amino transferase
CEP	- Comitê de ética e pesquisa
EPC	- Célula progenitora endotelial
DCCT	- *Diabetes Control and Complications Trial*
DM	- *Diabetes Mellitus*
DM1	- *Diabetes Mellitus* tipo 1
DM2	- *Diabetes Mellitus* tipo 2
DMG	- *Diabetes Mellitus* Gestacional
dNTP	- Desoxirribonucleotídeos trifosfato
GAMA GT	- Gama glutamil transpeptidase ou GGT
GWAS	- G*enome-Wide Associations Studies* - Varreduras Genômicas
HbA1c	- Hemoglobina Glicada
HDL	- *High density lipoprotein*
IDF	- *Internacional Diabetes Federation*
IMC	- Índice de Massa Corporal
LDL	- *Low density lipoprotein*
MAPK	- Proteína quinase ativada por mitógeno
mRNA	- Ácido ribonucleico mensageiro
NSGP	- *National Glycohemoglobin Standardization Program*
OMS	- Organização Mundial da saúde
PCR	- *Polymerase Chain Reaction* - Reação em cadeia da polimerase
PDGF	- Fator de crescimento derivado de plaquetas
PGF	- Fator de crescimento placentário
PI3K	- Fosfatidilinositol 3'-quinase
PKB	- Proteína quinase B
PKC	- Proteína quinase C
PLCy	- Fosfolipase Cy

P1P2 - Pirazolo-pirimidinas 1 e 2

PROBANDS - *Bipolar disorder with psychosis* - Desordem bipolar com psicose

PXE - *Pseudoxanthoma elasticum* – Pseudoxantoma elástico

RD - Retinopatia Diabética

RFLP - *Restriction Fragment Length Polymorphism* - Polimorfismo no Comprimento do Fragmento de Restrição

ROS - Espécies reativas de oxigênio

RPM - Rotações por minuto

rs - *Reference Sequence* - Identificação dos Polimorfismos de nucleotídeo único

RSA - *Recurrent spontaneous abortions* - Abortos espontâneos recorrentes

RTK - Receptor tirosina quinase

SBD - Sociedade Brasileira de Diabetes

SNP - *Single Nucleotide Polymorphisms* - Polimorfismos de nucleotídeo único

TOTG - Teste oral de tolerância a glicose

UFPR - Universidade Federal do Paraná

VEGF - Fator de crescimento endotelial vascular

VEGFR-2 - Receptor 2 para o fator de crescimento endotelial vascular

WHO - *World Health Organization* - Organização Mundial de Saúde

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 17
1.1 OBJETIVOS 20
1.1.1 Objetivo geral 20
1.1.2 Objetivos específicos 20
2 REVISÃO DE LITERATURA 21
2.1 DIABETES MELLITUS 21
2.2 DIABETES MELLITUS TIPO 2 23
2.2.1 Fatores de risco e Fisiopatologia 25
2.2.1.1 Etnia e História Familiar/Predisposição Genética 25
2.2.1.2 Obesidade, Baixa Atividade Física e Dieta Não Saudável 26
2.2.2 Mecanismos que levam ao DM2 e Fisiopatologia 27
2.2.2.1 Fisiopatologia 27
2.2.2.1.1 Fisiologia das células β: Secreção de insulina 29
2.2.2.2 Mecanismos que levam à disfunção das Células β 31
2.2.2.3 Condições patológicas que perpetuam o DM2 32
2.2.2.3.1 Fatores Nutricionais 32
2.2.2.3.2 Atividade Física 33
2.2.2.3.3 Disbiose Intestinal 35
2.2.2.3.4 Memória Metabólica 36
2.2.2.3.5 Disfunção Mitocondrial 39
2.2.2.4 Resistência Insulina (RI) 45
2.2.2.4.1 Músculo Esquelético 45
2.2.2.4.2 Tecido Adiposo 46
2.2.2.4.3 Fígado 48
2.2.3 Complicações associadas ao DM2 50
2.2.3.1 Complicações Microvasculares 53
2.2.3.2 Complicações Macrovasculares 55
2.3 SINALIZAÇÃO DE VEGF E DIABETES 56
2.3.1 Fator de Crescimento Endotelial Vascular (VEGF) 56
2.3.2 Ligação de VEGF-A a ligantes e receptores 61
2.3.3 Papel de VEGF-A nas ilhotas pancreáticas 64
2.3.4 Papel de VEGF-A no DM2 66

2.4 POLIMORFISMOS NOS GENES *VEGFA* E *VEGFR2* 71
3 MATERIAL E MÉTODOS 75
3.1 AMOSTRAS 75
3.2 EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DO DNA GENÔMICO 76
3.3 GENOTIPAGEM DOS POLIMORFISMOS 77
3.4 PARÂMETROS BIOQUÍMICOS 81
3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA 82
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO 83
4.1 DADOS ANTROPOMÉTRICOS 83
4.2 ANÁLISES BIOQUÍMICAS 83
4.2.1 Biomarcadores de controle glicêmico 85
4.2.2 Biomarcadores de perfil lipídico 85
4.2.3 Biomarcadores de função renal 87
4.2.4 Biomarcadores de perfil nutricional 87
4.2.5 Biomarcadores de função hepática 88
4.2.6 Biomarcadores séricos VEGFR e sVEGFR-2 88
4.3 ANÁLISES MOLECULARES 91
4.3.1 Polimorfismo rs2146323 (+5092 C/A) do gene *VEGFA* 91
4.3.2 Polimorfismo rs3025039 (+936 C/T) do gene *VEGFA* 97
4.3.3 Polimorfismo rs2305948 (+1192 C/T) do gene *VEGFR2* 100
5 CONCLUSÕES 105
REFERÊNCIAS 106
ANEXO 1 – TERMO DE APROVAÇÃO DO COMITE DE ÉTICA 156
ANEXO 2 – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE) ASSINADO PELOS PARTICIPANTES DA PESQUISA 158
ANEXO 3 – QUESTIONÁRIO APLICADO AOS INDIVÍDUOS PARTICIPANTES DA PESQUISA 160

1 INTRODUÇÃO

O *Diabetes mellitus* (DM) é uma doença que consiste em um distúrbio metabólico caracterizado por uma condição crônica que ocorre quando existe elevadas concentrações de glicose no sangue decorrente da deficiência na produção do hormônio insulina ou na sua ação, ou também nos dois mecanismos (SBD, 2017; 2019).

Existem três tipos principais de diabetes: O *Diabetes mellitus* tipo 1 (DM1) é causado na maioria dos casos pela destruição autoimune das células β pancreáticas, o que resulta na deficiência absoluta de insulina. O *Diabetes mellitus* tipo 2 (DM2) engloba indivíduos que têm relativa deficiência de insulina (em vez de absoluta) e resistência periférica à insulina. Pelo menos inicialmente, e muitas vezes ao longo da vida, esses indivíduos podem não precisar de tratamento com insulina para sobreviver. Corresponde a 90 a 95% dos casos de diabetes. O *Diabetes mellitus* gestacional (DMG) é o diabetes diagnosticado no segundo ou terceiro trimestre de gravidez que não era claramente diabetes manifesto antes da gestação (DRAZNIN *et al.*, 2022).

A prevalência de DM2 está constantemente aumentando nos países em desenvolvimento e desenvolvidos, e se projeta um aumento de 371 milhões em 2013 para 552 milhões de pessoas em 2030 em todo o mundo (GINTER; SIMKO, 2012; STUMVOLL, MICHAEL *et al.*, 2005). O DM2 é de natureza multifatorial e seu risco depende de fatores modificáveis/ambientais e não modificáveis (GAO *et al.*, 2017; TEMELKOVA-KURKTSCHIEV; STEFANOV, 2012), estes últimos incluem gênero, etnia e fatores genéticos específicos (MORRIS *et al.*, 2012). O DM2 está associado a uma forte predisposição familiar e genética, no entanto, sua genética é complexa e muitas vezes não claramente definida (MORRIS *et al.*, 2012; TEMELKOVA-KURKTSCHIEV; STEFANOV, 2012). Vários *loci* genéticos que influenciam a suscetibilidade ao DM2 e suas complicações foram relatados (IMAMURA; MAEDA, 2011), incluindo 40 *loci* de risco identificados por estudos de associação ampla do genoma (GWAS) em etnias distintas (EL-SHAZLY *et al.*, 2014; IMAMURA; MAEDA, 2011).

O fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) é um ligante da heparina, glicoproteína homodimérica, que modula a angiogênese e a permeabilidade vascular em condições fisiológicas e patológicas

(THANIGAIMANI *et al.*, 2011). O VEGF desempenha um papel fundamental na patogênese do diabetes e suas complicações, particularmente aquelas relacionadas à má vascularização e hipóxia (SUN *et al.*, 2014; ZENG *et al.*, 2015). VEGF se liga a três tipos de receptores tirosina quinases, o receptor VEGF-2 também é conhecido como receptor contendo domínio de inserção de quinase (KDR - *Kinase insert Domain-containing Receptor*). KDR é expresso quase exclusivamente nas células endoteliais e acredita-se que pode ser responsável pela maioria dos efeitos angiogênicos e de aumento da permeabilidade de VEGF (RAHIMI, 2006). É um importante facilitador da angiogênese (WALTENBERGER *et al.*, 1994a) e é essencial para a sobrevivência e integridade das células endoteliais (GERBER *et al.*, 1998).

Nesse sentido, foi demonstrado que o bloqueio da sinalização de VEGF supostamente resultou na patogênese da hipertensão, proteinúria, e lesão renal em indivíduos diabéticos (EREMINA *et al.*, 2008; IZZEDINE *et al.*, 2007). Além disso, uma elevação das concentrações plasmáticas de VEGF foi observado em pacientes com polineuropatia diabética (PND) em comparação com indivíduos de controle, particularmente nos estágios inicias de PND (DEGUCHI *et al.*, 2009).

O gene *VEGFA* que codifica o VEGF está localizado no cromossomo 6 (6p21.3) (VINCENTI *et al.*, 1996), e variantes genéticas foram identificadas no gene *VEGFA*, algumas das quais afetando a secreção de VEGF (AL-HABBOUBI *et al.*, 2011; WATSON, CAROLYN J. *et al.*, 2000). Estes incluem o −2578C/A (rs699947) e −1154G/A (rs1570360), −583T/C (rs3025020), −634G/C (rs2010963) e variantes +963C/T (rs3025039), que foram associadas à expressão reduzida de VEGF (AL-HABBOUBI *et al.*, 2011; STEVENS *et al.*, 2003; WATSON, CAROLYN J. *et al.*, 2000), enquanto -460T/C (rs833061) e +534C/T foram associados a maior secreção de VEGF (STEVENS *et al.*, 2003).

Estudos anteriores investigaram a associação entre variantes de VEGFA e diabetes com complicações associadas, em particular complicações microvasculares. A retinopatia diabética foi associada com as variantes −634C/G (rs2010963) (SZAFLIK *et al.*, 2008) e −2578C/A (rs699947) (WANG *et al.*, 2014), o último visto em asiáticos, mas não caucasianos. Uma meta-análise demonstrou que +936C/T (rs3025039) e -460 T/C (rs833061) (modelo recessivo) foi associado com suscetibilidade elevada à retinopatia diabética em asiáticos (HAN, L. *et al.*, 2014).

O gene *VEGFR2* está localizado no cromossomo 4q11. A transição (T>C) na posição −604 (rs2071559), localizado na região promotora do local de ligação para o fator de transcrição E2F, demonstrou suprimir a atividade de transcrição e regular negativamente a expressão de VEGFR-2 (WANG *et al.*, 2007b). O alelo A de menor frequência do polimorfismo 1192G>A (rs2305948), localizado na região do éxon 7 do gene *VEGFR2*, leva à substituição de aminoácidos (Val>Ile) no resíduo 297 do VEGFR-2 e reduz a afinidade de ligação de VEGF para VEGFR-2 (WANG *et al.*, 2007b).

Neste estudo, exploramos a associação das variantes +5092C/A (rs2146323) e +936C/T (rs3025039) de *VEGFA* e +1192C/T (rs2305948) de *VEGFR*2 com o DM2 e complicações associadas em uma população Brasileira.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

Estudar as variações genéticas do gene *VEGFA* e do seu receptor *VEGFR2* e buscar associação com *Diabetes mellitus* tipo 2 (DM2) ou com suas complicações microvasculares e macrovasculares em mulheres brasileiras.

1.1.2 Objetivos específicos

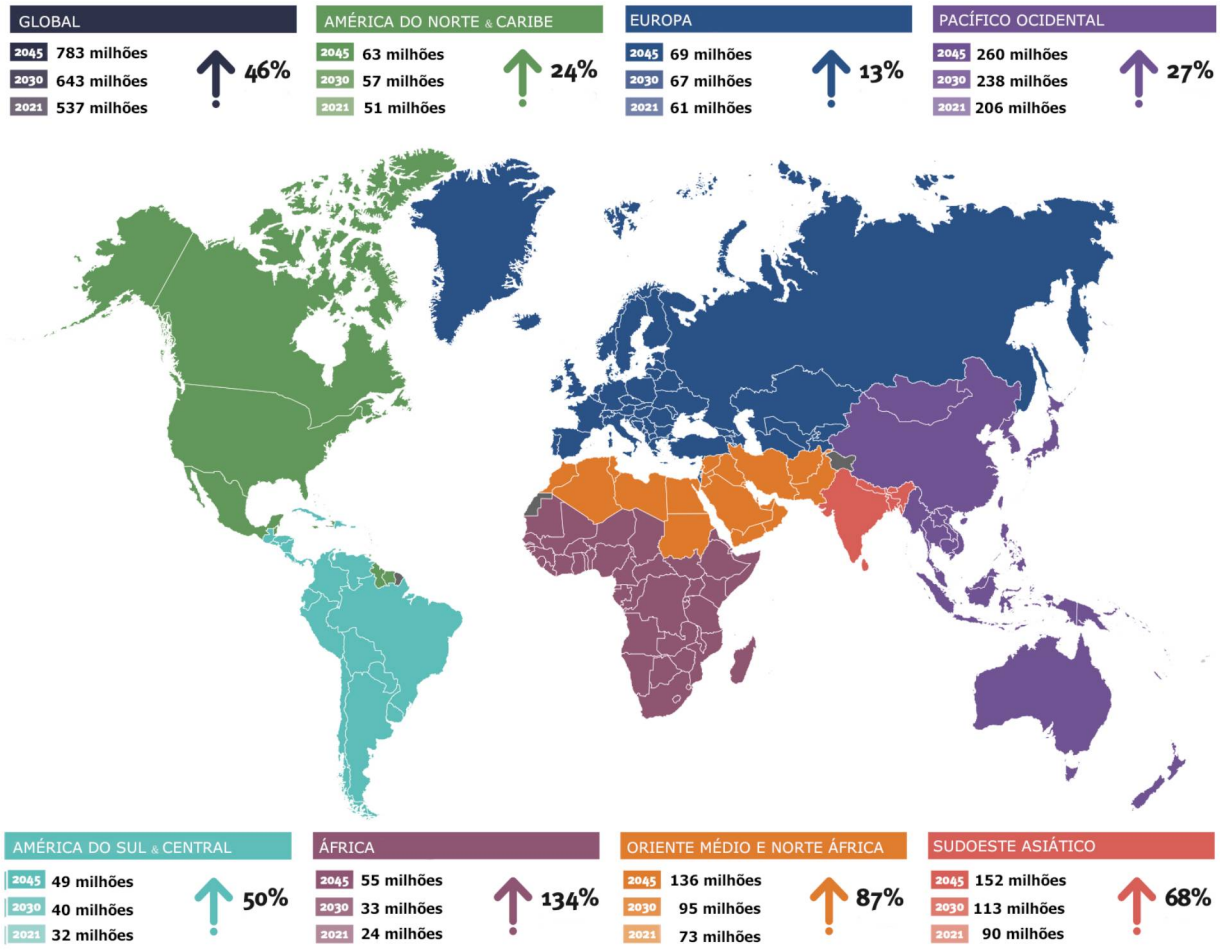
- Determinar as frequências genotípicas e alélicas dos polimorfismos rs2146323 e rs3025039 do gene *VEGFA* em mulheres brasileiras saudáveis e mulheres com DM2.
- Determinar as frequências genotípicas e alélicas do polimorfismo rs2305948 do gene *VEGFR2* em mulheres brasileiras saudáveis e mulheres com DM2.
- Associar as variações genéticas com biomarcadores plasmáticos (VEGF) e dados antropométricos (IMC) e complicações microvasculares e macrovasculares do diabetes.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 DIABETES MELLITUS

O *Diabetes mellitus* (DM) é uma das emergências de saúde globais que tiveram o crescimento mais rápido do século 21. Em 2021, estimou-se que 537 milhões de pessoas com idade entre 20 e 79 anos sofreriam de diabetes no mundo. E os números para o futuro são alarmantes, pois a Federação Internacional de Diabetes (IDF - *International Diabetes Federation*) indica que este número deve chegar a 643 milhões até 2030 e até 2045 com a população diabética aumentando em 46% (FIGURA 1) atingindo 783 milhões de pessoas em todo o mundo (IDF, 2021).

FIGURA 1 - PREVALÊNCIA E PROJEÇÃO GLOBAL DO *DIABETES MELLITUS*



Número estimado de diabéticos com idades entre 20 e 79 anos nos anos de 2021, 2030 e 2045 no mundo e por região.
Fonte: Adaptado da Federação Internacional de Diabetes (2021).

As razões para esse aumento são complexas e os achados do Atlas de Diabetes da IDF não conseguem estimar todas as suas contribuições, mas incluem o aumento da incidência de DM1 em crianças, especialmente mais novas, aumento da incidência de DM2 em jovens, aumento da incidência de DM2 em adultos como resultado de uma vida sedentária com uma dieta rica em calorias e o envelhecimento geral da população mundial. Por outro lado, o diagnóstico precoce do DM2 e um melhor manejo de todos os outros tipos de diabetes levando a uma maior expectativa de vida, contribuem para esse aumento na prevalência (SAEEDI *et al.*, 2019).

O *Diabetes mellitus* (DM) não é considerado uma única doença e sim um grupo heterogêneo de distúrbios metabólicos crônicos caracterizados por concentrações elevadas de glicose no organismo resultantes de defeitos na ação da insulina, na secreção de insulina ou em ambos os casos (SBD, 2019). Segundo as Diretrizes da Associação Americana de Diabetes (*American Diabetes Association* - ADA), o diabetes pode ser classificado pelas seguintes categorias:

1) *Diabetes mellitus* tipo 1 (DM1): nesta forma, ocorre a destruição das células β pancreáticas, que pode ser causada por uma reação autoimune e como resultado o organismo produz muito pouco ou nenhuma insulina. Ocorre com maior frequência em crianças e jovens adultos.

2) *Diabetes mellitus* tipo 2 (DM2): mais comumente diagnosticado depois dos quarenta anos de idade e representa 90% a 95% dos casos. Desenvolve-se por resistência aumentada anormal à ação da insulina e/ou produção insuficiente desta;

3) *Diabetes mellitus* gestacional (DMG): forma semelhante ao DM2, com a ocorrência de intolerância à glicose em níveis variados durante o período gestacional, podendo estar associada à resistência à insulina ou à redução da atividade das células β pancreáticas;

4) Outras formas da doença causadas por defeitos genéticos específicos da função das células β ou da ação da insulina, doenças do pâncreas, e ação de drogas ou outras substâncias químicas.

O DM pode ser diagnosticado com base em critérios de glicose plasmática, valor de glicose em jejum ou o valor de glicose no plasma 2 horas após sobrecarga

com 75 g de glicose (Teste Oral de Tolerância a Glicose - TOTG), ou ainda com critérios de hemoglobina glicada (HbA1c). Segundo a Sociedade Brasileira de Diabetes (SBD), os critérios diagnósticos incluem sintomas de poliúria, polidipsia e perda de peso associados à glicemia ao acaso acima de 200 mg/dL, glicemia em jejum acima de 126 mg/dL e TOTG com valores superiores a 200 mg/dL. O QUADRO 1 apresenta os critérios do diagnóstico de diabetes segundo as novas diretrizes da ADA (ADA, 2022b).

QUADRO 1 - CRITÉRIOS PARA O DIAGNÓSTICO DO *DIABETES MELLITUS*

Glicose em jejum ≥126 mg/dL (7,0 mmol/L). Jejum é definido pela não ingestão de calorias por um período de no mínimo 8 h*;
ou
Glicose 2 horas após a sobrecarga com 75 g de glicose ≥200 mg/dL. O teste deve ser realizado conforme descrito pela OMS, usando uma carga de glicose contendo o equivalente a 75 g de glicose anidra dissolvida em água*;
ou
HbA1c ≥6,5% (48 mmol/mol). O teste deve ser realizado com método padronizado e certificado pelo *National Glycohemoglobin Standardization Program* (NSGP) e padronizado pelo ensaio do *Diabetes Control and Complications Trial* (DCCT)*;
ou
Glicose ao acaso ≥200 mg/dL (11,1 mmol/L). Deve ser realizada em pacientes com sintomas clássicos de hiperglicemia ou em crise hiperglicêmica.

*Na ausência de inequívoca hiperglicemia, diagnóstico requer dois resultados alterados na mesma amostra ou em dois testes em amostras separadas.

Fonte: Adaptado da Associação Americana de Diabetes (2022)

A *American Association for Clinical Endocrinology Medical Consensus* acrescenta que HbA1c acima de 6,5% também é característico da doença e confirma o diagnóstico. Os fatores de risco que sugerem a necessidade de acompanhamento incluem história familiar de DM, doença cardiovascular, estilo de vida sedentário, síndrome metabólica ou intolerância à glicose, hipertensão arterial sistêmica, elevadas concentrações de triglicerídeos e/ou baixas concentrações de colesterol contido na lipoproteína de alta densidade (HDL-C), história de diabetes gestacional, síndrome dos ovários policísticos e uso de medicamentos para transtornos psicóticos (HANDELSMAN *et al.*, 2011).

2.2 DIABETES MELLITUS TIPO 2

O *Diabetes mellitus* tipo 2 (DM2) é um dos distúrbios metabólicos mais comuns em todo o mundo e seu desenvolvimento é causado principalmente por uma combinação de dois fatores principais: secreção de insulina defeituosa pelas células β pancreáticas e a incapacidade dos tecidos sensíveis à insulina de responder à insulina (RODEN; SHULMAN, 2019). A liberação e a ação de insulina têm que atender precisamente a demanda metabólica; assim, os mecanismos moleculares envolvidos na síntese e liberação de insulina, bem como a resposta da insulina nos tecidos são fortemente regulados. Portanto, defeitos em qualquer um dos mecanismos envolvidos podem levar a um desequilíbrio metabólico que leva à patogênese do DM2 (GALICIA-GARCIA *et al.*, 2020).

A progressão da doença torna a secreção de insulina incapaz de manter a homeostase da glicose, produzindo hiperglicemia. Os pacientes com DM2 são caracterizados principalmente por serem obesos ou ter maior percentual de gordura corporal, distribuído predominantemente na região abdominal. Nessa condição, o tecido adiposo promove a resistência à insulina (RI) através de vários mecanismos inflamatórios, incluindo aumento da liberação de ácidos graxos livres (AGL) e desregulação das adipocinas. Os principais impulsionadores da epidemia de DM2 são o aumento global da obesidade, estilos de vida sedentários, dietas altamente calóricas e envelhecimento populacional, que quadruplicaram a incidência e a prevalência de DM2 (CHATTERJEE *et al.*, 2017; NCD-RISC, 2016).

Os órgãos envolvidos no desenvolvimento do DM2 incluem o pâncreas (células β e α), fígado, músculo esquelético, rins, cérebro, intestino delgado e tecido adiposo (DEFRONZO, 2009). Dados em evolução sugerem um papel para desregulação das adipocinas, inflamação e anormalidades na microbiota intestinal, desregulação imunológica e inflamação surgiram como importantes fatores fisiopatológicos (SCHWARTZ *et al.*, 2016).

Dados epidemiológicos mostram valores alarmantes que predizem um futuro projetado preocupante para o DM2. De acordo com a IDF, em 2021, o diabetes causou 6,7 milhões de mortes; e 536,6 milhões de adultos entre 20 e 79 anos viviam com diabetes, número que provavelmente aumentará para 700 milhões até 2045. O diabetes foi a causa subjacente de pelo menos 966 bilhões de dólares em gastos com saúde em 2021. Além disso, a verdadeira carga de doença do DM2 é provavelmente um sub-representação, pois 1 em cada 2 diabéticos foram subdiagnosticados, o equivalente a 239,7 milhões de pessoas. O maior número de pessoas que sofrem de

diabetes tem entre 45 e 65 anos. Quase 90% das pessoas com diabetes não diagnosticada vivem em países de baixa e média renda (IDF, 2021). Pacientes com DM2 têm um risco aumentado de 15% de mortalidade por todas as causas em comparação com pessoas sem diabetes com a doença cardiovascular (DCV) como a maior causa de morbidade e mortalidade associada à DM2 (GAEDE, P. *et al.*, 2003). A associação do diabetes com risco aumentado de doença cardíaca coronária (*hazard ratio* [HR] 2,00; IC 95% 1,83–2,19), acidente vascular cerebral isquêmico (HR 2,27; 1,95–2,65) e outras mortes relacionadas a doenças vasculares (HR 1,73; 1,51-1,98) foi demonstrado em uma meta-análise (EMERGING RISK FACTORS *et al.*, 2010).

A epidemiologia do DM2 é afetada tanto pela genética quanto pelo ambiente. Fatores genéticos exercem seu efeito após a exposição a um ambiente caracterizado por comportamento sedentário e ingestão de alto teor calórico. Variantes genéticas glicêmicas comuns para DM2 foram identificadas por estudos de associação de todo o genoma, mas estes representam apenas 10% da variação total do traço, sugerindo que variantes raras são importantes (GRARUP *et al.*, 2014). Pessoas de diferentes origens étnicas podem ter diferentes fenótipos específicos que aumentam a predisposição aos grupos de fatores de risco de DCV, incluindo hipertensão, resistência à insulina e dislipidemia (WONG *et al.*, 2016).

2.2.1 Fatores de risco e Fisiopatologia

Os fatores de risco do DM2 incluem uma combinação complexa de fatores genéticos, metabólicos e ambientais que interagem entre si contribuindo para sua prevalência. Embora a predisposição individual para o DM2 devido aos fatores de risco não modificáveis (etnia e história familiar/predisposição genética) têm forte base genética, evidências de estudos epidemiológicos sugerem que muitos dos casos de DM2 podem ser prevenidos melhorando os principais fatores de risco modificáveis (obesidade, baixa atividade física e dieta não saudável) (HU *et al.*, 2001; SCHELLENBERG *et al.*, 2013).

2.2.1.1 Etnia e História Familiar/Predisposição Genética

Globalmente, a incidência e prevalência do DM2 variam amplamente, dependendo da etnia e da região geográfica, com japoneses, hispânicos e nativos

americanos apresentando maior risco (CHAN *et al.*, 1993; DABELEA *et al.*, 2009; LIU *et al.*, 2009). Foi demonstrado taxas de incidência mais alta em asiáticos em comparação com a população americana branca (KARTER *et al.*, 2013; SATTAR; GILL, 2015), e população branca do Reino Unido, (MCKEIGUE *et al.*, 1991), onde o maior risco está entre a população negra (HAINES *et al.*, 2007). Embora nenhuma razão clara tenha sido encontrada, fatores de estilo de vida moderno (que promovem a obesidade), socioeconômicos e propensão genética direta ou interações gene-ambiente foram postuladas.

A predisposição genética desempenha um papel importante no risco de desenvolvimento do DM2. Na última década, vários estudos de associação ampla do genoma de DM2 mostraram a natureza poligênica complexa em que a maioria desses *loci* aumenta o risco por meio de efeitos primários na secreção de insulina, e uma minoria age reduzindo a ação da insulina (FUCHSBERGER *et al.*, 2016; MCCARTHY, 2010). Dimas e colaboradores (2014) agruparam essas variantes com base no seu potencial mecanismo intermediário na fisiopatologia do DM2, com quatro variantes com um claro padrão de RI; dois reduzindo a secreção de insulina com hiperglicemia de jejum; nove reduzindo a secreção de insulina com glicemia de jejum normal; e um alterando o processamento da insulina. De acordo com esses dados, a arquitetura genética do DM2 é altamente poligênica, e estudos de associação adicionais são necessários para identificar a maioria dos *loci* DM2 (FLANNICK; FLOREZ, 2016). Interações entre *loci* de suscetibilidade e fatores ambientais podem estar subjacentes à falta de herdabilidade do DM2, portanto, o impacto de uma determinada variante genética pode ser modulada pelos fatores ambientais (e vice-versa), conforme evidenciado por estudos observacionais e ensaios clínicos (FRANKS *et al.*, 2013).

2.2.1.2 Obesidade, Baixa Atividade Física e Dieta Não Saudável

Obesidade (índice de massa corporal, IMC≥30 Kg/m^2) é o fator de risco mais forte para o DM2 (BELLOU *et al.*, 2018; CAREY *et al.*, 1997) e é associada a anormalidades metabólicas resultando na RI (SINHA *et al.*, 2002). Existe uma relação linear inversa entre o IMC e a idade de diagnóstico do DM2 (HILLIER; PEDULA, 2003). Os mecanismos exatos pelos quais a obesidade induz ao DM2 e RI ainda precisam ser elucidados; no entanto, vários fatores têm mostrado um papel significativo no desenvolvimento desse processo patológico, que envolve tanto mecanismos celulares

autônomos quanto comunicações entre órgãos. O sobrepeso e/ou obesidade estão presentes na maioria dos pacientes com DM2. Estudos experimentais e clínicos têm demonstrado que uma dieta com alto teor de gordura e baixo teor de fibras aumenta o risco de desenvolvimento da intolerância à glicose e do DM2. Além disso, a crescente substituição dos alimentos in natura, que são ricos em fibras, vitaminas e minerais, por produtos industrializados constitui um outro problema enfrentado pela dieta moderna que também potencializa o risco do indivíduo se tornar diabético tipo 2 (JÁBALI; CYRILLO, 2001).

Um estilo de vida sedentário é outro fator de risco para o DM2, conforme demonstrado pelo *Women's Health Study* (WEINSTEIN *et al.*, 2004) e *Kuipio Ischemic Heart Disease Risk Factor Study (LYNCH et al., 1996)*, que mostraram uma redução de 34% e 56% no desenvolvimento do DM2 em participantes que caminhavam 2-3 horas por semana ou pelo menos 40 minutos por semana, respectivamente. Existem três benefícios primários da atividade física no atraso do início do DM2. Primeiro, a contração das células musculares esqueléticas induz um aumento no fluxo sanguíneo para o tecido muscular, aumentando a captação de glicose do plasma (VENKATASAMY, V. V. *et al.*, 2013). Em segundo lugar, a atividade física reduz a notória gordura intra-abdominal, que é um conhecido fator de risco que promove RI (STRASSER, 2013). Finalmente, foi demonstrado que exercício de intensidade moderada melhora a captação de glicose em 40% (ROSS, 2003). Atividade física melhora a absorção de glicose e sensibilidade à insulina, mas também pode melhorar ou até reverter a inflamação e estresse oxidativo, que são fatores predisponentes do DM2 (VENKATASAMY, V. V. *et al.*, 2013).

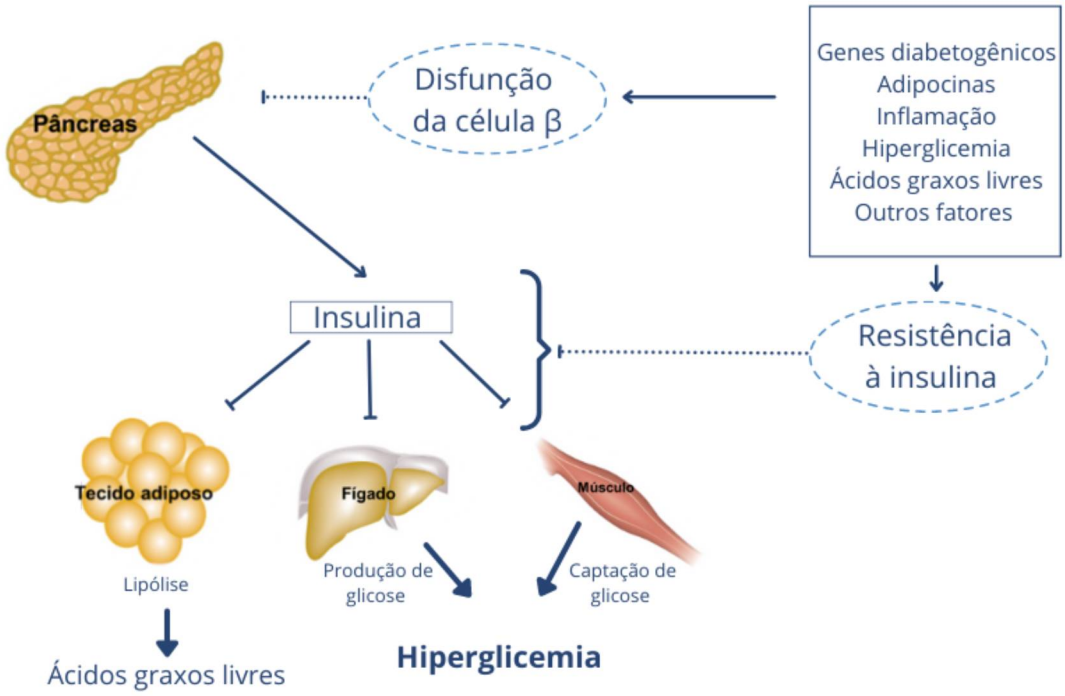
Os hábitos alimentares e a prática de atividades físicas exercem uma poderosa influência sobre o balanço energético, sendo considerados os principais fatores, passíveis de modificação, determinantes do sobrepeso e aparecimento de enfermidades como o diabetes colaborando com o aumento da RI e maior risco de desenvolvimento da DM2 (ALEXANDRE *et al.*, 2005).

2.2.2 Mecanismos que levam ao DM2 e Fisiopatologia

2.2.2.1 Fisiopatologia

Em relação à fisiopatologia da doença, um mau funcionamento da regulação entre a ação da insulina e a secreção de insulina resultam concentrações anormalmente elevadas de glicose no sangue (STUMVOLL, M. *et al.*, 2005). No caso de disfunção das células β, a secreção de insulina é reduzida, limitando a capacidade do corpo de manter as concentrações plasmáticas de glicose. Por outro lado, a RI contribui para o aumento da produção de glicose no fígado e diminuição da captação da glicose tanto no músculo, fígado e tecido adiposo. Mesmo que ambos os processos ocorram no início da patogênese e contribuam para o desenvolvimento da doença, a disfunção das células β é geralmente mais grave que a RI. No entanto, quando a disfunção das células β e a RI estão presentes, a hiperglicemia é amplificada levando à progressão do DM2 (FIGURA 2) (CERF, M., 2013; ZHENG *et al.*, 2018).

FIGURA 2 - FISIOPATOLOGIA DO *DIABETES MELLITUS* TIPO 2



O DM2 é caracterizado pela resistência a ação da insulina e disfunção das células beta pancreáticas. A resistência à insulina refere-se a perda da sensibilidade dos tecidos a insulina e ocorrendo menor captação da glicose e um aumento na produção hepática da glicose levando a Hiperglicemia. Já a disfunção da célula beta se dá pela secreção inadequada de insulina diante da resistência e da hiperglicemia. Estes eventos podem ser precipitados por fatores genéticos, obesidade, inatividade física e envelhecimento, aumentando as concentrações de ácidos graxos livres que vão interferir ou na funcionalidade das células beta ou na sensibilidade tecidual à insulina, ou também em ambos os fatores.

Fonte: Stumvoll e colaboradores (2005)

2.2.2.1.1 Fisiologia das células β: Secreção de insulina

Para resguardar a função adequada das células β, a integridade celular deve ser assegurada e os mecanismos e as vias implicadas na fisiologia das células β devem ser rigidamente reguladas (CERF, M. E., 2013).

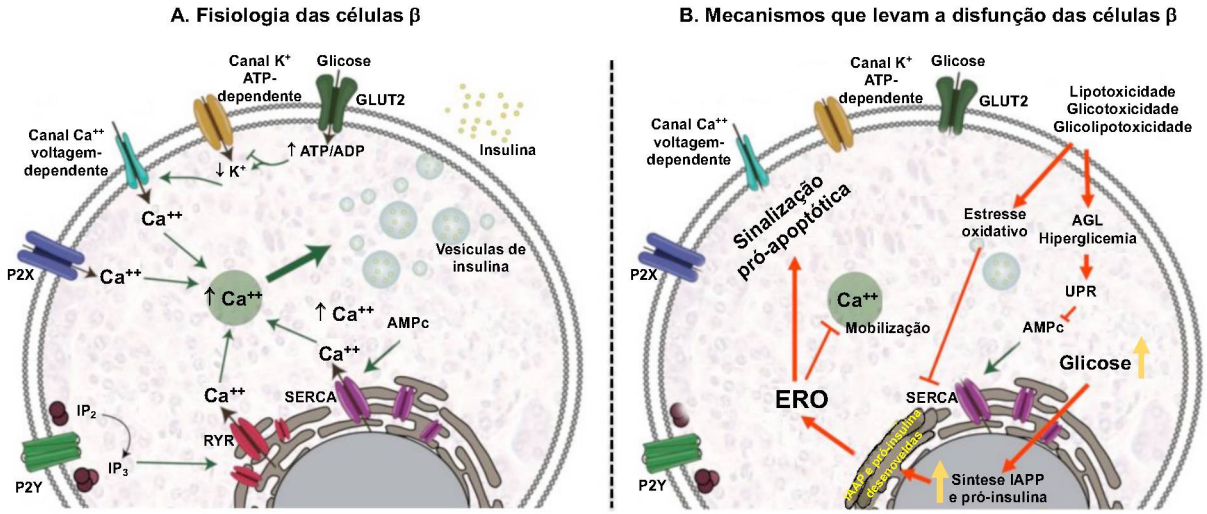
As células β são responsáveis pela produção de insulina, que é sintetizada como pré-pró-insulina. No processo de maturação, a pré-pró-insulina (FU *et al.*, 2013; HALBAN, 1994) sofre uma modificação conformacional realizada com a ajuda de várias proteínas no retículo endoplasmático (ER) para produzir pró-insulina (BUNNEY *et al.*, 2017). Em seguida, a pró-insulina é translocada do RE para o aparelho de Golgi (AG), entrando em vesículas secretoras imaturas e sendo clivada em peptídeo C e insulina (FU *et al.*, 2013; HALBAN, 1994).

Uma vez maturada, a insulina é armazenada em grânulos até que a liberação de insulina seja acionada. A liberação de insulina é desencadeada principalmente por uma resposta a altas concentrações de glicose. Vale destacar que alguns outros fatores também podem induzir a liberação de insulina, como aminoácidos, ácidos graxos e hormônios (BOLAND *et al.*, 2017). Quando as concentrações circulantes de glicose aumentam, as células β captam glicose principalmente através do transportador de glicose 2 (GLUT2), uma proteína transportadora de soluto que também funciona como um sensor de glicose para as células β. Quando a glicose entra, o catabolismo da glicose é ativado, aumentando a relação ATP/ADP intracelular, o que induz o fechamento da canais de potássio ATP-dependentes na membrana plasmática. Isso leva à despolarização da membrana e abertura dos canais de cálcio (Ca^{++}) voltagem-dependentes, permitindo a entrada de Ca^{++} na célula. O aumento das concentrações intracelulares de Ca^{++} desencadeia o *priming* (esta etapa ocorre na exocitose regulada e envolve modificações específicas que devem acontecer em certas moléculas da membrana celular para que a exocitose ocorra) e a fusão dos grânulos secretores contendo insulina, resultando na exocitose da insulina (BOLAND *et al.*, 2017; FU *et al.*, 2013; RORSMAN; ASHCROFT, 2018; SEINO *et al.*, 2011)(FIGURA 3A).

Além disso, os sinais de Ca^{++} podem ser amplificados pelos receptores RY (RYR) e podem desempenhar um importante papel no estímulo de acoplamento da secreção de insulina - em virtude de suas localizações estratégicas dentro da célula e sua habilidade de mediar a liberação de Ca^{++} induzida por Ca^{++} (*Ca^{++} induced Ca^{++}*

release - CICR). Receptores RY amplificam os sinais de Ca^{++} quando o canal é sensibilizado por moléculas mensageiras geradas a partir do metabolismo de nutrientes ou ligação de ligantes e estão envolvidos na amplificação da secreção de insulina (ISLAM, 2002) (FIGURA 3A).

FIGURA 3 - VIAS DE SINALIZAÇÃO ENVOLVIDAS NA SECREÇÃO DE INSULINA EM CONDIÇÕES FISIOLÓGICAS E MECANISMOS QUE LEVAM À DISFUNÇÃO DAS CÉLULAS B



Condições fisiológicas (A): A liberação de insulina é desencadeada principalmente por uma resposta a altas concentrações de glicose e a glicose é internalizada principalmente através do transportador GLUT2. O catabolismo da glicose aumenta a relação ATP/ADP, os canais de potássio ATP-dependentes são fechados levando a despolarização da membrana e abertura dos canais de Ca^{++} voltagem-dependentes. Este último permite influxo de Ca^{++} desencadeando exocitose de insulina. Canais adicionais de Ca^{++} como P2X (canais iônicos dependente de ligante), P2Y (receptores ligados a proteína G), SERCA (canais de Ca^{++} no RE) e RYR (canais de Ca^{++} no RE) contribuem para a mobilização de Ca^{++} e secreção de insulina. Mecanismos que levam à disfunção das células β (B): hiperglicemia e hiperlipidemia promovem estresse oxidativo levando à geração de espécies reativas de oxigênio (ERO) que inibem a mobilização de Ca^{++} e ativa sinais pró-apoptóticos. Além disso, um excesso de ácidos graxos livres (AGL) e hiperglicemia levam à ativação vias apoptóticas de resposta às proteínas mal enoveladas (*Unfolded Protein Response* - UPR) e geração de estresse do retículo endoplasmático (RE). Aumento sustentado das concentrações de glicose aumenta a biossíntese de pró-insulina e amilina ou polipeptídio amiloide da ilhota (*Islet Amyloid PolyPeptide* - IAPP), que geram ERO. GLUT2: transportador de glicose 2, P2X: receptor purinérgico X; P2Y: receptor purinérgico Y; IP2: inositol 1,3-bifosfato; IP3: inositol 1,4,5-trifosfato; RYR: receptores de rianodina; SERCA: Ca^{++}-ATPase do retículo sarcoendoplasmático; AGL: ácidos graxos livres, ERO: espécies reativas de oxigênio; UPR: resposta às proteínas mal enoveladas.
Fonte: Galicia-Garcia e colaboradores (2020)

No entanto, outros sinais celulares também podem auxiliar ou aumentar a liberação de insulina pelas células β. Entre eles, o AMPc pode ser o mensageiro mais importante que potencializa a liberação de insulina. Um acúmulo de evidências sugere que o AMPc induz a mobilização de vesículas secretoras contendo insulina pela depleção intracelular dos reservatórios de Ca^{++}, aumentando assim as concentrações

intracelulares de Ca^{++}. Também há convincentes evidências de que o ATP extracelular é outro importante regulador da função das células β . Está bem documentado que as células β liberam ATP através da exocitose dos grânulos de insulina após a estimulação da glicose (CUÍÑAS *et al.*, 2016).

A sinalização purinérgica via receptores purinérgicos P2Y e P2X estimula a mobilização de Ca^{++} e regula a exocitose da insulina também independentemente da glicose. Os purinoreceptores P2Y estão acoplados às proteínas G (LUSTIG *et al.*, 1993; SIMON *et al.*, 1995), enquanto os receptores do tipo P2X são canais iônicos não seletivos para cátions controlados por ligantes ativados por ATP (VALERA *et al.*, 1994).

No caso dos receptores P2Y, foi proposto que a liberação de insulina pode ser mediada pela mobilização de Ca^{++} intracelular em resposta a formação do inositol-1,4,5-trifosfato (IP3) que desencadeia a liberação de Ca^{++} dos estoques do RE, amplificando o sinal de exocitose desencadeada por Ca^{++} (GEMBAL *et al.*, 1993; LI *et al.*, 1991)(FIGURA 3A).

2.2.2.2 Mecanismos que levam à disfunção das Células β

A disfunção das células β tem sido tradicionalmente associada à morte das células β (CHRISTENSEN; GANNON, 2019). No entanto, recentes evidências sugerem que a disfunção das células β no DM2 pode ser devido a uma rede mais complexa de interações entre o ambiente e diferentes vias moleculares implicadas na biologia celular (HALBAN *et al.*, 2014). Em estado nutricional excessivo, semelhante ao encontrado na obesidade, hiperglicemia e hiperlipidemia estão frequentemente presentes, favorecendo a RI e a inflamação crônica. Nestas circunstâncias, as células β, devido a diferenças em sua suscetibilidade genética, estão sujeitos a pressões tóxicas, incluindo inflamação, estresse inflamatório, estresse do RE, estresse metabólico/oxidativo, estresse amiloide, com potencial de em última análise, levando a uma perda de integridade da ilhota (CHRISTENSEN; GANNON, 2019).

Um excesso de ácidos graxos livres (AGL) e hiperglicemia levam à disfunção das células β, induzido pelo estresse do RE através da ativação da apoptose pelas vias de resposta de proteína desdobrada (*Unfolded Protein Response* - UPR) (resposta celular ao acúmulo de proteínas desdobradas ou mal dobradas no lúmen do RE) (YAMAMOTO *et al.*, 2019). Na verdade, a lipotoxicidade, glicotoxicidade e

glicolipotoxicidade que ocorrem na obesidade, induzem estresse metabólico e oxidativo que leva a danos nas células β (HALBAN *et al.*, 2014). O estresse derivado das altas concentrações de AGLs saturados pode ativar a via UPR por vários mecanismos, incluindo a inibição da Ca^{++}- ATPase do retículo sarco/endoplasmático (*Sarco/Endoplasmic Reticulum* Ca^{++}*-ATPase* - SERCA) responsável pela mobilização Ca^{++} do RE; ativação dos receptores IP3 ou comprometimento direto de homeostase do RE. Além disso, altas contrações sustentadas de glicose aumentam a biossíntese de pró-insulina e amilina ou polipeptídeo amiloide de ilhota (*Islet Amyloid PolyPeptides* - IAPP) nas células β, levando ao acúmulo de insulina mal dobrada e IAAP e aumento da produção de enovelamento oxidativo das proteínas mediada pelas espécies reativas de oxigênio (ERO) (YAMAMOTO *et al.*, 2019). Esses efeitos alteram a mobilização fisiológica de Ca^{++} no RE e favorecem sinais pró-apoptóticos, degradação do mRNA da pró-insulina e induzem a liberação de Interleucina (IL)-1 β que recruta macrófagos e aumenta a inflamação local na ilhota (HALBAN *et al.*, 2014) (FIGURA 1B).

Como mencionado anteriormente, a secreção de insulina deve ser finamente regulada para atender com precisão as exigências metabólicas. Por essa razão, a integridade adequada das ilhotas deve ser conservada para permitir que as células β respondam às necessidades metabólicas. Em condições patogênicas, o mecanismo descrito acima pode levar à interrupção da integridade/organização da ilhota, prejudicando a comunicação célula a célula ideal dentro das ilhotas pancreáticas, contribuindo para a má regulação da liberação de insulina e glucagon e, finalmente, exacerbando a hiperglicemia. Defeitos na síntese de quaisquer precursores de insulina, ou a própria insulina, bem como a interrupção do mecanismo de secreção, pode levar à disfunção secretora de insulina, o fator primário da falência das células β e uma causa do DM2. Por exemplo, expressão reduzida do transportador de glicose GLUT2 afetaria a via de sinalização a jusante (HOANG DO; THORN, 2015), enquanto a falha no dobramento de pró-insulina é outro achado comumente associado à produção deficiente de insulina e diabetes (LIU *et al.*, 2018).

2.2.2.3 Condições patológicas que perpetuam o DM2

2.2.2.3.1 Fatores Nutricionais

A dieta ocidental altamente calórica contém grandes quantidades de gorduras e carboidratos que elevam a glicose e lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDLs), quilomícrons (Q) e seus remanescentes (Qr) que são ricos em triglicerídeos (TG). Isso induz um pico nas concentrações das espécies reativas de oxigênio (ERO), o que, por sua vez, leva a uma geração anormal de moléculas inflamatórias. Dado que a inflamação é um reconhecido indutor de estresse oxidativo, ocorre uma interação sinérgica entre os dois processos após uma refeição pesada, com consequente amplificação dos efeitos nocivos pós-prandiais. O aumento sustentado e acentuado das concentrações de ERO no estado estacionário contribui significativamente para a patogênese do DM2 e RI. Portanto, um ambiente pró-oxidante leva à disfunção mitocondrial, estresse do RE, ativação da NADPH oxidase (NOX) e produção de superóxido (O_2^-). O aumento na produção de O_2^- ativa as cinco principais vias envolvidas na patogênese das complicações do diabetes: intensificação da via dos polióis, aumento da formação de produtos finais de glicação avançada (*Advanced Glycation End-products* - AGEs), aumento da expressão do receptor de AGEs (*Receptor* of *Advanced Glycation End-products* – RAGE) e seus ligantes ativadores, ativação das isoformas da proteína quinase C (*Protein Kinase C* - PKC) e hiperatividade da via da hexosamina (DALI-YOUCEF *et al.*, 2013; HOTAMISLIGIL, 2008; ROCA-RIVADA *et al.*, 2013). Por essas vias, o aumento intracelular de ERO causa angiogênese defeituosa em resposta à isquemia, ativa uma série de vias pró-inflamatórias e causam alterações epigenéticas de longa duração que conduzem expressão de genes pró-inflamatórios mesmo após a glicemia ser normalizada (GIACCO; BROWNLEE, 2010). Além disso, aumento das concentrações plasmáticas de AGL também levam à disfunção mitocondrial através de dois mecanismos diferentes: (1) subprodutos do metabolismo dos AGL perturbam o fluxo de elétrons ao longo da cadeia respiratória mitocondrial e (2) através da incorporação de AGL nas membranas mitocondriais, provavelmente favorecendo vazamento de elétrons (GRACIANO *et al.*, 2011).

2.2.2.3.2 Atividade Física

A redução da atividade física e do treinamento físico, e aumento dos comportamentos sedentários constituem uma ligação entre obesidade e o DM2 e estão associados com o aumento de marcadores de inflamação sistêmica crônica de

baixo grau (ESSER *et al.*, 2014; PRADHAN *et al.*, 2001). Nesta condição, moléculas pró-inflamatórias são liberadas na corrente sanguínea e dentro de tecidos específicos, como interleucina 6 (IL-6), proteína C-reativa (PCR), fator de necrose tumoral alfa (*Tumor Necrosis Factor-alpha* -TNF-α) ou IL-1 induzem um estado inflamatório conhecido como inflamação metabólica (BUNNEY *et al.*, 2017). De fato, a IL-1 está envolvida na resposta autoimune às células β no pâncreas, inibição da função das células β e ativação do fator nuclear kappa B (*Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells* - NF-κB), inibindo assim a função das células β e promovendo a apoptose (VENKATASAMY, VIGHNESH VETRIVEL *et al.*, 2013). Dados pré-clínicos sugerem que a resolução da inflamação pode prevenir o desenvolvimento do DM2 na obesidade e pré-diabetes, o que foi comprovado por dados pré-clínicos em animais mostrando que a deleção do complexo macromolecular inflamassoma NLRP3, responsável pela produção de IL-1β e IL-18, resultou em melhora da sensibilidade à insulina (VANDANMAGSAR *et al.*, 2011).

A perda de peso intencional continua a ser a terapia fundamental para melhorar a sensibilidade à insulina e, em algumas circunstâncias para prevenir a incidência de DM2 em indivíduos com obesidade e pré-diabetes (ADA, 2022a). O exercício regular e o aumento da atividade física aumentam a produção de citocinas anti-inflamatórias como antagonista do receptor de IL-1 (IL-1Rα) e receptor de TNF solúvel (TNFRs) que são antagonistas de IL-1 e TNF-α, respectivamente. Indivíduos com maior atividade física também apresentam redução das concentrações plasmáticas de IL-6, IL-18 e PCR, juntamente com concentrações mais baixas de leptina, uma molécula associada PCR (SHAMSUZZAMAN *et al.*, 2004). O exercício físico pode melhorar o estresse oxidativo induzido pelo DM2, através da indução da síntese de antioxidantes, tais como a glutationa (GSH), um importante antioxidante não enzimático(LEEUWENBURGH *et al.*, 1994) e outros antioxidantes enzimáticos que levam a uma redução a longo prazo nas concentrações de radicais livres (VENKATASAMY, VIGHNESH VETRIVEL *et al.*, 2013).

Finalmente, a irisina é uma miocina regulada pelo exercício, que melhora a tolerância à glicose (POLAK *et al.*, 2017) secretada pelo músculo esquelético (BOSTRÖM *et al.*, 2012) e tecido adiposo (ROCA-RIVADA *et al.*, 2013) em resposta ao exercício (HANDSCHIN; SPIEGELMAN, 2008). Descobriu-se que pacientes com DM2 têm concentrações circulantes mais baixas de irisina em comparação com

indivíduos saudáveis. Além disso, pacientes diabéticos com DCV apresentaram irisina sérica significativamente menor do que pacientes sem DCV (PARK *et al.*, 2013). Concentrações baixas de irisina sérica foram associados a um risco de 1,6 vezes maior de incidência de DCV em pacientes com DM2 (EL-LEBEDY *et al.*, 2018).

2.2.2.3.3 Disbiose Intestinal

A microbiota intestinal é composta por muitas espécies microbianas que afetam a fisiologia humana e participam de diferentes processos biológicos (LYNCH; PEDERSEN, 2016). Podem modular o sistema imunológico e resposta inflamatória, regulam a integridade da barreira intestinal e o metabolismo humano, participando da síntese de metabólitos. Microrganismos residentes no intestino produzem muitos metabólitos que contribuem à fisiologia em indivíduos saudáveis. No entanto, as alterações devido a fatores herdados e adquiridos como idade, nutrição, estilo de vida, predisposição genética ou doenças subjacentes podem afetar a proporção de metabólitos produzidos pela microbiota intestinal levando a distúrbios metabólicos que podem culminar em doença (BIAGI *et al.*, 2012; OCHOA-REPÁRAZ; KASPER, 2014; SCARPELLINI; TACK, 2012). A melhor compreensão da microbiota intestinal evidenciou seu importante papel no desenvolvimento do diabetes e estudos recentes indicam que alterações na disbiose podem promover RI e DM2 (LI *et al.*, 2017; SIRCANA *et al.*, 2018). Uma dieta rica em gordura pode induzir até três vezes a produção de lipopolissacarídeo por bactérias Gram-negativas em modelos de camundongos, contribuindo assim para inflamação de baixo grau e resistência à insulina (CANI *et al.*, 2007; LI *et al.*, 2017). Além disso, a disbiose intestinal pode reduzir a síntese de ácidos graxos de cadeia curta que promovem a integridade da barreira intestinal, proliferação de células β pancreáticas e biossíntese de insulina (TAN *et al.*, 2014; TANG *et al.*, 2015). A disbiose também pode comprometer a produção de outros metabólitos, como aminoácidos ramificados e trimetilamina, interrompendo assim a homeostase da glicose e desencadeando o desenvolvimento de DM2 (NEIS *et al.*, 2015; SHAN *et al.*, 2017). Compreender as implicações clínicas do microbioma intestinal é um campo relativamente novo e requer mais pesquisas para melhor elucidar a conexão entre a microbiota intestinal e o DM2.

2.2.2.3.4 Memória Metabólica

A memória metabólica refere-se à persistência das complicações diabéticas mesmo após manutenção do controle glicêmico. Este conceito surgiu a partir dos resultados de vários ensaios clínicos em larga escala, que mostraram que após o início do diabetes, as complicações do diabetes persistem e progridem mesmo quando o controle glicêmico é restaurado através de intervenção farmacêutica (GAEDE, P. H. *et al.*, 2003; HOLMAN *et al.*, 2008; TURNER *et al.*, 1999). Entre eles, o estudo pós-clínico do UKPDS e o estudo clínico Steno-2 mostraram que intervenções glicêmicas especificamente precoces previnem complicações diabéticas e tem uma diminuição acentuada nos desfechos de DCV em pacientes que receberam tratamento padrão ou tratamento intensivo após seu diagnóstico (HOLMAN *et al.*, 2008). Mais tarde, modelos animais de diabetes e cultivo celular *in vitro* demonstraram que o período hiperglicêmico inicial resulta em anormalidades permanentes (incluindo expressão gênica aberrante) de órgãos/células alvos. A memória metabólica envolve quatro mecanismos: epigenética, estresse oxidativo, glicação não enzimática de proteínas e inflamação crônica (CERIELLO *et al.*, 2009; ENGERMAN, 1989; IHNAT *et al.*, 2007; OLSEN *et al.*, 2012).

A epigenética envolve a modulação genética por outros fatores além da sequência de DNA dos indivíduos, e pode regular a expressão gênica e determinar quais proteínas são transcritas (TZIKA *et al.*, 2018). Existem diferentes mecanismos de regulação epigenética: metilação direta de resíduos de citosina ou adenina, modificações covalentes das proteínas histonas, organização estrutural da cromatina e RNAs não codificantes. Interrupções ou desequilíbrios nos mecanismos epigenéticos podem levar ao desenvolvimento da fisiopatologia diabética (ROSEN *et al.*, 2018). MicroRNAs (miRNAs) são pequenas sequências de RNA não codificantes sintetizadas como moléculas não maduras que passam por várias etapas de processamento tanto no núcleo quanto no citoplasma para se tornarem miRNAs totalmente amadurecidos. Uma vez amadurecidos, os miRNAs se ligam ao mRNA de seu gene alvo, levando ao mRNA silenciamento ou degradação (WAHID *et al.*, 2010). Evidências crescentes destacam a importância da regulação pós-transcricional mediada por miRNA em diferentes aspectos da biologia das células β, como diferenciação celular, sinalização mediada por citocinas e por fatores de crescimento, metabolismo da glicose e síntese e secreção da insulina (LAPIERRE; STOFFEL,

2017). A desregulação da expressão de miRNA pode prejudicar diretamente a função das células β, levando ao desenvolvimento do DM2 (ESGUERRA *et al.*, 2018). Até o momento, mais de 2.600 miRNAs foram descritos no genoma humano (miRBase, v.22.1), e vários miRNAs demonstraram estarem envolvidos na patogênese do DM2, incluindo miR-200, miR-7, miR-184, miR-212/miR132 e miR-130a/b/miR-152 (OFORI *et al.*, 2017). Por exemplo, a superexpressão de miR-7 resulta em secreção reduzida de insulina através da inibição de genes envolvidos na fusão das vesículas mediada pela atividade do complexo SNARE, tais como as proteínas Snca, Cspa e Cplx1(LATREILLE *et al.*, 2014). No caso do miR-375, a superexpressão resulta em exocitose prejudicada e, assim, redução da secreção de insulina. Por outro lado, a regulação negativa de miR-375 causa uma redução na massa das células β (ESGUERRA *et al.*, 2018; LATREILLE *et al.*, 2014; LATREILLE *et al.*, 2015; POY *et al.*, 2009). Vários estudos têm evidenciado que a desregulação do perfil de microRNA (miRNA), metilação pós-traducional das histonas e inclusão das variantes de histona não canônica em octômeros pode persistir mesmo após a restauração da normoglicemia (BLOMEN; BOONSTRA, 2011; BOGDANOVIĆ; VEENSTRA, 2009; MOSAMMAPARAST; SHI, 2010; REDDY *et al.*, 2015). MiRNAs participam da memória metabólica através de sua interação com seus mRNA alvos de genes que codificam enzimas envolvidas na metilação do DNA e aquelas enzimas fortemente reguladas ao nível de metilação do promotor, transcrição e processamento (BREVING; ESQUELA-KERSCHER, 2010). Foi mostrado que altas concentrações de glicose podem alterar as modificações pós-traducionais das histonas (PTHMs) e a atividade das DNA metiltransferases gerando alterações irreversíveis que explicam os efeitos nocivos a longo prazo da memória metabólica (AL-HADDAD *et al.*, 2016; BRASACCHIO *et al.*, 2009; MIAO *et al.*, 2004; REDDY, MARPADGA A.; NATARAJAN, RAMA, 2011).

A hiperglicemia induz a um excesso de geração de ERO pelas mitocôndrias, o que dá origem às complicações diabéticas (NISHIKAWA *et al.*, 2000) que podem persistir mesmo quando a hiperglicemia é controlada. O dano subsequente do estresse oxidativo induzido pela hiperglicemia pode ser prevenido quando um bom controle glicêmico é iniciado muito precocemente, mas não é facilmente revertido se um pobre controle glicêmico for mantido por um período mais longo (KOWLURU *et al.*, 2004; KOWLURU *et al.*, 2007). Nos estágios iniciais do DM2, existe uma relação entre hiperglicemia, aumento do estresse oxidativo, e formação excessiva de AGEs.

À medida que a doença progride, há glicação persistente das proteínas dos componentes da cadeia respiratória, que juntamente com os danos no DNA mitocondrial podem gerar uma concatenação de eventos independentes da hiperglicemia levando a uma sinergia entre o estresse oxidativo e AGEs (CERIELLO *et al.*, 2009). Os efeitos desse desequilíbrio metabólico ativam processos inflamatórios por meio de ligação ao receptor de AGEs ou de ERO que podem modificar a composição e estrutura da matriz extracelular (REDDY *et al.*, 2015). Essas alterações estruturais podem causar disfunção endotelial e, posteriormente, aterosclerose (REDDY *et al.*, 2015).

Finalmente, a inflamação de baixo grau, que está envolvida no desenvolvimento do DM2 e suas complicações vasculares, tem demonstrado mediar a memória metabólica. Muitos fatores ambientais (idade, obesidade, sedentarismo e dieta) que promovem o desenvolvimento do DM2 desencadeiam uma resposta inflamatória levando a RI e disfunção endotelial (GUARNER; RUBIO-RUIZ, 2015; REDDY, MARPADGA A.; NATARAJAN, RAMA, 2011; THOMPSON; WEBB, 2013). A obesidade leva à ativação do NF-κB, que medeia a expressão de genes inflamatórios, aumentando a ligação de monócitos as células endoteliais e as células da musculatura lisa vascular, promovendo subsequentemente a diferenciação de monócitos para macrófagos (REDDY, M. A.; NATARAJAN, R., 2011). Além disso, a ativação do NF-κB induz a expressão de citocinas inflamatórias que estão envolvidas na inflamação vascular, com subsequente geração de moléculas de adesão endotelial, proteases, e outros mediadores (GUARNER; RUBIO-RUIZ, 2015). Outro fator importante que conecta a inflamação e o estresse oxidativo na condição de obesidade é o receptor *Toll-like*, que contribui para hipertensão, resistência à insulina, e obesidade (REDDY, M. A.; NATARAJAN, R., 2011).

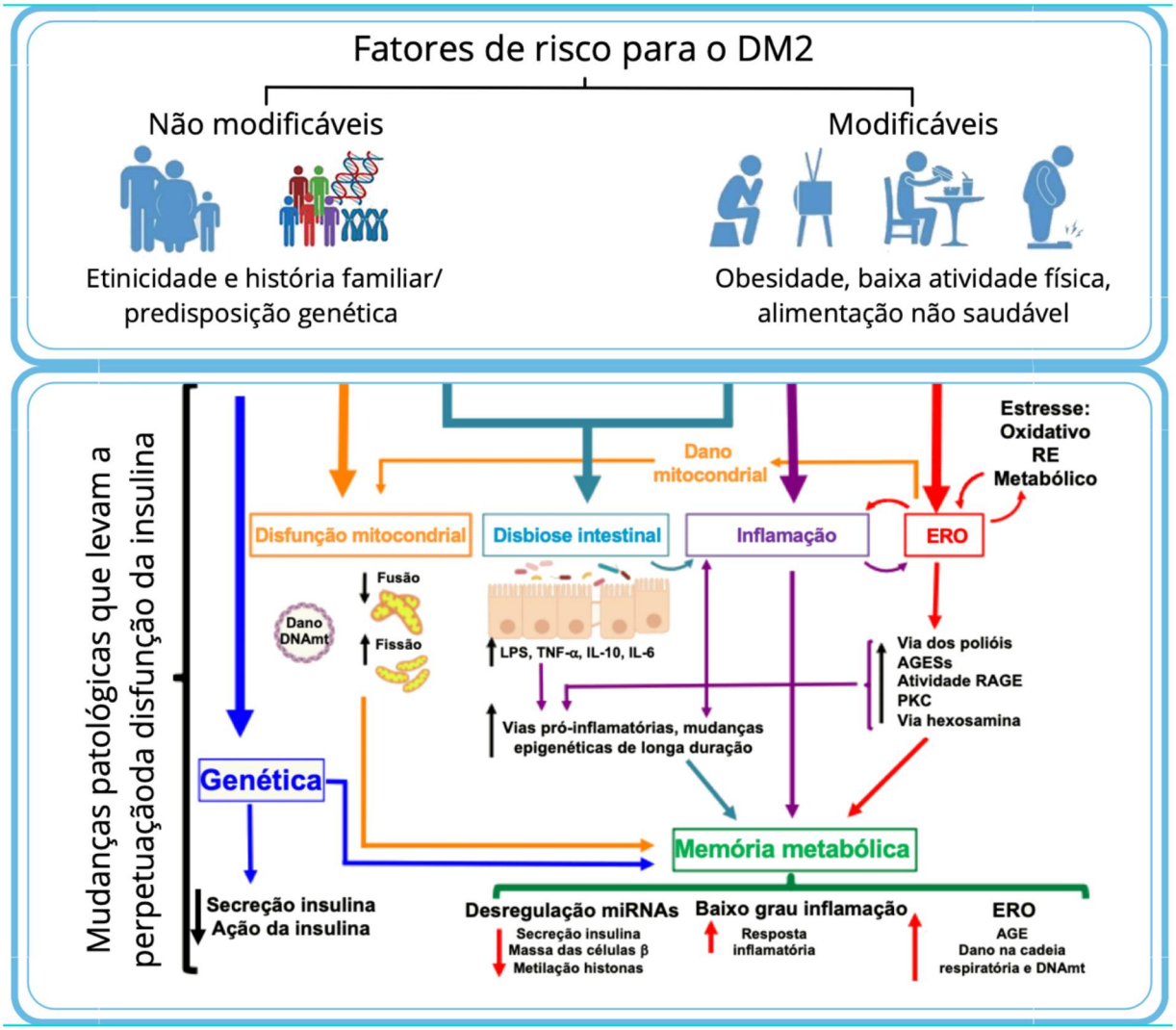
Em resumo, o DM2 é um distúrbio heterogêneo e progressivo que representa uma série de distúrbios metabólicos e condições associadas à hiperglicemia causadas por defeitos na secreção de insulina e/ou na sua ação devido a uma complexa rede de condições patológicas. Há muitas vias diferentes, reguladas por vários fatores genéticos e ambientais, que interagem e se reforçam mutuamente entre si levando a um risco aumentado para outras doenças, incluindo doenças cardíacas, arteriais periféricas e cerebrovasculares, obesidade e doença hepática gordurosa não alcoólica, entre outros(GALICIA-GARCIA *et al.*, 2020). A complexa rede de condições patológicas que levam ao desenvolvimento do DM2 está resumida na FIGURA 4.

2.2.2.3.5 Disfunção Mitocondrial

Há evidências crescentes associando a disfunção mitocondrial com o desenvolvimento do DM2, complicações da RI e DM2 relacionadas à idade (KIM *et al.*, 2008). De fato, estresse oxidativo, defeitos na biogênese mitocondrial, mutações genéticas que afetam a integridade mitocondrial e o envelhecimento promovem disfunção e estão intimamente associados ao desenvolvimento do DM2 (PETERSEN *et al.*, 2003; STUMP *et al.*, 2003).

A principal função das mitocôndrias é a síntese de ATP através da fosforilação oxidativa em resposta à demanda metabólica (SAZANOV, 2015). As mitocôndrias também participam da produção de diferentes metabólitos usados como precursores de várias macromoléculas (lipídios, proteínas e DNA). Além disso, as mitocôndrias desempenham um papel importante na manutenção da homeostase de íons, eliminação de ERO, resposta ao estresse e servem para integrar várias vias de sinalização (Focusing on mitochondrial form and function, 2018; SPINELLI; HAIGIS, 2018). Desequilíbrio entre formação e gasto de energia na mitocôndria gera disfunção mitocondrial, um estado caracterizado por uma taxa reduzida de produção de energia para a respiração (KIM *et al.*, 2008). Nestas circunstâncias, a eficiência da oxidação de nutrientes é reduzida levando a uma diminuição da razão da síntese de ATP/consumo de oxigênio, o que aumenta a produção de O_2^- (SHIGENAGA *et al.*, 1994). De fato, o acúmulo de ERO nas mitocôndrias é um mecanismo proposto ligando a disfunção mitocondrial à RI (SERGI *et al.*, 2019). Essa relação foi corroborada em estudos que demonstraram diminuição da capacidade oxidativa das mitocôndrias no músculo esquelético e metabolismo lipídico prejudicado em obesos e indivíduos resistentes à insulina em comparação com controles saudáveis (KELLEY *et al.*, 1999; KIM *et al.*, 2000; SIMONEAU *et al.*, 1999).

FIGURA 4 - FATORES DE RISCO DO DIABETES MELLITUS TIPO 2 (DM2) E AS ALTERAÇÕES PATOLÓGICAS QUE LEVAM À PERPETUAÇÃO DA DISFUNÇÃO DA INSULINA



Combinações complexas de fatores genéticos, metabólicos e ambientais que interagem entre si constituindo tanto fatores de risco não modificáveis (etnia e história familiar/predisposição genética) quanto modificáveis (obesidade, baixa atividade física e dieta não saudável). Esses estados afetam a função celular resultando em uma rede complexa de alterações patológicas que influenciam mutuamente e levam à perpetuação da disfunção da insulina. ERO: espécies reativas de oxigênio; RE: retículo endoplasmático; AGEs: produtos finais de glicação avançada; RAGE: receptor dos AGEs; PKC: proteína quinase C; LPS: lipopolissacarídeo; miRNA: microRNA; DNAmt: DNA mitocondrial.
Fonte: Galicia-Garcia e colaboradores (2020)

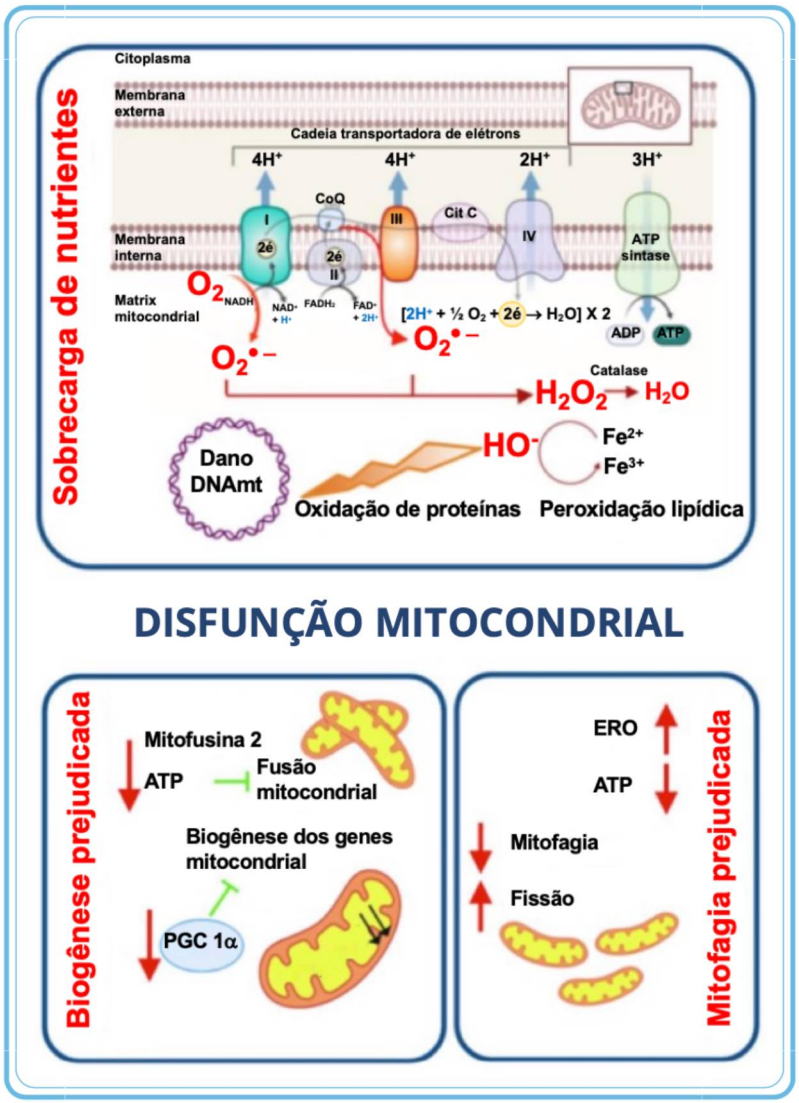
Além disso, pacientes com DM2 apresentaram diminuição da transcrição dos genes envolvidos no metabolismo oxidativo que são regulados pelo co-ativador-1 alfa do receptor ativado por proliferador do peroxissoma (*Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator* - PGC 1α) (MOOTHA *et al.*, 2003; PATTI *et al.*, 2003) e uma taxa diminuída de ressíntese da fosfocreatina, ambos indicativos de função mitocondrial prejudicada (SCHRAUWEN-HINDERLING *et al.*, 2007) (FIGURA 5). Além disso, alguns parentes de pacientes com DM2 apresentaram diminuição da respiração mitocondrial sugerindo que a disfunção mitocondrial pode preceder o desenvolvimento do DM2. Também foi proposto que o desenvolvimento do DM2 pode

ser uma consequência direta de defeitos no sistema de fosforilação oxidativa e da cadeia transportadora de elétrons (CTE) em vez de uma diminuição no conteúdo mitocondrial (PHIELIX *et al.*, 2008).

A geração de ERO está altamente implicada na relação entre disfunção mitocondrial e resistência à insulina. A produção de ERO ocorre principalmente no complexo I e complexo III da CTE e aumenta quando a CTE não é capaz de lidar com a entrada excessiva de elétrons. Nestas circunstâncias, como consequência da sobrecarga de nutrientes, o suprimento de elétrons para a CTE mitocondrial aumenta e o excesso é transferido para o oxigênio gerando O_2^- e subsequente peróxido de hidrogênio (SCHIEBER; CHANDEL, 2014). ERO gerado nas mitocôndrias oxidam os resíduos de cisteína e metionina das proteínas, danificando a estrutura das proteínas, prejudicando sua função e eventualmente causando a morte celular. As espécies de ERO também danificam o DNA e os lipídios de membrana, promovendo assim a disfunção mitocondrial (EZRATY *et al.*, 2017). Além disso, a superprodução de ERO ativa a via dos polióis, a formação de AGEs e a expressão de RAGE e sua ativação por ligantes. Também ativa as isoformas de PKC e regula positivamente a via da hexosamina, contribuindo para a piora do DM2 (CERIELLO, 2012; JOHNSON *et al.*, 2012). Em suma, a geração excessiva de ERO pelas mitocôndrias contribui para a aceleração da progressão do DM2 (FIGURA 5).

A disfunção mitocondrial inclui uma redução na biogênese mitocondrial, juntamente com uma diminuição na expressão de proteínas oxidativas mitocondriais, como os complexos da CTE, o que leva à diminuição da oxidação do substrato. O dano produzido pelo alto estresse oxidativo nas mitocôndrias ativa processos mitofágicos para eliminar mitocôndrias disfuncionais ou em caso de excessivo estresse celular à apoptose (SCHOFIELD; SCHAFER, 2021). Esses dois processos reduzem a utilização do substrato e aumentam o acúmulo de intermediários lipídicos, como diacilgliceróis (DAG) e ceramida que perturbam a via de sinalização da insulina (MONTGOMERY; TURNER, 2015).

FIGURA 5 - DISFUNÇÃO MITOCONDRIAL E CONTRIBUIÇÃO PARA O DESENVOLVIMENTO DO DM2



Estresse oxidativo, biogênese mitocondrial defeituosa e a mitofagia prejudicada promovem a disfunção mitocondrial. A geração de ERO liga a disfunção mitocondrial à RI. Como consequência da sobrecarga de nutrientes, o suprimento de elétrons para a CTE mitocondrial aumenta e o excesso de elétrons é transferido para a geração de oxigênio O_2^- e H_2O_2. As ERO oxidam proteínas, danificam o DNA e os lipídios da membrana. Mitofusina-2 e PGC 1α são regulados negativamente levando a redução da biogênese mitocondrial. Estresse celular e produção de ERO contribuem para uma maior fissão mitocondrial e mitofagia prejudicada. PCG 1α: co-ativador-1 alfa do receptor ativado por proliferador do peroxissoma; DNAmt: DNA mitocondrial; ERO: espécies reativas de oxigênio.
Fonte: Galicia-Garcia e colaboradores (2020)

DAG induz um incremento da fosforilação de serina/treonina do substrato-1 do receptor de insulina (*Insulin Receptor Substrate-1* - IRS-1), reduzindo a fosforilação da tirosina estimulada pela insulina e diminuindo a propagação a jusante da via de sinalização da insulina (CHAVEZ; SUMMERS, 2012) enquanto a ceramida inibe a proteína quinase Akt ou B (*v-akt murine thymoma viral oncogene homolog* – Akt ou *Protein Kinase B* – PKB) (CHAVEZ; SUMMERS, 2012). O acúmulo de DAG e ceramida contribui para a disfunção mitocondrial observada na RI (FIGURA 5).

Defeitos na biogênese mitocondrial podem ser mediados pela regulação negativa de PGC 1α que também foi detectado em pacientes com DM2 (MOOTHA *et al.*, 2003; PATTI *et al.*, 2003). O PGC 1α é um coativador de transcrição que regula a expressão de genes-chave envolvidos na biogênese mitocondrial, termogênese adaptativa e metabolismo do substrato metabólico (LIANG; WARD, 2006). Além disso, alguns dos genes envolvidos no metabolismo oxidativo que são regulados negativamente em indivíduos com DM2 estão sob o controle de PGC 1α (PATTI *et al.*, 2003). Mitofusina-2, um fator chave na biogênese mitocondrial também é regulado negativamente em humanos com DM2 (BACH *et al.*, 2005). Interessantemente, as concentrações de mitofusina-2 aumentam com a perda de peso, indicando que o excesso de nutrientes e energia leva a defeitos na dinâmica mitocondrial (BACH *et al.*, 2005).

A homeostase mitocondrial é mantida através da biogênese mitocondrial e da depuração seletiva de organelas danificadas. A dinâmica mitocondrial é crucial para manter as mitocôndrias saudáveis e controlar sua quantidade. A fissão das mitocôndrias promove a remoção de mitocôndrias danificadas em um processo conhecido como mitofagia, que deve ser regulado de forma eficiente e rigorosa para preservar a homeostase celular (NOVAK, 2012). Assim, a mitofagia é considerada um dos principais mecanismos que controlam a quantidade e qualidade mitocondrial (WEI *et al.*, 2015). O processo de remoção de mitocôndrias danificadas consiste em duas etapas: a indução de autofagia geral e o *priming* das mitocôndrias danificadas para reconhecimento seletivo de autofagia (DING; YIN, 2012). Uma vez concluído o processo de degradação, os produtos são liberados de volta ao citosol, onde os constituintes macromoleculares são reciclados. Este processo gera energia para manter a viabilidade celular em condições desfavoráveis e protege a célula durante condições de estresse (NOVAK, 2012; WESTERMANN, 2010). Quando a mitofagia é prejudicada, o estresse celular e a produção de ERO aumentam contribuindo para a redução da sensibilidade à insulina hepática e homeostase da glicose, dois dos principais ramos patológicos do desenvolvimento do DM2 (KIM *et al.*, 2008; YANG *et al.*, 2010). Desregulação da dinâmica das mitocôndrias com uma mudança para a fissão promove disfunção metabólica, como demonstrado pelo início da obesidade e da RI após a ablação das proteínas de fusão em camundongos (QUIRÓS *et al.*, 2012; SEBASTIÁN *et al.*, 2012). Além disso, o aumento da fissão mitocondrial e fragmentação mitocondrial têm sido associados à despolarização mitocondrial,

produção prejudicada de ATP e diminuição da captação de glicose dependente de insulina, bem como o aumento de ERO mitocondrial e sinalização prejudicada de insulina na linhagem celular murina C2C12 (modelo para estudo da miogênese) e cíbridas (modelo para mitocondriopatias), respectivamente (JHENG *et al.*, 2012; LIN *et al.*, 2018). Esses estudos destacam que o efeito deletério do desequilíbrio da dinâmica mitocondrial sobre o metabolismo saudável. A fissão aumentada das mitocôndrias também afeta negativamente a β-oxidação dos ácidos graxos, que é o defeito metabólico pivô na obesidade e RI (KELLEY *et al.*, 1999; SIMONEAU *et al.*, 1999) contribuindo para o acúmulo de espécies lipídicas lipotóxicas. A alteração da dinâmica mitocondrial em favor da fusão também tem sido associada a um aumento da utilização nos ácidos graxos supostamente prevenindo a lipotoxicidade (LIONETTI *et al.*, 2014).

O papel da genética mitocondrial no risco do DM2 foi claramente estabelecido. Com efeito, várias variantes de DNA mitocondrial (DNAmt) (homoplásmia ou heteroplásmia) têm sido associadas ao desenvolvimento do DM2. Até o momento, o grupo de variantes heteroplásmicas (presentes em apenas uma fração do DNAmt) associadas a um maior risco de desenvolvimento de DM2 inclui A3243G, T14577C e A5178C (KADOWAKI *et al.*, 1994; TAWATA *et al.*, 2000; WANG *et al.*, 2001; YANG *et al.*, 2012). O grupo de variantes homoplásmicas (presentes em todas as moléculas de DNAmt) associadas ao risco de T2DM inclui C1310T, G1438A, A12026G, T16189C e A14693G (POULTON *et al.*, 2002; TANG *et al.*, 2006; TAWATA *et al.*, 1998). É importante observar que estudos adicionais são necessários para determinar se tecidos metabolicamente mais ativos em gerar mais ERO mitocondriais têm taxas aumentadas de heteroplasmia de DNAmt em DM2.

Para resumir, existe uma relação altamente diferenciada e bidirecional entre disfunção mitocondrial e DM2. Por um lado, aspectos do DM2, como a resistência à insulina, podem levar à disfunção mitocondrial, como a sobrecarga de nutrientes que leva ao acúmulo de EROs. Por outro lado, a disfunção mitocondrial pode predispor os pacientes a desenvolver DM2 posteriormente, como evidenciado pela presença de variantes de DNAmt associadas ao DM2. Pesquisas adicionais são necessárias para caracterizar melhor a relação entre a saúde mitocondrial e o diabetes (GALICIA-GARCIA *et al.*, 2020).

2.2.2.4 Resistência Insulina (RI)

Resistência insulina (RI) refere-se a uma diminuição na resposta metabólica das células responsivas à insulina ou, em um nível sistêmico, uma resposta prejudicada/menor à insulina circulante pelas concentrações plasmáticas de glicose (CZECH, 2017). Tem três grandes categorias de condições de RI ou deficiência de insulina: (1) secreção diminuída de insulina pelas células β; (2) antagonistas da insulina no plasma, devido a contrarreguladores hormonais ou não hormonais que prejudicam os receptores ou sinalização da insulina; e (3) resposta de insulina prejudicada nos tecidos-alvo (PEARSON *et al.*, 2016). A ação da insulina é influenciada pela interação de moléculas adicionais, incluindo o hormônio do crescimento e fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (*Insulin-like Growth Factor 1* - IGF-1) no estado alimentado. Durante o jejum, a resposta da insulina é mitigada pelo glucagon, glicocorticoides e catecolaminas para prevenir a hipoglicemia induzida por insulina. A razão insulina/glucagon desempenha um papel importante nesta regulação, uma vez que determina o grau relativo de fosforilação das enzimas a jusante nas vias de sinalização regulatórias. Enquanto as catecolaminas promovem a lipólise e glicogenólise, os glicocorticoides promovem o catabolismo muscular, a gliconeogênese e a lipólise. Por isso, a secreção excessiva desses hormônios pode ser responsável pela indução de RI (NUSSEY; WHITEHEAD, 2001; WILCOX, 2005). Em relação à última categoria, existem três principais órgãos extra pancreáticos sensíveis à insulina que desempenham papéis importantes nos processos supracitados: músculo esquelético, tecido adiposo e fígado. A ação defeituosa da insulina nesses tecidos geralmente precede o desenvolvimento da RI sistêmica, levando progressivamente ao DM2.

2.2.2.4.1 Músculo Esquelético

A RI do músculo esquelético é considerada o fator extra pancreático mais importante no desenvolvimento do DM2 (PETERSEN, K. F.; SHULMAN, G. I., 2002). Sob condições fisiológicas, a insulina estimula a síntese de glicogênio muscular pelo aumento da captação de glicose do plasma. Existem três fatores limitantes primários implicados na captação de glicose e síntese de glicogênio: glicogênio sintase, hexoquinase e o transportador de glicose 4 (GLUT4) (PETERSEN, KITT FALK;

SHULMAN, GERALD I., 2002). Após a ligação da insulina ao receptor de insulina (RI) nas células musculares, o GLUT4 é translocado dos compartimentos intracelulares (endossomos precoces, compartimento de reciclagem endossomal e rede trans-Golgi) para a membrana plasmática. Este processo permite a captação de glicose e reduz as concentrações circulantes de glicose (SATOH, 2014).

Mutações que reduzem a expressão do receptor de insulina (RI) ou GLUT4, bem como qualquer defeito na via de sinalização a montante ou a jusante reduziria a captação de glicose no músculo resultando em um estado hiperglicêmico (CZECH, 2017; DEFRONZO, 1988). A ativação da atividade da tirosina quinase do RI é essencial para a ação da insulina no metabolismo da glicose. Ligação da insulina à subunidade α do RI causa fosforilação da subunidade β em múltiplos resíduos de tirosina e permite sinalização. Assim, mutações em qualquer um dos principais sítios de fosforilação pode prejudicar a atividade de tirosina quinase do RI, prejudicando assim a ação da insulina no músculo esquelético (ABDUL-GHANI; DEFRONZO, 2010).

Como mencionado acima, mutações em proteínas-chave a jusante a via de sinalização, como IRS-1 e IRS-2 ou fosfoinositídeo 3-quinase (*Phospholnositide 3-Kinase* - PI3K) também prejudica a ação da insulina no músculo. Além de mutações ou defeitos de regulação epigenéticos, os fatores ambientais também podem desempenhar um papel importante na captação de glicose pelo músculo. Atividade física aumenta o fluxo sanguíneo nas células do músculo esquelético e, assim, aumenta a utilização da glicose (VENKATASAMY, VIGHNESH VETRIVEL *et al.*, 2013). A obesidade, que está associada à inflamação crônica, contribui para a RI e DM2. Um aumento de evidências sugere que, como consequência da obesidade, o aumento da infiltração de células imunes e secreção de moléculas pró-inflamatórias no tecido adiposo intermiocelular e perimuscular leva a inflamação da musculatura esquelética. Isso acaba levando à inflamação do miócito, metabolismo prejudicado do miócito, e contribui para a RI através de efeitos parácrinos (WU; BALLANTYNE, 2017).

2.2.2.4.2 Tecido Adiposo

O tecido adiposo é um tecido metabolicamente dinâmico capaz de sintetizar uma ampla gama de compostos biologicamente ativos que regulam a homeostase metabólica em nível sistêmico (COELHO *et al.*, 2013). De fato, o tecido adiposo

participa de uma ampla gama de processos biológicos envolvendo, entre outros, coagulação, imunidade, angiogênese, fibrinólise, reprodução, controle do tônus vascular, regulação do apetite, homeostase do peso corporal e metabolismo da glicose e lipídios (ROSEN; SPIEGELMAN, 2006).

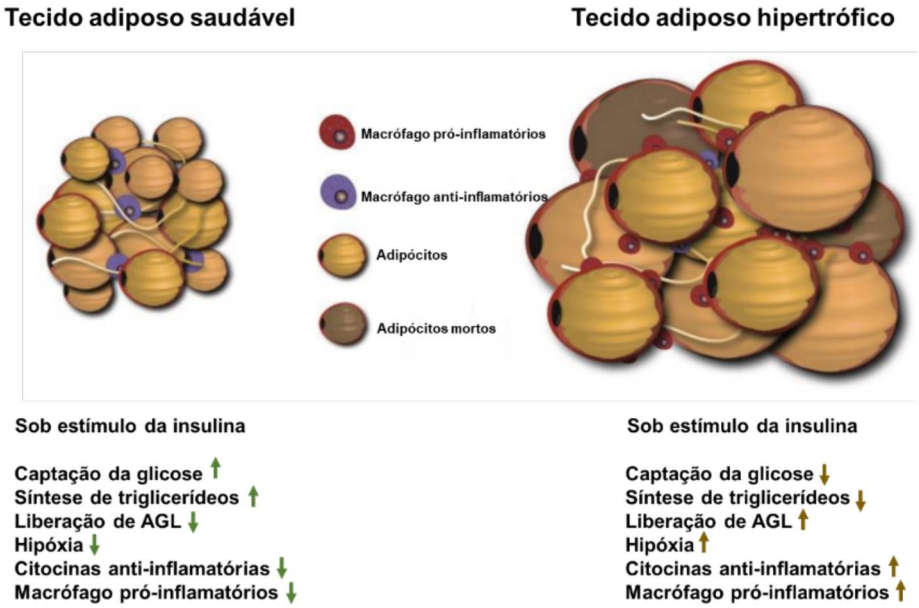
A insulina atua no tecido adiposo de duas maneiras diferentes: (1) estimulando a captação de glicose e a síntese de triglicerídeos; e (2) suprimir a hidrólise de triglicerídeos e induzir a captação de AGL e glicerol da circulação (CZECH, 2020; GASTALDELLI *et al.*, 2017). No estado alimentado, o GLUT4 permite a captação de glicose da corrente sanguínea para os adipócitos, ativando a glicólise na qual o glicerol-3-fosfato (*Glycerol-3-Phospate* - G3P) é produzido e incorporado às vias lipogênicas. O G3P juntamente com os ácidos graxos provenientes das VLDLs, são esterificados, formando triacilglicerol (TAG) que é armazenado em gotículas lipídicas. Durante o estresse metabólico, as gotículas de TAG do adipócito são esgotadas, a fim de fornecer AGL para ser utilizado como fonte de energia em outros tecidos.

Uma resposta prejudicada à estimulação da insulina pelo tecido adiposo é conhecida como RI adiposa. A RI adiposa pode levar à supressão prejudicada da lipólise, captação prejudicada da glicose e liberação aumentada de AGL no plasma, mesmo na presença de altas concentrações de insulina (CZECH, 2020). Entre os elementos de sinalização afetadas pela RI adiposa, foi mostrado que a ativação defeituosa de AKT prejudica a translocação de GLUT4 para a membrana e promove a ativação de enzimas lipolíticas que agravam a hiperglicemia (CZECH, 2017). RI adiposa, como mencionado anteriormente, está associado à intolerância à glicose e liberação elevada de AGL no plasma que se acumula em outros tecidos, como músculo ou fígado. No caso do fígado, o acúmulo de AGL resulta em sinalização prejudicada da insulina que promove a gliconeogênese hepática e prejudica a resposta insulínica estimulada pela glicose, induzindo o desenvolvimento do DM2.

Foi demonstrado que a massa de tecido adiposo anormalmente aumentada e o tamanho dos adipócitos se correlacionam com vascularização patológica, hipóxia, fibrose e inflamação mediada por macrófagos (SCHERER, 2019). Uma dieta rica em gordura e obesidade podem ativar a adenina nucleotídeo translocase 2 (*Adenine Nucleotide Translocase 2* - ANT2) estimulada por AGL, uma proteína mitocondrial interna que resulta em hipóxia nos adipócitos e ativando o fator de transcrição induzível por hipóxia-1α (*Hypoxia-Inducible Factor-1α* - HIF-1α). Isso culmina em disfunção e inflamação do tecido adiposo (RODEN; SHULMAN, 2019). Os adipócitos

hipertrofiados, bem como as células imunes residentes no tecido adiposo, contribuem para o aumento das concentrações circulantes de citocinas pró-inflamatórias. Esse aumento de moléculas pró-inflamatórias circulantes, juntamente com um aumento na liberação local de citocinas, como TNF, IL-1β e IL-6, facilita o surgimento de um estado crônico de inflamação sistêmico de baixo grau, também conhecido como inflamação metabólica (RODEN; SHULMAN, 2019). Este estado inflamatório crônico é considerado uma parte fundamental na patogênese da RI e DM2 (MAKI *et al.*, 2011). Os efeitos da estimulação da insulina no tecido adiposo saudável e hipertrófico são mostrados na FIGURA 6.

FIGURA 6 - EFEITOS DA ESTIMULAÇÃO DA INSULINA NO TECIDO ADIPOSO SAUDÁVEL E HIPERTRÓFICO



No tecido adiposo saudável a insulina tecidual estimula a captação de glicose e a síntese de triglicerídeos, induz a captação de ácidos graxos livres (AGL) e diminui inflamação mediada por macrófagos. No tecido adiposo hipertrófico leva à diminuição da captação de glicose, síntese de triglicerídeos e aumento da liberação de AGL, hipóxia e inflamação mediada por macrófagos.
Fonte: Galicia-Garcia e colaboradores (2020)

2.2.2.4.3 Fígado

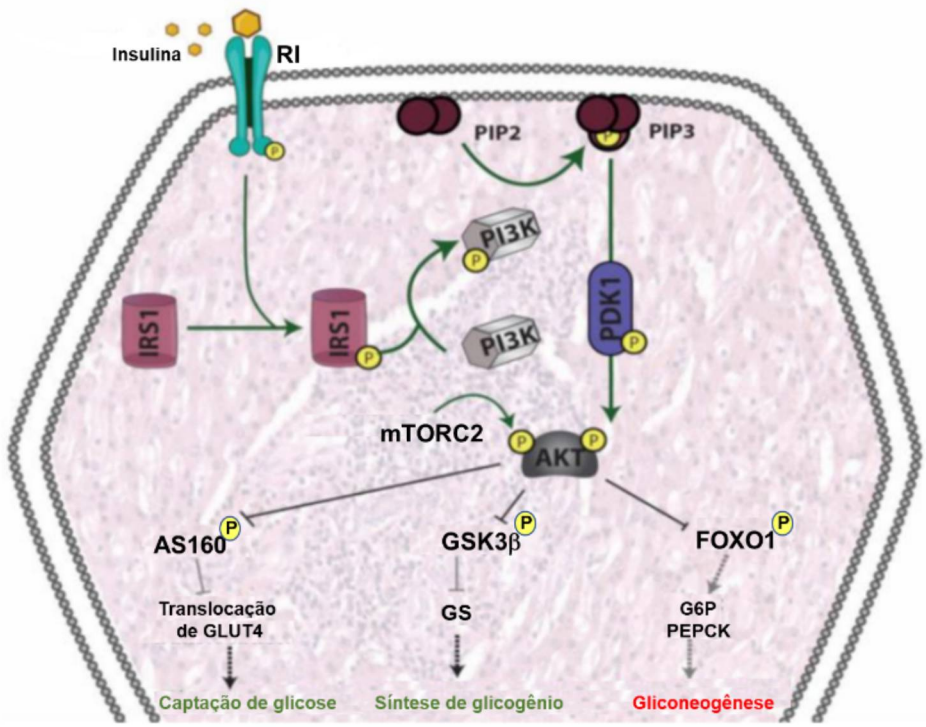
No fígado, a insulina não apenas regula a produção/utilização de glicose, mas também afeta o metabolismo lipídico de forma mais ampla. Quando as concentrações circulantes de glicose aumentam e a insulina é secretada pelas células β pancreáticas, a ligação da insulina ao RI do fígado induz a autofosforilação do receptor. Consequentemente, os substratos do receptor de insulina (IRSs) são recrutados e

fosforilados. Por sua vez, os IRSs ativam PI3K, que fosforila fosfatidilinositol (4,5)-bifosfato (*PhosphatidylInositol (4,5)-bisPhosphate* - PIP2), gerando fosfatidilinositol (3,4,5)-trifosfato (*PhosphatIdylinositol (3,4,5)-triPhosphate* - PIP3). PIP3 então ativa proteína quinase dependente de fosfoinositídeo (*Phosphoinositide-Dependent Kinase-1* - PDK1), que fosforila AKT. Além disso, o AKT é fosforilada pelo alvo da rapamicina em mamíferos (*Mammalian target of rapamycin* - mTORC2). Uma vez que AKT está totalmente ativada, ela participa de várias vias a jusante que regulam vários processos metabólicos, incluindo síntese de glicogênio, gliconeogênese, glicólise e síntese de lipídios (TITCHENELL *et al.*, 2017).

Em estados fisiológicos, a ação combinada do glucagon e da insulina permite a regulação precisa da produção hepática de glicose. Enquanto o glucagon induz a produção hepática de glicose, a insulina atua como um potente inibidor da produção de glicose quando sua concentração no sangue é elevada (CHERRINGTON *et al.*, 2007). O efeito da insulina na produção hepática de glicose é devido a mecanismos diretos e indiretos. No entanto, a importância relativa de cada um desses mecanismos permanece obscura (EDGERTON *et al.*, 2006).

Além de induzir a síntese de glicogênio, a insulina também inibe a produção hepática de glicose pela ativação da proteína contendo a caixa *forkhead*, subfamília O (*Forkhead box transcription factor class O 1* – FOXO1), resultando em uma redução da liberação hepática de glicose. FOXO1 é um fator de transcrição que pertence a uma subclasse da família *forkhead* de fatores de transcrição que possuem um domínio de ligação de DNA tipo caixa *forkhead*. O FOXO1 reconhece um elemento regulador específico denominado elemento de resposta à insulina (*Insulin Response Element* - IRE) nos promotores dos genes da glicose-6-fosfatase (*Glucose-6-Phosphatase* - G6Pase) e da fosfoenolpiruvato carboxiquinase (*PhosphoEnolPyruvate CarboxyKinase* - PEPCK), ambas desempenhando papéis importantes na manutenção das concentrações plasmáticas de glicose em estados de inanição (MONTAL *et al.*, 2015; OH *et al.*, 2013; VAN SCHAFTINGEN; GERIN, 2002). Assim, através da inibição de FOXO1, a insulina promove o armazenamento de glicose como glicogênio e inibe a síntese de glicose e a produção hepática de glicose (LECLERCQ *et al.*, 2007) (FIGURA 7).

FIGURA 7 - VIAS DE SINALIZAÇÃO ENVOLVIDAS NA SINALIZAÇÃO DA INSULINA NOS HEPATÓCITOS



Ligação da insulina ao RI induz o recrutamento e a fosforilação de IRSs. IRSs fosforilados ativam PI3K, gerando PIP3 que ativa PDK resultando em fosforilação de AKT. AKT é totalmente ativada por mais fosforilação mediada por mTORC2 e participa de várias vias a jusante que regulam múltiplas processos incluindo síntese de glicogênio, gliconeogênese, glicólise e síntese de lipídios. RI: receptor de insulina; PIP2: fosfatidilinositol 4,5-bifosfato; PIP3: fosfatidilinositol 3,4,5 trifosfato; IRS1: substratos do receptor de insulina 1; PI3K: fosfoinositídeo 3-quinase; mTORC2: alvo da rapamicina em mamíferos 2; PDK1: proteína quinase dependente de fosfoinositídeo 1; AKT: proteína quinase B; AS160: Substrato da AKT de 160 kDa; GLUT4: transportador de glicose 4; GSK3β: glicogênio sintase quinase 3 beta; GS: glicogênio sintase; FOXO1: proteína contendo a caixa *forkhead*, subfamília O; G6P: glicose 6 fosfato; PEPCK: fosfoenolpiruvato carboxiquinase 1.
Fonte: Galicia-Garcia e colaboradores (2020)

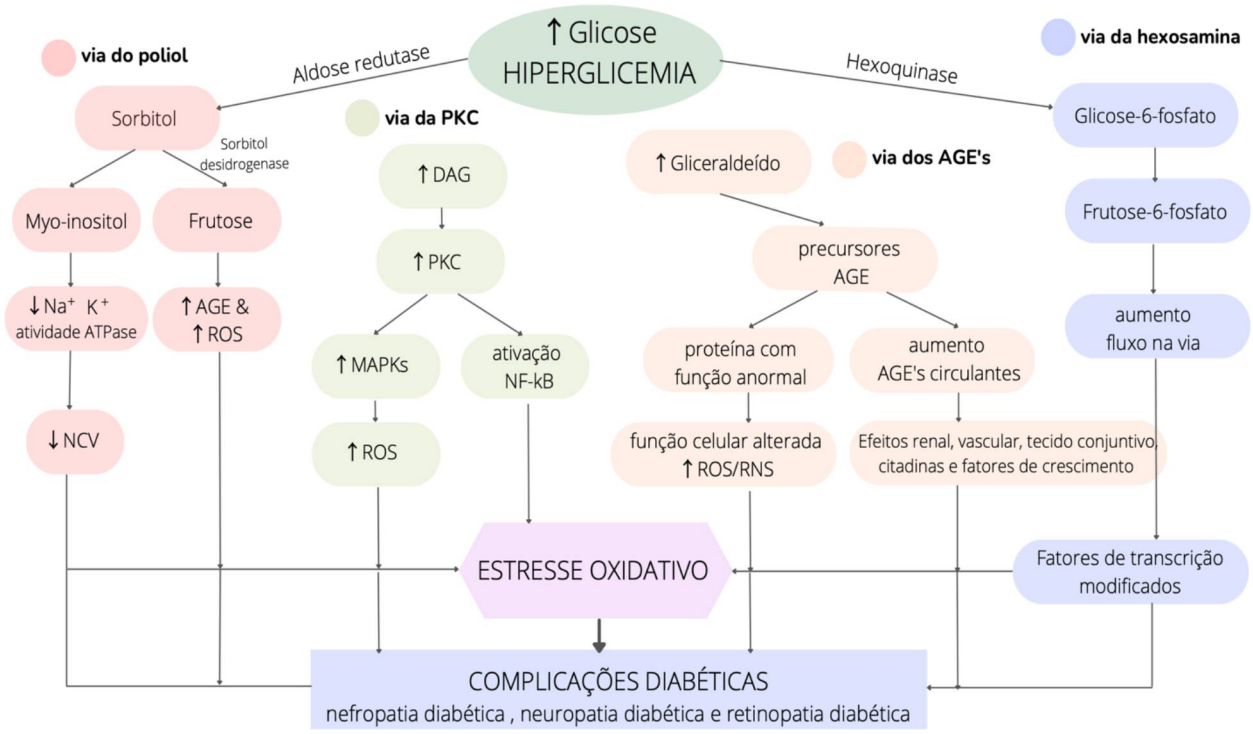
Semelhante ao caso em tecidos sensíveis à insulina, em estados de RI, as concentrações fisiológicas de insulina são insuficientes para induzir a resposta apropriada de insulina nas células hepáticas (MESHKANI; ADELI, 2009). No fígado, a RI prejudica a síntese de glicogênio, não suprime a produção de glicose, aumenta a lipogênese e aumenta a síntese de proteínas como a PCR pró-inflamatória. De fato, a produção anormal de proteínas pró-inflamatórias, como adipocitocinas e citocinas, combinadas com condições como estresse oxidativo, pode levar a um estado inflamatório responsável pela resposta insulínica alterada pelo fígado (LECLERCQ *et al.*, 2007).

2.2.3 Complicações associadas ao DM2

A maior parte da morbidade e mortalidade associada com diabetes resulta das complicações vasculares crônicas. Estes são amplamente divididas em complicações micro e macrovasculares (FORBES; COOPER, 2013). As complicações microvasculares incluem nefropatia, retinopatia e neuropatia periférica diabética. Desenvolvimento de doenças microvasculares, particularmente nefropatia diabética é um potente fator de risco para doenças macrovasculares, nomeadamente aterosclerose, enfarte do miocárdio, insuficiência cardíaca e eventos cerebrovasculares. Em geral, as taxas de complicações diabéticas em países desenvolvidos se estabilizaram como resultado do melhor gerenciamento dos fatores de risco, como hiperglicemia, hipertensão e dislipidemia (GEISS *et al.*, 2014). No entanto, isso tem sido compensado pelo crescente número absoluto de novos casos de diabetes, principalmente em países em desenvolvimento. Assim, o real número de indivíduos afetados por complicações do diabetes é ainda maior (FORBES; FOTHERINGHAM, 2017).

Está bem estabelecido que a hiperglicemia é o principal fator de complicações diabéticas (FIGURA 8). O aumento da concentração de glicose plasmática intracelularmente induz várias vias metabólicas em um ciclo vicioso resultando em dano crônico ao tecido. Dentro da célula, a superprodução mitocondrial de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (ERON) como o radical ânion superóxido, peroxinitrito e peróxido de hidrogênio é o evento-chave secundário à sobrecarga de glicose (DE *et al.*, 2013). ERON, por sua vez, induzem danos ao DNA e, consequentemente, superestimula a poli (ADP-ribose) polimerase (*poly-ADP ribose polymerase* - PARP), uma enzima de reparo que induz o consumo de NAD e diminuição do gliceraldeído 3-fosfatodesidrogenase (GAPDH). Isto resulta na desregulação e iniciação de sinais pró-apoptóticos, como formação de produtos finais de glicação (*advanced glycation end products* - AGEs). Durante a hiperglicemia de longa data em diabéticos, a glicose forma ligações covalentes com proteínas por meio de uma reação não enzimática entre o grupo amino livre de um aminoácido e o grupo carbonila dos açúcares redutores. A produção de AGEs leva à alteração estrutural e funcional de proteínas, tanto na matriz extracelular e no espaço intracelular. AGEs também podem interagir com receptores específicos (RAGEs), que criam uma cascata pró-inflamatória complexa (envolvendo IL-1, IL-6, TNF-α, TGF-β e VCAM-1) e aumentando o estresse oxidativo (DE *et al.*, 2013).

FIGURA 8 - MECANISMOS MOLECULARES POSSÍVEIS NAS COMPLICAÇÕES DIABÉTICAS



Hiperglicemia em combinação com o estresse oxidativo desencadeia as vias prejudiciais de polióis, PKC, AGE e hexosamina estendendo-se a consequências como, desequilíbrio redox, alterações na expressão gênica, fatores de transcrição modificados que aumentam ainda mais o estresse oxidativo levando a várias doenças complicações diabéticas. G6P: Glicose-6-fosfato, DAG: diacilglicerol, PKC: proteína quinase C, ERO: espécies reativas de oxigênio, ERN: espécies reativas de nitrogênio, AGE: produtos finais de glicação avançada, VCN: velocidade de condução nervosa de NCV, NF-κB: fator nuclear κappa beta, MAPK: proteína quinase ativada por mitógeno.
Fonte: (SINGH *et al.*, 2013)

As vias da proteína quinase C (*protein kinase C* - PKC) e da hexosamina são, portanto, aumentadas pelo meio celular prejudicado, respectivamente, resultando na produção adicional de ERON por meio do complexo NADPH oxidase, e na transcrição de fatores de comprometimento vascular, como Inibidor do ativador de plasminogênio tipo 1 (*plasminogen activator inhibitor-1* - PAI-1, fator de crescimento transformante alfa (*transforming growth factor alpha* - TGF-α) e TGF-β (SANDIREDDY *et al.*, 2014).

Além disso, a glicose em excesso é convertida em polióis, principalmente sorbitol, cujo fluxo aumentado consome NADPH, envolvido na regeneração antioxidante (CHUNG *et al.*, 2003). O acúmulo de polióis também inibe a Na^+/K^+ ATPase, interagindo assim com a via de PKC(CAMERON *et al.*, 1999).

Fatores hemodinâmicos também estão alterados no diabetes, estimulando a síntese de vários fatores de crescimento. Estímulo do sistema renina-angiotensina (SRA) também aumenta alguns fatores de crescimento, enquanto que a redução do

SRA pode reduzir fatores de crescimento e melhorar efeitos pró-fibrogênicos (VAN NIEUWENHOVEN *et al.*, 2005). Em experimentos com animais foi demonstrado explicitamente um papel para a hiperglicemia na estimulação da expressão anormal de fatores de crescimento, como o fator de crescimento de fibroblastos (FGF), fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), fator de crescimento transformador β (TGFβ), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e assim por diante (SHI *et al.*, 2018).

Fatores angiogênicos em particular parecem desempenhar um papel central no desenvolvimento de complicações microvasculares, bem como na resposta à doença macrovascular (DUH; AIELLO, 1999). A angiogênese anormal desempenha um papel importante na patogênese dessas condições. No diabetes, as respostas da angiogênese são intensificadas em alguns tecidos, como retina ou rim, enquanto são prejudicadas em outros tecidos, resultando em anormalidades em cicatrização de feridas, circulação periférica e circulação coronariana (MARTIN *et al.*, 2003). Em alguns tecidos microvasculares, o resultado é neovascularização patológica e aumento da permeabilidade vascular. Essas respostas são responsáveis por grande parte da perda visual associada à retinopatia diabética e podem, além disso, ter um papel significativo na nefropatia e neuropatia (DUH; AIELLO, 1999).

2.2.3.1 Complicações Microvasculares

A retinopatia diabética (RD) é uma das principais complicações microvasculares relacionadas ao diabetes e a principal causa de cegueira em pessoas com idade entre 20 e 74 anos, ocorre em mais de 60% dos pacientes com DM2. A RD é caracterizada por permeabilidade vascular, aumento da isquemia tecidual e angiogênese (ZENG *et al.*, 2015). O tempo de duração do diabetes e o controle glicêmico são os dois fatores mais importantes relacionados ao desenvolvimento e gravidade da RD, porem o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), um potente fator angiogênico e de permeabilidade vascular desempenha um papel significativo induzindo um aumento da permeabilidade dos vasos retinais, quebra da barreira hemato-retiniana podendo estar fortemente implicado na progressão da RD (DIABETES *et al.*, 1993; HAN, LIYUAN *et al.*, 2014). É aceito que fatores genéticos e ambientais influenciam na gravidade e na progressão da RD e como um importante mediador da angiogênese, o VEGF foi investigado como um gene candidato em um

grande número de condições, incluindo doenças cardiovasculares, inflamatórias, diabetes, nefropatia diabética e câncer (FERRARA *et al.*, 2003). Vários estudos mostram que o VEGF está envolvido na RD e na sua progressão levando ao estágio proliferativo da doença (DUH; AIELLO, 1999). Em condições fisiológicas, o VEGF é expresso em níveis baixos, ao passo que é fortemente regulado no humor vítreo e aquoso dos olhos de pacientes com RD. A hipóxia é o principal estímulo para a produção de VEGF em áreas da retina com perfusão reduzida e os mecanismos envolvem aumento da transcrição de VEGF, estabilidade do mRNA e tradução do mRNA. O aumento dos níveis de VEGF no sangue e na retina estão associados a patogênese da retinopatia diabética (SAJOVIC *et al.*, 2019).

A nefropatia diabética é uma complicação causada pelo diabetes na microvasculatura renal. Indivíduos com diabetes apresentam maior taxa de filtração glomerular ou hiperfiltração, mediada por maior relaxamento das arteríolas aferentes em relação às eferentes. Por sua vez, isso leva a um aumento do fluxo sanguíneo através do capilar glomerular, aumentando a pressão. Quando essas condições são mantidas ao longo do tempo, elas produzem hipertrofia glomerular e um aumento na área de superfície do capilar glomerular. Isso acarreta alterações hemodinâmicas que contribuem para o desenvolvimento e/ou progressão da doença (LEVEY *et al.*, 2007; MEZA LETELIER *et al.*, 2017).

A neuropatia diabética é uma complicação tardia do diabetes e muito frequente, podendo ser evidenciada no DM2 muitas vezes no momento do diagnóstico. Tem como definição a presença de sinais e sintomas de disfunção dos nervos periféricos em diabéticos. Ela abrange um grupo de alterações relacionadas ao envolvimento estrutural e funcional de fibras motoras, sensitivas e autônomas que podem ser reversíveis ou permanentes. A patogênese não é totalmente compreendida, mas um dos mecanismos estudados relaciona-se com a insuficiência microvascular com redução no fluxo sanguíneo neural. Resultante da isquemia absoluta ou relativa dos vasos endoneurais e epineurais, levando ao espessamento da membrana basal, à diminuição do fluxo sanguíneo e a alterações de permeabilidade vascular. Este processo reduz a disponibilidade de óxido nítrico e excesso de formação de espécies reativas de oxigênio, que favorecem a produção de peroxinitrito, um agente oxidante inflamatório e tóxico as células endoteliais. Como consequência desta série de fatores ocorre a perfusão microvascular, fluxo insuficiente e lesão neural (FIGUEROA-ROMERO *et al.*, 2008; SHAKHER; STEVENS, 2011).

2.2.3.2 Complicações Macrovasculares

As complicações macrovasculares do DM2, também chamadas de doenças cardiovasculares, atingem o coração, como o Infarto agudo do miocárdio (IAM), o cérebro no acidente vascular cerebral (AVC) e os membros inferiores na doença vascular periférica. A doença cardiovascular continua a ser uma grande preocupação em pacientes com diabetes. O risco de doença cardiovascular em tais pacientes é duas a cinco vezes maior do que os pacientes de controle. As doenças isquêmicas cardiovasculares são mais frequentes e mais precoces em indivíduos com diabetes, comparativamente aos demais. Em mulheres com diabetes, o efeito protetor do gênero feminino desaparece (DONNELLY *et al.*, 2000).

A maior causa de óbito é o infarto agudo do miocárdio (IAM) e vários mecanismos participam do aumento do risco de doença macrovasculares no diabético, sendo além da hiperglicemia, também a pressão arterial, dislipidemia e fumo (ZHANG *et al.*, 2012).

O infarto agudo do miocárdio (IAM) está presente em 40% dos pacientes com diabetes. O paciente com diabetes e infarto do miocárdio tem um aumento de duas vezes na mortalidade no primeiro mês pós-IAM em comparação com pacientes não diabéticos. Embora não esteja diretamente implicado no desenvolvimento da doença aterosclerótica relacionada ao diabetes, VEGF pode ter um papel salutar nos tecidos miocárdicos hipóxicos da doença arterial coronariana, promovendo o desenvolvimento da circulação colateral. Os efeitos benéficos dos vasos sanguíneos coronários colaterais durante o infarto do miocárdio foram documentados e é possível que o VEGF possa ser produzido em resposta à hipoxemia tecidual secundária à oclusão gradual dos vasos coronários. O miocárdio humano normal expressa mRNA de VEGF e a expressão de mRNA do miocárdio é regulada positivamente pela hipóxia em alguns sistemas de células cardíacas cultivadas. As concentrações plasmáticas de VEGF também estão elevadas em pacientes após infarto agudo do miocárdio. No entanto, existe grande variabilidade interindividual na extensão da formação colateral em pacientes com doença arterial coronariana, possivelmente relacionada à redução da indução de VEGF por hipóxia (KARIŽ; PETROVIČ, 2014).

2.3 SINALIZAÇÃO DE VEGF E DIABETES

2.3.1 Fator de Crescimento Endotelial Vascular (VEGF)

A angiogênese é a formação de novos vasos sanguíneos pelo surgimento de células endoteliais a partir da vasculatura pré-existente (CARMELIET, 2005). Enquanto a vasculogênese (formação de vasos sanguíneos derivados de angioblastos) ocorre principalmente durante o desenvolvimento embrionário, a angiogênese ocorre durante toda a fase de vida adulta (TAKAHASHI *et al.*, 1999; TEPPER *et al.*, 2005), desempenhando um papel vital em eventos fisiológicos como o reparo de lesões (JOHNSON; WILGUS, 2014), o ciclo estral e placentário (LAI *et al.*, 2015). Além de sua importância na fisiologia normal, a angiogênese também é uma característica associada não apenas ao câncer (HANAHAN; WEINBERG, 2011), mas também a várias condições patológicas, incluindo degeneração macular relacionada à idade (MILLER *et al.*, 2013), artrite reumatoide (AZIZI *et al.*, 2014), psoríase (FOLKMAN, 1972), neovascularização induzida por diabetes (VED *et al.*, 2017), doenças inflamatórias (ALKIM *et al.*, 2015), lesão isquêmica/reperfusão (PALLET *et al.*, 2014), hemangioma infantil e aterosclerose (MATSUMOTO; EMA, 2014; SHIBUYA, 2013a).

Apesar de suas etiologias distintas, esses distúrbios podem ser caracterizados como doenças angiogênese dependentes (FOLKMAN, 2007) e podem ser causadas ou exacerbadas por um desequilíbrio entre a produção/atividade de fatores anti e pró-angiogênicos (WOOLARD *et al.*, 2009). Entre as moléculas endógenas pró-angiogênicas, o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) é o principal regulador da formação de vasos sanguíneos na saúde e na doença (CARMELIET, 2005).

A família de proteínas VEGF compreende VEGF-A, VEGF-B (FEARNLEY *et al.*, 2014), VEGF-C, VEGF-D, Fator de Crescimento Placentário (*Placental Growth Factor* - PlGF) (FERRARA, 2004), o VEGF-E codificado por vírus e o VEGF-F derivado de veneno de cobra (IYER; ACHARYA, 2011; OGAWA *et al.*, 1998; YAMAZAKI *et al.*, 2009). As proteínas VEGF fazem parte de uma superfamília de proteínas caracterizada pela presença de ligações dissulfeto muito conservadas que formam o chamado "nó de cistina" (*cystine knot*). As proteínas são ativas na forma homodímero conectados por pontes dissulfeto com massa molecular entre 30-46 kDa (FERRARA

et al., 1992). Possuem oito resíduos de cisteína em cada monômero, seis responsáveis por três ligações dissulfeto intramoleculares (Cys26 –Cys68, Cys57 – Cys102, Cys61 – Cys104) e dois responsáveis por duas ligações dissulfeto entre os dois monômeros (Cys51 – Cys60* e Cys51* - Cys60; nesta notação, o asterisco (*) indica que o resíduo pertence ao outro monômero) (MULLER *et al.*, 1997).

As proteínas VEGF se ligam em um padrão de sobreposição a três receptores tirosina quinases (*Receptor Tyrosine Kinase* - RTK), conhecidos como receptor VEGF-1, -2 e -3 (VEGFR1-3), bem como a co-receptores (aqui definidos como moléculas de ligação a VEGF que não possuem função catalítica induzida por VEGF estabelecida), como os proteoglicanos de heparan sulfato (*Heparan Sulphate ProteoGlycans* - HSPGs) e neuropilinas. As respostas celulares ao VEGF são principalmente impulsionadas pela sua ligação aos seus receptores cognatos - os receptores do fator de crescimento endotelial vascular (VEGFRs). Os VEGFRs pertencem à família de receptores tirosina quinase de classe IV (ALEXANDER *et al.*, 2015) e mostram semelhanças com os receptores RTKs do tipo III, como o receptor do fator de crescimento derivado de plaquetas (*Platelet Derived Growth Factor Receptor* - PDGFR), receptor do fator estimulador de colônia de macrófagos (*Macrophage Colony Stimulating Factor Receptor* - M-CSFR), receptor c-KIT e receptor tirosina quinase 3 do tipo FMS (*Feline McDonough Sarcoma*) (*Fms-Like Tyrosine kinase-3* - FLT3) (SHIBUYA, 2013b). VEGFRs são expressos por células endoteliais, macrófagos, células hematopoiéticas, células musculares lisas e mastócitos (DETORAKI *et al.*, 2009; ISHIDA *et al.*, 2001; KABRUN *et al.*, 1997; WITMER *et al.*, 2002).

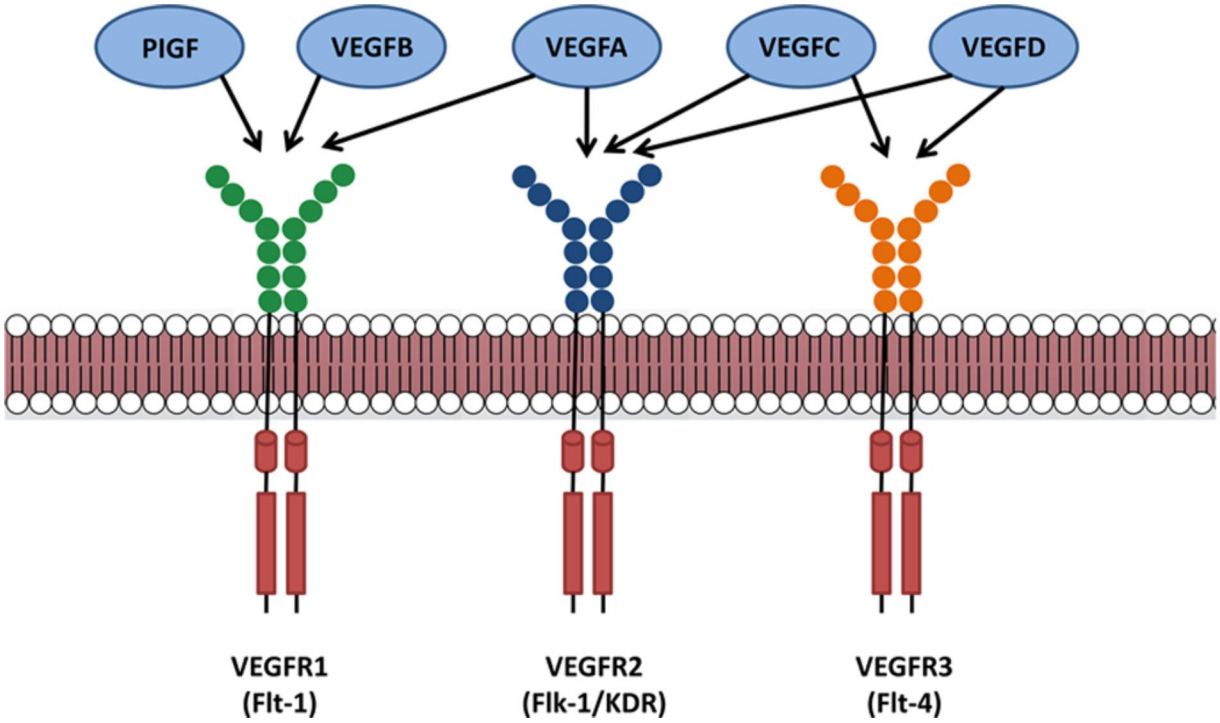
Existem três subtipos de VEGFR que são codificados por genes separados: VEGFR1, também chamado de tirosina quinase 1 do tipo fms (*Fms Like Tyrosin kinase 1* – Flt-1), é encontrado em células endoteliais, osteoclastos, células da musculatura lisa, monócitos e macrófagos (CASELLA *et al.*, 2003; SAWANO *et al.*, 2001). VEGFR2, também chamado domínio de inserção de quinase (*Kinase Insert Domain* - KDR) ou quinase de fígado fetal (*Fetal Liver Kinase 1* – Flk-1), é expresso em células endoteliais, células neuronais e células progenitoras das células hematopoiéticas (ASAHARA *et al.*, 1999); e VEGFR3 (também chamado de Flt-4) é expresso em células endoteliais vasculares embrionárias, capilares fenestrados, células endoteliais tumorais, células endoteliais linfáticas, monócitos e macrófagos (HAMRAH *et al.*, 2003; PARTANEN *et al.*, 2000).

VEGFR1 e VEGFR2 são estruturalmente semelhantes, enquanto VEGFR3 tem um domínio extracelular processado proteoliticamente (KOCH *et al.*, 2011; SMITH *et al.*, 2015). Os VEGFs atuam através de ligação a receptores tirosina quinase específicos: VEGFR1, VEGFR2 e VEGFR3. O VEGF-A liga-se a ambos VEGFR1 e VEGFR2, VEGF-B e PlGF se ligam a VEGFR1, e VEGF-C e -D se ligam a VEGFR3 (implicado na linfangiogênese), mas podem se ligar a VEGFR2 após sofrerem clivagem proteolítica (PAJUSOLA *et al.*, 1992). Enquanto o VEGFR1 também desempenha um papel na diferenciação de células imunes (LI *et al.*, 2016; SAWANO *et al.*, 2001) (FIGURA 9).

O VEGF-A é o membro da família mais bem caracterizado, sendo o mais potente estimulador de processos de angiogênese e, portanto, um alvo de inúmeras terapêuticas anticancerígenas (FERRARA; ADAMIS, 2016). O VEGF-A é secretado por muitos tipos de células, como células endoteliais células (NAMIKI *et al.*, 1995; UCHIDA *et al.*, 1994), fibroblastos (NISSEN *et al.*, 1998), células musculares lisas (BROGI *et al.*, 1994), plaquetas (BANKS *et al.*, 1998), neutrófilos (GAUDRY *et al.*, 1997), macrófagos e aproximadamente 60% de todos os tumores (BERSE *et al.*, 1992).

A secreção de VEGF-A também é induzida por isquemia e estímulos inflamatórios (FRANCO *et al.*, 2011). A hipóxia tem sido associada com a angiogênese, e existem grandes evidências que baixas concentrações de oxigênio regulam a expressão do VEGF sendo um dos seus principais estimuladores, podendo ser o principal indutor da transcrição do gene VEGF por meio do fator induzido por hipóxia-1 (HIF-1) que é sintetizado nas células com baixa tensão de oxigênio. A transcrição do mRNA do VEGF pode ser induzida também por citocinas que regulam a expressão do VEGF tais como o fator de necrose tumoral (TNFα), o fator de crescimento tumoral α e β (TGF-α e β), fator de crescimento epidermal, interleucinas e fator de crescimento fibroblástico básico (bFGF). A indução do VEGF pela hipóxia, ocorre pela ativação da transcrição como também pela estabilização do mRNA do VEGF (FÁTIMA; PAPA, 2018).

FIGURA 9 - LIGANTES E RECEPTORES DE VEGF



VEGFs e PIGF (fator de crescimento da placenta) podem interagir com uma combinação de vários VEGFRs (receptores de VEGF), que fazem parte de uma superfamília de receptores de tirosina quinase. VEGFR1 pode interagir com PIGF, VEGFA e VEGFB. VEGFR2 interage com VEGFA, VEGFC e VEGFD, enquanto VEGFR3 pode ligar-se ao VEGFC e VEGFD. Flk-1: quinase 1 do fígado fetal; Flt-1: tirosina quinase 1 semelhante a fms; e KDR: domínio de inserção de quinase.
Fonte: Adaptado de Pandey e colaboradores (2018).

Hipóxia, estresse oxidativo e citocinas podem aumentar a expressão do VEGF e outros fatores de transcrição contribuem para a indução e sua regulação (NIU *et al.*, 2002) (DVORAK *et al.*, 1995; SHI *et al.*, 2001).

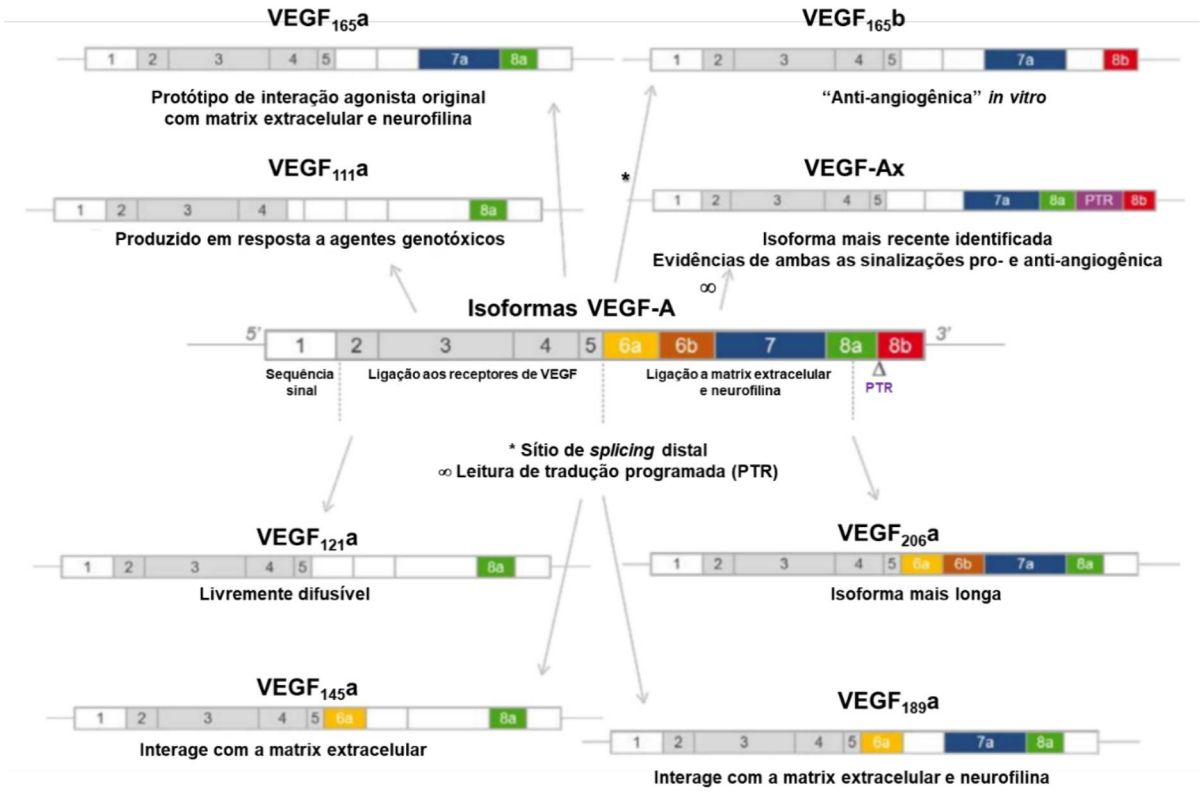
O VEGF-A é uma glicoproteína homodimérica de aproximadamente 45 kDa (FERRARA; DAVIS-SMYTH, 1997). O VEGF-A existe na forma de várias isoformas distintas devido ao mecanismo de *splicing* alternativo do pré-mRNA, onde ocorre remoção seletiva de regiões de íntrons e união de combinações específicas de éxons (TISCHER *et al.*, 1991). O *splicing* alternativo é vantajoso na expansão do repertório de possíveis isoformas de VEGF-A que podem ser produzidas a partir de um único gene (FIEDLER, 2015). Essas isoformas diferem em relação ao seu comprimento e são designados VEGFxxx, onde xxx representa o número de aminoácidos presentes na sequência final da proteína. Até o momento, 16 isoformas distintas de VEGFA foram identificados mais comumente a partir de seis transcritos: VEGF111, VEGF121, VEGF145, VEGF165, VEGF189, e VEGF206 (ESWARAPPA *et al.*, 2014; GU *et al.*, 2013; WOOLARD *et al.*, 2009). Uma isoforma adicional, VEGF-Ax, também foi

identificada em 2014 que surge da tradução por leitura programada (*Programmed Translational Read-through* - PTR) (ESWARAPPA *et al.*, 2014).

VEGF165a foi a primeira isoforma caracterizada e continua sendo o mais extensamente investigado em relação à sua função, sinalização, expressão e papéis patológicos (FERRARA; HENZEL, 1989). VEGF165 é a mais abundante e corresponde a um polipeptídio de 23 kDa (PRITCHARD-JONES *et al.*, 2007b). Como um potente estimulador da angiogênese, o VEGF165a é considerado o protótipo da isoforma pró-angiogênica de VEGF-A. A expressão alterada da isoforma de VEGF-A foi bem documentada em tecidos durante condições fisiológicas e/ou patológicas (BARRATT *et al.*, 2017; BATES *et al.*, 2013; DEHGHANIAN; HOJATI, 2014; PRITCHARD-JONES *et al.*, 2007a; YE *et al.*, 2016). Foi proposto que estas diferentes isoformas possam promover sinalizações distintas (WOOLARD *et al.*, 2009) (FIGURA 10).

Como cada isoforma de VEGF-A contém resíduos codificados pelos éxons 2-5 (FIGURA 10), resíduos que interagem com VEGFR1 e VEGFR2 não são removidos por *splicing* alternativo. Cada isoforma também contém os resíduos de cisteína que formam ligações dissulfeto intermoleculares, de modo que todas as isoformas são diméricas, bem como formam ligações dissulfeto intramoleculares montando a estrutura dobrada *Cys-loop*. Em contraste, os resíduos identificados por estudos estruturais que interagem com o co-receptor Neuropilina-1 (*Neuropilin-1* - NRP1) ou componentes da matriz extracelular estão ausentes em algumas isoformas de VEGF-A (PEACH *et al.*, 2018).

FIGURA 10 - ILUSTRAÇÃO ESQUEMÁTICA DAS ESTRUTURAS DAS ISOFORMAS DE VEGF-A



O gene *VEGFA* consiste em oito éxons, que podem ser *splicing* alternativo para gerar uma variedade de isoformas de VEGF-A. Essas isoformas diferem em comprimento e foram designadas VEGFxxx, onde xxx representa o número de aminoácidos presentes. Cada éxon contém resíduos identificados que conferem as propriedades distintas nas isoformas resultantes, incluindo sítio de ligação para o VEGFR2, extracelular matriz e neurofilina. O principal local de *splicing* alternativo ocorre no éxon 8, em que o *splicing* proximal resulta nas formas prototípicas de VEGFxxxa e o *splicing* distal nas isoformas de VEGFxxxb "anti angiogênicas" contendo o éxon 8b. Além disso, a leitura de tradução programada (*Programmed Translational Read-through* - PTR) usando um códon de parada não canônico resulta na isoforma VEGF-Ax que contém extensão de 22 aminoácidos em seu domínio C terminal.
Fonte: Peach e colaboradores (2018)

2.3.2 Ligação de VEGF-A a ligantes e receptores

Os efeitos fisiológicos de VEGF-A são impulsionados pela ligação de VEGF-A a dois receptores homólogos. Esses receptores são conhecidos como VEGFR1 e VEGFR2 (KOCH *et al.*, 2011; SMITH *et al.*, 2015). Eles são codificados por genes separados e são membros da família da tirosina quinase do receptor de classe IV (ALEXANDER *et al.*, 2015). Embora o VEGFR-1 tenha uma afinidade maior para o VEGF-A do que o VEGFR-2, ele mostra uma diminuição da atividade tirosina quinase e, portanto, é amplamente considerado um receptor chamariz que pode modular negativamente a atividade de VEGFR-2 (MEYER *et al.*, 2006; WALTENBERGER *et al.*, 1994b). VEGFR-1 é um regulador positivo de monócitos e migração de macrófagos, e tem sido descrito como um regulador positivo e negativo da capacidade

de sinalização do VEGFR2 (OLSSON *et al.*, 2006). Receptores de VEGF-A, além daqueles ligados às membranas celulares, também ocorre na forma solúvel (SHIBUYA; CLAESSON-WELSH, 2006). As formas solúveis dos receptores VEGFR-1 (sVEGFR1) e VEGFR2 (sVEGFR2), ligando-se ao VEGF-A antes de atingir os receptores de superfície da membrana das células, são considerados como inibidores fisiológicos dos processos de angiogênese e neoangiogênese (SHIBUYA; CLAESSON-WELSH, 2006). O VEGFR-2 está implicado em todos os aspectos da fisiologia normal e patológica das células vascular-endoteliais (OLSSON *et al.*, 2006).

VEGFR-2 é uma grande proteína de membrana de 151 kDa que consiste em 7 domínios extracelulares semelhantes a imunoglobulina (Ig), uma única hélice transmembrana e um domínio de quinase intracelular dividido (ROSKOSKI, 2008). VEGFR2 se liga a VEGFA com uma afinidade 10 vezes menor do que VEGFR1 (FUH *et al.*, 1998; SHINKAI *et al.*, 1998). Além do VEGF-A, o VEGFR-2 se liga aos VEGFC e VEGFD processados proteoliticamente (MCCOLL *et al.*, 2003). A ligação do ligante envolve os domínios semelhantes a Ig 2 e 3 de VEGFR-2. VEGF-E é o único ligante conhecido que se liga exclusivamente ao VEGFR2. O *splicing* alternativo resulta na geração de sVEGFR-2, que está presente em vários tecidos como a pele, coração, baço, rim e ovário, e no plasma. sVEGFR-2 liga VEGF-C e impede a ligação ao VEGFR3, consequentemente inibindo proliferação de células endoteliais linfáticas (ALBUQUERQUE *et al.*, 2009). Progressão de neuroblastoma é acompanhado por diminuição da expressão de sVEGFR-2 (ALBUQUERQUE *et al.*, 2009; BECKER *et al.*, 2010; PAVLAKOVIC *et al.*, 2010). O sVEGFR2 também pode contribuir para a maturação do vaso regulando migração das células murais (células do músculo liso vascular) e cobertura do vaso (LORQUET *et al.*, 2010).

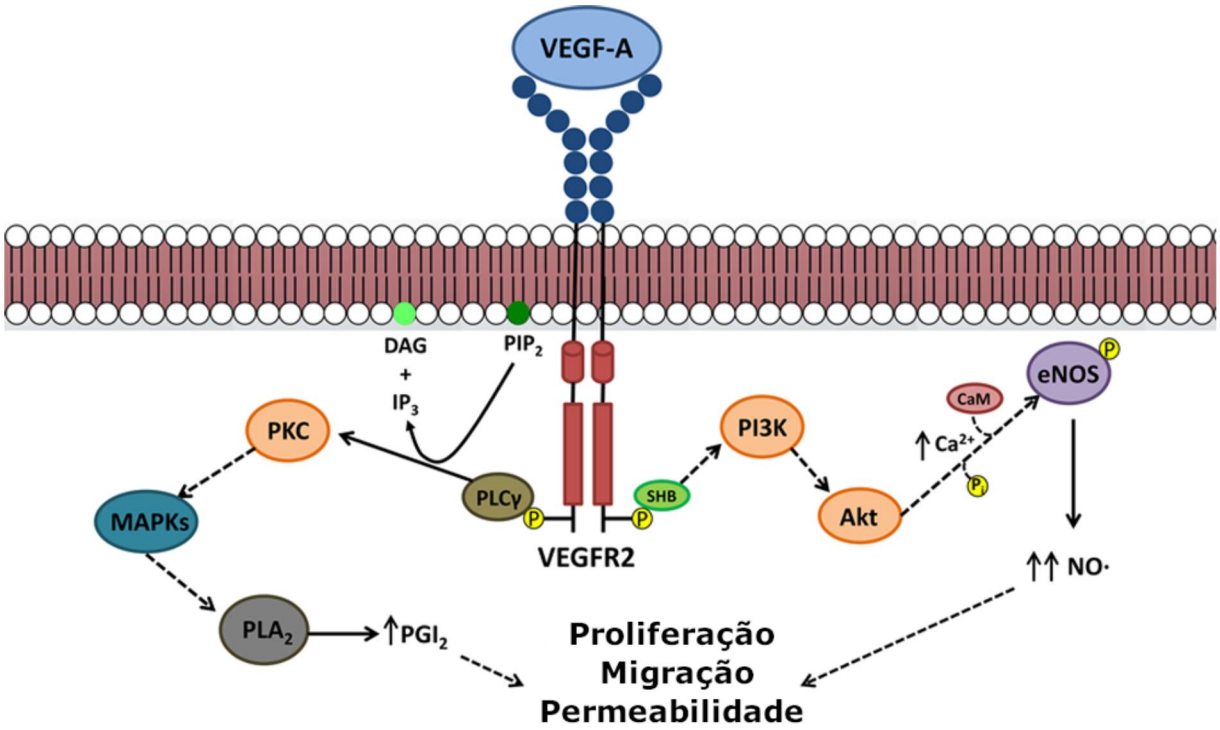
O VEGFR-2 é expresso de forma mais proeminente em células endoteliais vasculares e seus precursores embrionários, com maior nível de expressão durante a vasculogênese e angiogênese embrionária (MILLAUER *et al.*, 1993; OELRICHS *et al.*, 1993; QUINN *et al.*, 1993). O VEGFR-2 também é encontrado em uma variedade de células não endoteliais, como células do ducto pancreático, células progenitoras da retina, megacariócitos e células hematopoiéticas (OELRICHS *et al.*, 1993). A expressão de VEGFR-2 é induzida em conjunto com a angiogênese ativa, como no útero durante o ciclo reprodutivo (TASAKI *et al.*, 2010), e em processos patológicos associados à neovascularização, como no câncer (MILLAUER *et al.*, 1994; PLATE *et al.*, 1993). A expressão de VEGFR-2 em células tumorais foi observada no melanoma

e malignidades hematológicas (YOUSSOUFIAN *et al.*, 2007). A expressão e funcionalidade detalhada de VEGFR-2 em diferentes tipos celulares no adulto continua a ser determinado. Curiosamente, Maharaj e colaboradores (2006) detectaram fosforilação constitutiva de VEGFR-2 *in vivo* em tecidos de camundongos adultos, incluindo fígado, pulmão, tecido adiposo e rim.

A ativação de VEGFR-2 é iniciada pela ligação da molécula ativadora, neste caso o VEGF-A no sítio específico do domínio extracelular do receptor. Esta ligação leva a mudanças conformacionais que induzem e estabilizam a dimerização do receptor, levando ao aumento da atividade da quinase e a autofosforilação de resíduos de tirosina o que leva à ativação das moléculas de transdução de sinal como fosfolipase Cγ(PLCγ), fosfatidilinositol 3'-quinase (PI3K), proteína quinase B (Akt/PKB), Ras, tirosina-quinases coativadoras de receptores esteroidais (Src) e da proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK) (ZWICK *et al.*, 2001). A ativação de fosfolipase Cy (PLCy) leva a liberação de cálcio (Ca^{++}) e ativação da proteína quinase C (PKC). Essa, por sua vez, estimula as vias Raf/MAPK/quinase regulada por sinal extracelular (ERK) que aumentam a proliferação celular. A mobilização de Ca^{++} e a ativação de PKC são a chave da sinalização da permeabilidade vascular induzida pelo VEGF através da ativação da atividade endotelial da síntese do óxido nítrico (FIGURA 11). Em resumo, o VEGF-A estimula o receptor VEGFR-2 nas células endoteliais e ativa numerosos vias de transdução de sinal essenciais para a proliferação de células, sobrevivência, migração, transcrição de genes e permeabilidade endotelial (NEUFELD *et al.*, 1999; SHIBUYA, 2011) (NIEVES *et al.*, 2009).

O VEGFR-2 está sujeito a regulação complexa por vários mecanismos subjacentes à sinalização dependo do contexto. Portanto, não é surpreendente que isoformas endógenas de comprimentos ou sequências variadas tenham resultados de sinalização distintos com implicações para a expressão alterada na saúde e na doença (WOOLARD *et al.*, 2009). A regulação espacial e temporal do VEGFR-2 em termos de tráfego e a biodisponibilidade da isoforma do VEGF-A por meio de interações com a matriz extracelular podem influenciar a sinalização específica da isoforma. As células endoteliais também expressam parceiros de interação NRP1 (IMOUKHUEDE; POPEL, 2011) e integrinas (BAUER *et al.*, 1992), bem como outras proteínas moduladoras de membrana e citoplasmática que podem alterar a expressão ou localização do receptor, influenciando em última análise a sinalização a jusante e os resultados fenotípicos que distinguem entre as isoformas de VEGF-A.

FIGURA 11 - VIAS DE SINALIZAÇÃO INTRACELULAR DO COMPLEXO VEGF-A-VEGFR-2



Vias de sinalização intracelular para VEGF-A (fator de crescimento endotelial vascular A)/VEGFR-2 (receptor 2 de VEGF). Na presença do ligante, o VEGFR-2 dimeriza e ativa o receptor tirosina quinase, que resulta na autofosforilação dos domínios intracelulares. Isso pode levar à ativação de uma variedade de vias de sinalização. Os níveis de cálcio intracelular aumentam por meio da ativação da sinalização PI3K (fosfotidilinositol-3 quinase)/Akt, que ativa a sintese do óxido nítrico endotelial (eNOS) por meio da ligação da calmodulina (CaM), bem como da fosforilação direta, resultando no aumento da produção de NO. A sinalização de VEGFR-2 também ativa PLCγ (fosfolipase C gama), que converte fosfotidilinositol 4,5-bifosfato (PIP2) em diacilglicerol (DAG) e inositol 1,4,5-trisfosfato (IP3). O IP3 também pode mediar aumentos no cálcio intracelular, enquanto o DAG pode ativar a PKC (proteína quinase C). Um alvo a jusante da sinalização de PKC, por meio de MAPKs (proteínas quinases ativadas por mitogênio), é a fosfolipase A2, que leva a níveis elevados de prostaciclina (PGI2). Tanto o PGI2 quanto o NO medeiam muitas das consequências biológicas da sinalização de VEGF-A, incluindo aumento da permeabilidade vascular, vasorrelaxamento e sobrevivência endotelial.
Fonte: Adaptado de Pandey e colaboradores (2018).

2.3.3 Papel de VEGF-A nas ilhotas pancreáticas

As ilhotas pancreáticas são tecidos altamente vascularizados e apresentam características especiais. A formação desta estrutura depende da expressão de VEGF-A nas células β. O VEGF-A é considerado um fator importante para função normal das células β. No entanto, a relação causal entre o sistema vascular normal e função e massa das células β não era clara até o estabelecimento de camundongos com deleção específica de VEGF-A nas células β (WATADA, 2010).

A microvasculatura das ilhotas tem uma relação única com as células β, que são polarizadas com um domínio voltado para uma artéria capilar enquanto o outro está voltado para um capilar venoso (BONNER-WEIR, 1988). Além disso, as ilhotas contêm canalículos localizados entre as faces laterais das células β. Esses canalículos contêm muitas microvilosidades com alta produção de GLUT2 (ORCI *et al.*, 1989). A formação deste sistema vascular característico requer a participação de VEGF-A que é um regulador chave da vasculogênese, angiogênese, capacidade de permeabilidade vascular e formação da fenestração endotelial (ESSER *et al.*, 1998; FERRARA *et al.*, 2003; ISSBRÜCKER *et al.*, 2003).

No pâncreas, o VEGF-A é altamente produzido em ilhotas em comparação com células exócrinas (INOUE *et al.*, 2002; KAMBA *et al.*, 2006). A importância do VEGF-A foi demonstrada pelos estudos em animais que mostram vascularização reduzida com fenestração reduzida em ilhotas (BRISSOVA *et al.*, 2006; INOUE *et al.*, 2002; IWASHITA *et al.*, 2007). Além disso, a deleção pancreática específica de VEGF-A e PDX1 também resulta em redução da vascularização e fenestração dos capilares das ilhotas (LAMMERT *et al.*, 2003). Embora outros membros da família de VEGF são expressos em células beta (INOUE *et al.*, 2002), esses resultados indicam claramente que o VEGF-A no pâncreas desempenha um papel não redundante na formação de capilares fenestrados densos nas ilhotas. Um estudo realizado por Kamba e colaboradores (2006) sugere que o VEGF-A desempenha um importante papel na estrutura vascular intra-ilhota ligando-se ao VEGFR-1, embora outros fatores possam parcialmente substituir o efeito do VEGF-A. Também foi mostrado que VEGF-A é indispensável para a liberação normal de insulina a partir de sua entrada na corrente sanguínea, no entanto, a anormalidade da estrutura vascular não resulta em falha substancial da função da célula β por si só (IWASHITA *et al.*, 2007).

Manipulações genéticas que aumentam a sinalização de VEGF-A das ilhotas aumentam a vascularização das ilhotas adultas, massa das células β e/ou secreção de insulina (DAI *et al.*, 2003; GARCIA-OCANA *et al.*, 2000; GARCIA-OCANA *et al.*, 2001; LAMMERT *et al.*, 2001). Quando a sinalização de VEGFA das ilhotas está diminuída, os animais adultos desenvolvem redução da vascularização das ilhotas, massa das células β, secreção de insulina, intolerância à glicose e diabetes (BRISSOVA *et al.*, 2006; DAI *et al.*, 2005; KAMBA *et al.*, 2006; LAMMERT *et al.*, 2003; MELLADO-GIL *et al.*, 2011; REINERT *et al.*, 2013).

2.3.4 Papel de VEGF-A no DM2

O fator de crescimento endotelial vascular (VEGF-A) é um componente crítico nos processos de crescimento tecidual e reparo de órgãos da angiogênese (geração de novos vasos sanguíneos a partir de estruturas vasculares existentes) e vasculogênese (formação de novo de vasos sanguíneos). Embora desempenhe um papel central no desenvolvimento de complicações microvasculares patológicas e da retinopatia diabética em particular, o VEGF-A também é um fator de sobrevivência para as células endoteliais, aumenta a permeabilidade microvascular e é um potente vasodilatador. A função capilar glomerular renal está sob estrito controle do VEGF-A e seu papel como agente neurotrófico e neurogênico foi recentemente demonstrado em trabalhos pré-clínicos. Além das ações fisiológicas, o VEGF-A é vital para promover a formação de vasos colaterais após eventos isquêmicos e desempenha um papel fundamental na cicatrização de feridas sendo reconhecido como o principal regulador da angiogênese fisiológica e patológica (WIROSTKO *et al.*, 2008). A hipóxia induz a expressão de VEGF-A em células endoteliais humanas que, por sua vez, ativa a fosforilação de VEGFR-2 e a proliferação celular. A inibição do eixo de sinalização do fator de crescimento endotelial vascular pode desempenhar um papel na disfunção endotelial e complicações vasculares graves associadas ao diabetes (MORIYA; FERRARA, 2014).

O DM2 é caracterizado por resistência à insulina e disfunção das β (NOLAN *et al.*, 2011). Alterações vasculares nos tecidos periféricos sensíveis à insulina, incluindo diminuição da densidade capilar e recrutamento, relaxamento prejudicado dos vasos sanguíneos e ativação pró-inflamatória do endotélio, têm sido implicados na patogênese da resistência à insulina (TABIT *et al.*, 2010). A resistência à insulina afeta significativamente o fenótipo da célula β e pode em última análise, levar à disfunção e exaustão das células β (NOLAN *et al.*, 2011) como discutido anteriormente.

Além disso, dentro das ilhotas, uma ligação entre a densidade de vasos nas ilhotas e disfunção das células β foi descrita. Hipovascularização das ilhotas foi correlacionada com a perda de células β e diabetes em ratos gordos diabéticos Zucker (LI *et al.*, 2006) e ratos gordos Otsuka Long Evans Tokushima (MIZUNO *et al.*, 1999),

enquanto ratos alimentados com uma dieta rica em gordura ao longo de 4 meses mostrou aumento do teor de VEGF-A nas ilhotas e hipervascularização das ilhotas (AGUDO *et al.*, 2012). Esses achados foram ainda elaborados pela superexpressão de VEGF-A transgênica e mediada por vetores virais em células β, o que resultou acúmulo de células endoteliais nas ilhotas, vazamento vascular, inflamação e uma subsequente redução da massa de células β com início de diabetes (AGUDO *et al.*, 2012).

De acordo com essas descobertas, outros estudos observaram uma redução na massa de células β com a consequente intolerância à glicose após a superexpressão estendida de VEGF-A em células β (BRISSOVA *et al.*, 2014; DE LEU *et al.*, 2014). Esses achados em roedores estão de acordo com observações no pâncreas de indivíduos com DM2 mostrando aumento da densidade capilar intra-ilhota, espessamento e fragmentação capilar e fibrose das ilhotas (BRISSOVA *et al.*, 2015; SHAH *et al.*, 2016). Consequentemente, tanto a hipovascularização como a hipervascularização das ilhotas parecem estar correlacionados com a perda de massa de células β em modelos de roedores de DM2. Além das mudanças na densidade dos vasos das ilhotas, alteração na expressão de genes que regulam o fluxo sanguíneo das ilhotas e inflamação foram descritos em células endoteliais intra-ilhotas em modelos de roedores de DM2 (HOGAN *et al.*, 2017; LACRAZ *et al.*, 2009).

Além disso, a hiperglicemia crônica resulta no acúmulo de AGEs que contribuem para a disfunção das células endoteliais em ambos os camundongos db/db (HOGAN *et al.*, 2017) e em pacientes DM2 (TAN *et al.*, 2002). Mecanicamente, os AGEs estimulam ativação de NF-κB, ativação subsequente da ciclooxigenase (COX)-2 e aumento da síntese de prostaglandina E2 resultando em disfunção das células endoteliais e apoptose (LAN *et al.*, 2015). Resumindo, alterações vasculares contribuem para o aparecimento e progressão do DM1 e DM2, e VEGF-A funciona dentro de uma estreita faixa fisiológica para manter a homeostase e a função das ilhotas (STAELS *et al.*, 2019).

Estudos anteriores sugerem que as concentrações plasmáticas de VEGF-A aumentam significativamente em pacientes diabéticos em comparação com controles saudáveis e que existe uma correlação com a retinopatia diabética e neuropatia. Contudo, estes mecanismos específicos ligando o aumento das concentrações de

VEGF-A e o diabetes e com suas complicações vasculares ainda não está totalmente elucidado (ZHOU *et al.*, 2015) (MUKAI *et al.*, 2014).

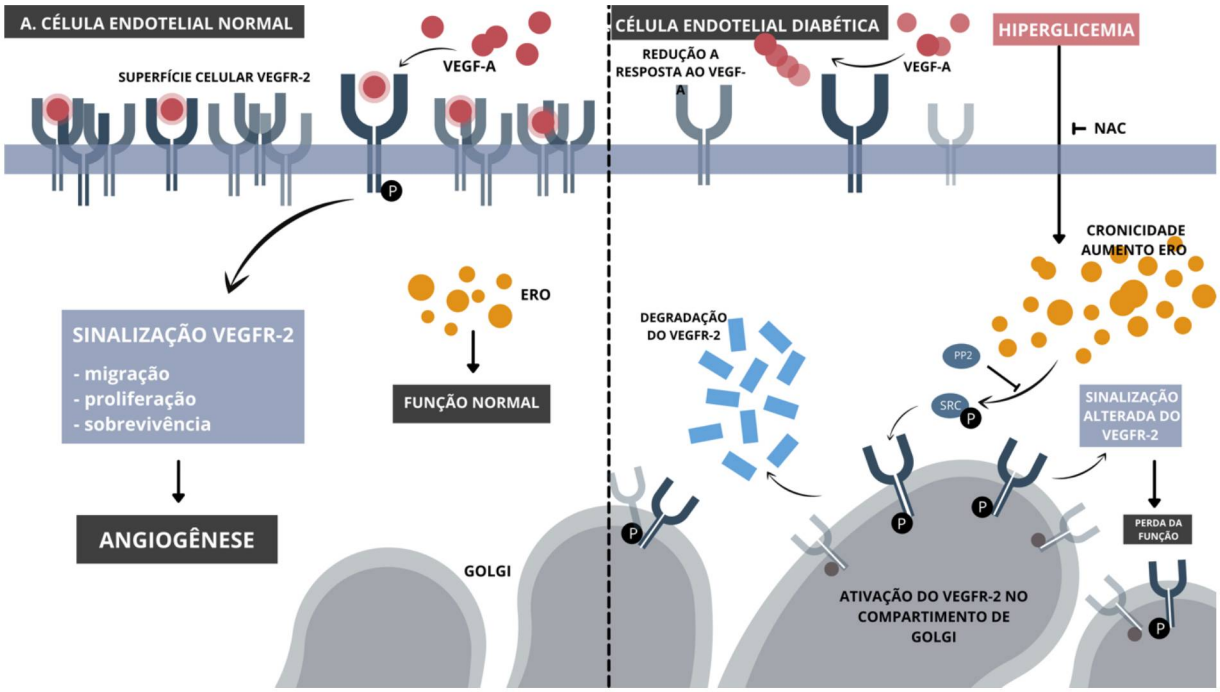
Em geral, recentes estudos identificaram o VEGF-A como responsável por desempenhar um papel central na mediação da vasculopatia diabética em muitos órgãos. Ele tem sido implicado no desenvolvimento de neuropatia e nefropatia no paciente com diabetes e identificado como um mediador da retinopatia diabética (AIELLO; WONG, 2000).

Várias linhas de evidência sugerem que o eixo de sinalização do receptor VEGFR-2, VEGFR-2-VEGF-A é pelo menos parcialmente inibido no diabetes (MORIYA *et al.*, 2010; SCHIEKOFER *et al.*, 2005; WALTENBERGER, 2009). Warren e colaboradores (2014) forneceu novas informações sobre o mecanismo envolvendo a via de sinalização de VEGFR-2 em células endoteliais. Eles identificaram uma via de sinalização VEGFR-2 "não canônica", que é ativada na ausência de ligante no compartimento Golgi. Além disso, descobriram que espécies reativas excessivas de oxigênio (ERO) produzido pela hiperglicemia promoveu a ativação dessa via não canônica, levando ao aumento da degradação do VEGFR-2 em células endoteliais. Como resultado a sinalização "canônico" de VEGFR-2 dependente de ligante foi inibida devido à diminuição da disponibilidade dos receptores de VEGFA (VEGFR2) na superfície das células (FIGURA 12).

Acredita-se que o aumento da produção de ERO seja um mecanismo chave responsável por danos vasculares em pacientes diabéticos. Embora baixas concentrações de ERO contribuam para ativar a sinalização canônica e pró-angiogênica de VEGFR-2 em condições fisiológicas, concentrações mais altas de ERO podem causar danos endoteliais e angiogênese prejudicada. O estudo de Warren e colaboradores (2014) mostra que a exposição crônica a ERO ativa a sinalização VEGFR-2 não canônica. Ao usar camundongos que são seletivamente deficientes em VEGF-A em células endoteliais, eles descobriram que o VEGF-A não é necessário para a ativação dessa via não canônica. Eles também mostraram que a fosforilação de VEGFR-2 induzida por ERO é independente da quinase de VEGFR-2. Como acredita-se que a fosforilação de VEGFR-2 por ERO é mediada por sinalização canônica dependente de VEGF-A (IKEDA *et al.*, 2005; USHIO-FUKAI *et al.*, 2002), o envolvimento de outros mecanismos para ativação de VEGFR-2 intracelular mediada por ROS independente de VEGF-A é um novo conceito.

Outro achado importante no estudo de Warren e colaboradores (2014) é que a fosforilação de VEGFR-2 induzida por ERO ocorre dentro do compartimento de Golgi. Há evidências crescentes de que o compartimento de Golgi não apenas processa proteínas produzidas no retículo endoplasmático, mas também funciona como um local de ativação para algumas proteínas sinalizadoras. A descoberta de que essa sinalização VEGFR-2 não canônica é mediada por quinases da família Src (que é distinta da sinalização canônica) sugere ainda que as duas vias de sinalização têm papéis diferentes nas células endoteliais (MORIYA; FERRARA, 2014).

FIGURA 12 - . SINALIZAÇÃO VEGF-A/VEGFR-2 NO DIABETES



Sinalização do VEGFR-2 no diabetes: (A) Em células endoteliais normais, sinais pró-angiogênicos desencadeados por VEGF-A são transmitidos por VEGFR-2 na superfície celular e baixas concentrações de ROS produzidas pela sinalização podem atuar como mensageiros secundários modulando a função fisiológicas ca célula. (B) Em células endoteliais diabéticas, a hiperglicemia causa cronicidade e aumento ROS que levam à ativação de quinases da família Src e subsequente fosforilação de VEGFR-2 intracelular. Esses processos ocorrem dentro do compartimento de Golgi e não requerem VEGF-A. A rápida degradação do VEGFR-2, seguida pela ativação contínua desta sinalização, resulta na diminuição da disponibilidade de VEGFR-2 na superfície celular, atenuando assim as respostas ao VEGF-A exógeno, com a perda de sua função principal.
Fonte: Adaptado de Moriya e Ferrara (2014)

Além disso, é intrigante que a depleção da proteína VEGFR-2 devido à ativação excessiva da sinalização de VEGFR-2 no compartimento de Golgi leve à diminuição da abundância de VEGFR-2 na superfície celular, atenuando assim a resposta angiogênica induzida por VEGF-A. A internalização celular dos receptores

de fator de crescimento, incluindo o VEGFR-2, ocorre após eles terem sido ativados por ligantes específicos. Em muitos casos, esse processo é responsável por encerrar a sinalização através da degradação do complexo receptor ativado. Assim, a internalização e subsequente degradação do receptor ativado é agora considerada um importante mecanismo pelo qual as células endoteliais podem regular a intensidade da sinalização (LAMPUGNANI *et al.*, 2006). Os achados de Warren e colaboradores (2014) confirmam que esse processo de degradação ocorre dentro do compartimento de Golgi e, além disso, é independente de ligante. Resta estabelecer se outros receptores tirosina quinases (RTKs) também possuem sinalização independente de ligante semelhante que contornam e inibem a sinalização canônica dependente de ligante (MORIYA; FERRARA, 2014).

Ainda é preciso elucidar as diferenças das vias de sinalização canônica e não canônica de VEGFR-2. Warren e colaboradores (2014) mostraram que a via de sinalização não canônica pode competir com a sinalização canônica pela exaustão da proteína VEGFR-2. No entanto, papéis precisos para a sinalização não canônica ainda precisam ser determinados, e pode-se especular que sinalização não-canônico desempenha papéis distintos da sinalização canônica. De fato, a fosforilação de p38, um alvo do VEGFR-2, provavelmente não ocorra por meio da via de sinalização não canônica mediada por Src, enquanto a sinalização canônica e não canônica ambas desencadeiam a fosforilação da fosfolipase C gama (PLCγ), outro alvo de VEGFR-2, conforme relatado por Warren e colaboradores (2014). Além disso, eles mostraram que o receptor da angiopoietina-1 (*Tyrosine kinase with Immunoglobulin-like and EGF-like domains 2* - Tie2), outro RTK, também ativado por ERO através de Src, mas que esta ativação não leva à redução na proteína Tie2 como faz com VEGFR-2. Não só a ativação induzida por ERO dos RTKs através de Src parecem ser distintos da sinalização canônica dependente de ligante, é provável que sua função também seja diferente para cada RTKs. Elucidando os mecanismos de efeitos diferenciais da sinalização mediada por Src induzida por ERO dos RTKs continua a ser determinado.

Por fim, o estudo de Warren e colaboradores (2014) levanta a possibilidade de que antioxidantes possam resgatar a resposta prejudicada ao VEGF no diabetes. Eles descobriram que o tratamento com N-acetil-L-cisteína (NAC) aumentou substancialmente a fosforilação do VEGFR-2 em resposta ao VEGF-A tanto *in vitro* quanto *in vivo*. A melhora induzida por NAC foi devido à restauração de VEGFR-2 na superfície celular por bloqueio de ERO e subsequente fosforilação de VEGFR-2 na

via não canônica. Assim, a inibição de ERO ou outros eventos que levem à supressão dessa sinalização não canônica pode ser uma estratégia terapêutica promissora para pacientes que sofrem de complicações vasculares diabéticas.

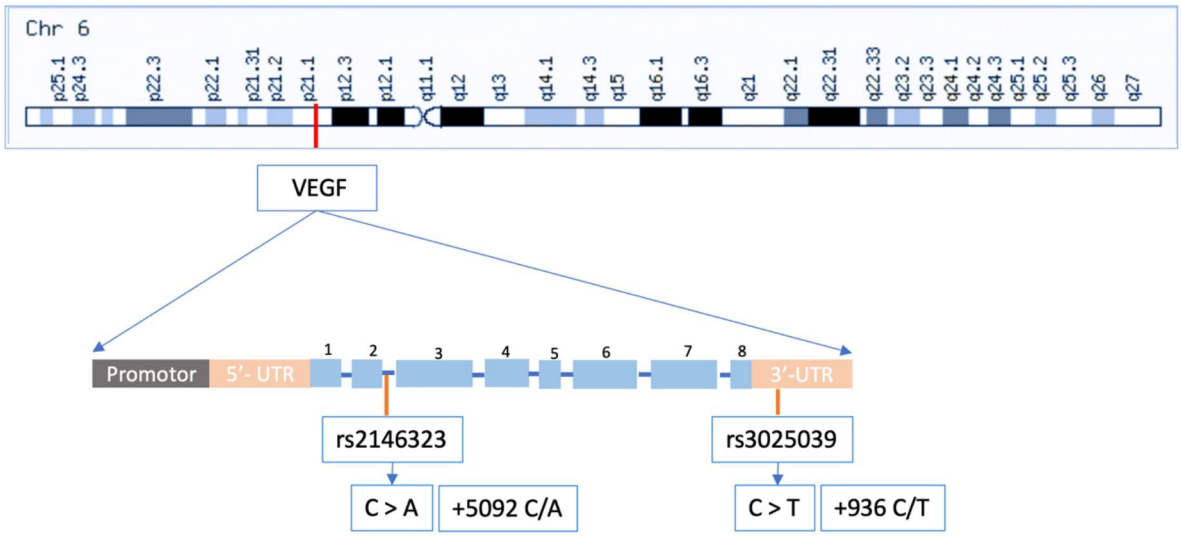
2.4 POLIMORFISMOS NOS GENES *VEGFA* E *VEGFR2*

Polimorfismos de nucleotídeo único (*Single nucleotide polimorphism* - SNP) são o tipo mais comum de variação genética no genoma humano representando uma diferença em um nucleotídeo num local específico do genoma. Normalmente os polimorfismos são bi-alélicos e por definição encontrados em mais de 1% da população. Em média, existe um polimorfismo a cada 300 nucleotídeos, o que significa que existem cerca de 10 milhões de polimorfismos no genoma humano (FRAZER *et al.*, 2007). Polimorfismos são bem conhecidos por influenciar a expressão gênica e determinar a variabilidade fenotípica, podendo resultar em maior suscetibilidade à várias doenças ou resposta aos fatores ambientais. Em geral ocorrem com muito menos frequência em regiões codificadoras, mas os polimorfismos em locais regulatórios de um gene podem afetar as taxas de transcrição alterando a expressão de suas proteínas correspondentes (LIAO; LEE, 2010).

Em relação aos fatores genéticos, o DM2 é considerado uma doença poligênica onde a suscetibilidade genética é determinada por vários genes que contribuem para a sua predisposição, neste contexto cada gene tem seus efeitos únicos em cada indivíduo (LINDER *et al.*, 2012) e além destes determinantes genéticos do diabetes, várias mutações e polimorfismos genéticos têm sido associados às complicações clínicas do diabetes. Os dados cumulativos em pacientes com diabetes com uma variedade de complicações micro e macrovasculares apoiam a presença de fortes fatores genéticos envolvidos no desenvolvimento de várias complicações diabéticas (KHARROUBI; DARWISH, 2015). Recentes estudos têm sido reportados que o polimorfismo e os níveis de expressão do *VEGFA* estão envolvidos na patogênese do DM2 e com suas complicações. O gene humano *VEGFA* que codifica o VEGF-A está presente no cromossomo 6 na região 6p21.3 e está organizado em oito éxons, separados por sete íntrons com uma região codificante de aproximadamente 14 Kb (FIGURA 13) (FERRARA, 1999; VINCENTI *et al.*, 1996). O VEGF-A é um mitógeno específico de células endoteliais e com várias funções como de promover a proliferação de células endoteliais, aumentar a permeabilidade

vascular e induzir a angiogênese e vários fatores como o estresse oxidativo, hipóxia e a resposta inflamatória podem aumentar a sua expressão na presença de hiperglicemia (AWATA *et al.*, 2002; DONG, 2019).

FIGURA 13 - LOCALIZAÇÃO CROMOSSOMAL DO GENE VEGFA E DOS POLIMORFISMOS rs2146323 E rs3025039



Representação esquemática dos éxons, íntrons, região promotora, 5'UTR, 3'UTR e localização dos polimorfismos rs2146323 e rs3025039.
Fonte: adaptado Ncbi (2020).

A expressão de *VEGFA* em resposta a diferentes estímulos é altamente variável entre os indivíduos. Polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) no gene *VEGFA* podem contribuir para essa variação (ANDERSEN *et al.*, 2012).*VEGFA* é um gene altamente polimórfico, onde estes polimorfismos estão presentes com variadas frequências e vários já foram reportados e estão relacionados à expressão alterada da proteína VEGF-A e de suas concentrações plasmáticas (BUYSSCHAERT *et al.*, 2008).

Pelo fato do polimorfismo rs2146323 (+5092C/A) estar localizado no Intron 2 não possui impacto na estrutura da proteína VEGF-A (FIGURA 13), porém vários estudos mostram que este polimorfismo pode estar relacionado ao risco à várias doenças. Em um estudo conduzido por Dong (2019) os portadores do genótipo AA tiveram o risco aumentado para DMG. Em uma metanálise conduzida por Zeng e colaboradores (2015) foi sugerido que o alelo A poderia aumentar o risco de retinopatia diabética, corroborando aos resultados de Nakanish e Watanabe (2009)

onde foi verificado uma forte associação do polimorfismo rs2146323 com a progressão da retinopatia diabética.

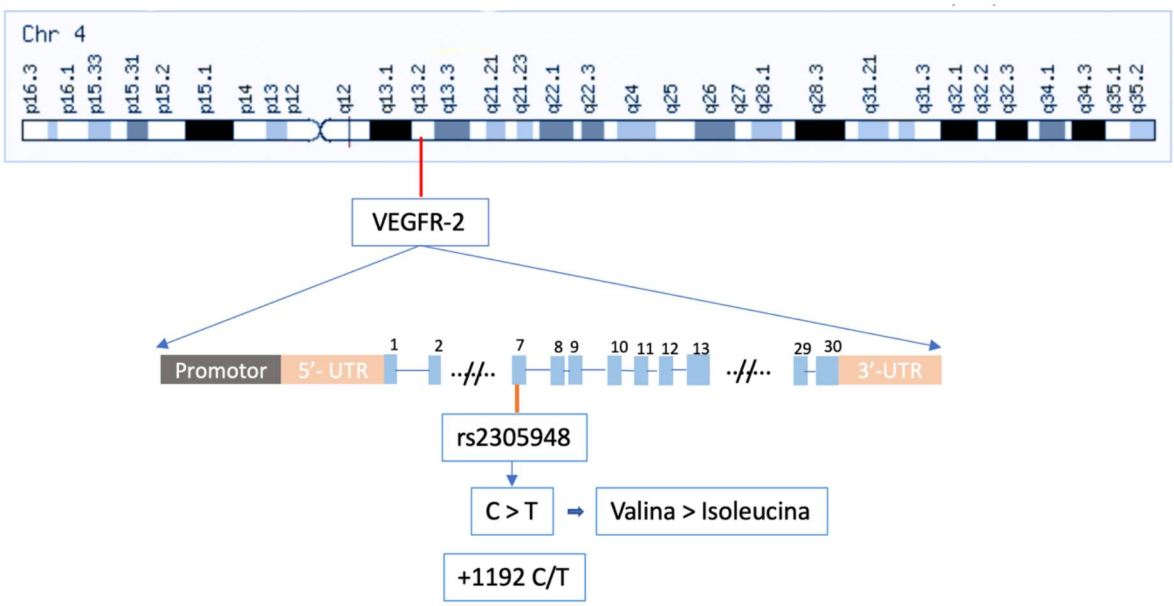
A variante rs3025039 (+936C/T) localizada na região 3' UTR (FIGURA 13) contribui para o aumento da expressão de VEGF-A, suas concentrações plasmáticas e para a suscetibilidade relacionada as doenças envolvendo angiogênese, incluindo aborto espontâneo, câncer e complicações diabéticas microvasculares e macro vasculares(BUYSSCHAERT *et al.*, 2008).

A associação deste polimorfismo com o câncer de mama foi analisada em um estudo brasileiro e foi verificado que o genótipo CC pode estar relacionado ao aumento do risco para a doença (OLIVEIRA *et al.*, 2011), porém na população asiática não foi associado ao risco ao câncer (YAN *et al.*, 2014; ZHOU *et al.*, 2011). Com relação ao diabetes, Kim e colaboradores (2009) investigaram a associação do polimorfismo com complicações microvasculares, encontrando com maior frequência do genótipo TT entre pessoas com retinopatia. Entretanto, esta associação não foi replicada na população oriental (AL-HABBOUBI *et al.*, 2011; KANGAS-KONTIO, T. *et al.*, 2009; RUGGIERO *et al.*, 2011; UTHRA *et al.*, 2008).

O gene que codifica o receptor VEGFR-2 humano está localizado no cromossomo 4 região 4q11-12 (SAIT *et al.*, 1995). Em humanos, o gene VEGFR-2 consiste em 30 éxons, abrangendo 47.337 pb de DNA na fita reversa do cromossomo 4. O éxon 1 contém 5' UTR e o éxon 30 contém 3' UTR(http://www.ensembl.org).

A variante rs2305948 (+1192C/T) está localizada no éxon 7 e resulta em uma substituição do aminoácido valina por uma Interleucina (FIGURA 14). O aminoácido está localizado no terceiro domínio extracelular semelhante ao da molécula de imunoglobulina humana sendo importante para a ligação do receptor ao seu ligante. O polimorfismo ocorre em região codificante do gene e pode promover alterações potenciais à conformação do receptor interferindo com a capacidade de ligação ao VEGA e na sua capacidade de sinalização (ZHANG *et al.*, 2009). O alelo de menor frequência A tem sido reportado como potencial redutor a afinidade de ligação do VEGA ao VEGFR-2 (WANG *et al.*, 2007a).

FIGURA 14 - . LOCALIZAÇÃO CROMOSSOMAL DO GENE VEGFR2 E DO POLIMORFISMO rs2305948



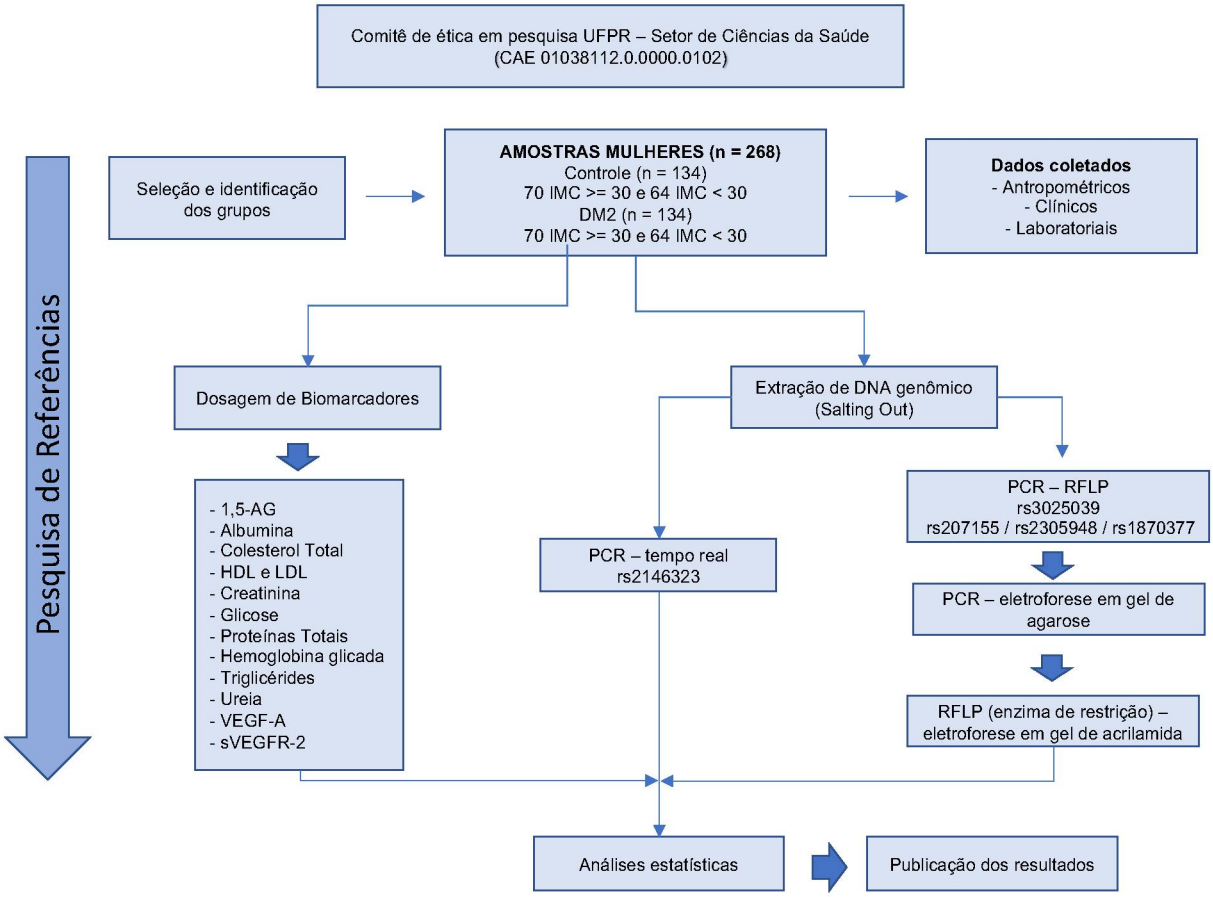
Representação esquemática dos éxons, íntrons, região promotora, 5'UTR, 3'UTR e localização do polimorfismo rs2305948.
Fonte: adaptado Ncbi (2020).

O polimorfismo rs2305948 no gene VEGFR-2 tem sido amplamente estudado nos últimos anos. Vários estudos observaram sua associação à várias doenças, incluindo a suscetibilidade à doença coronariana (WANG *et al.*, 2007a), má formação vascular (ZHENG *et al.*, 2013), endometriose e aborto espontâneo recorrente (MATALLIOTAKI *et al.*, 2019), câncer colorretal (JANG *et al.*, 2013), degeneração macular relacionada à idade (GALAN *et al.*, 2010) e síndrome de hiperestimulação ovariana (O'BRIEN *et al.*, 2014).

3 MATERIAL E MÉTODOS

O estudo tem aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Federal do Paraná – Setor de Ciências da Saúde sob o registro CAAE 01038112.0.0000.0102 (Anexo 1). A FIGURA 15 mostra o fluxograma do projeto que evidencias as etapas do estudo.

FIGURA 15 - FLUXOGRAMA DE TRABALHO



Fluxograma evidenciando as etapas do projeto.
Fonte: O autor (2022).

3.1 AMOSTRAS

No presente estudo foram utilizadas amostras de sangue total e soro de 134 mulheres diabéticas tipo 2 (DM2) e 134 mulheres saudáveis (grupo controle), as quais foram subdivididas conforme o Índice de Massa Corporal (IMC): ≥ a 30 (n=70) e < 30 (n=64). Os critérios utilizados para a caracterização dos pacientes com DM2 foram os

preconizados pela Associação Americana de Diabetes (*American Diabetes Association* - ADA) (ADA, 2019).

O grupo controle foi obtido no Banco de Sangue do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná (HC-UFPR) e os pacientes diabéticos na Unidade de Diabetes do Serviço de Endocrinologia e Metabologia do HC-UFPR (SEMPR), mediante aceite do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo 2). Os dados antropométricos e clínicos foram obtidos através de entrevista (Anexo 3) e dados do prontuário médico.

Para as amostras de soro foram utilizados tubos com gel separador (BD Vacutainer® SST™), que foram centrifugadas (*HermleZ*206A) por 10 minutos a 6.000 rotações por minuto, alíquotas de 0,5 ml foram armazenadas em microtubos em freezer -20° e -80° para posterior dosagem dos parâmetros bioquímicos. As amostras de sangue total foram coletadas em tubos com anticoagulante EDTAK_2 (BD Vacutainer® K_2EDTA), homogeneizadas por 15 minutos e fracionadas. Uma fração de 1,0 ml para a quantificação da hemoglobina glicada (HbA1c) e a outra com o restante foi centrifugada (*HermleZ*206A) para a obtenção do *buffy coat* (camada de leucócitos). O *buffy coat* foi utilizado posteriormente para fazer a extração do DNA genômico. Amostras hemolisadas, lipêmicas e ictéricas foram excluídas dos ensaios.

3.2 EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DO DNA GENÔMICO

O DNA genômico foi extraído do *buffy coat*, pelo método de *salting out* onde as proteínas celulares sofrem desidratação e precipitação com uma solução saturada de cloreto de sódio (LAHIRI; NURNBERGER, 1991). A utilização de espectrofotometria (S60, Biochrom) em 260 e 280 nm permitiu a quantificação deste DNA e amostras com concentração inferior a 20 ng/µL e razão 260/280nm menor que 1,5 ou superior a 2,1 foram descartadas por caracterizar contaminação e baixa qualidade da amostra. O DNA quantificado foi diluído com água ultrapura estéril numa concentração final de 100 ng/µL para a genotipagem pelo sistema PCR-RFLP (*Polimerase Chain Reaction - Restriction Fragment Length Polymorphism*) e 20 ng/µL pelo sistema TaqMan®. As amostras de DNA genômico foram conservadas em freezer a -20°C.

3.3 GENOTIPAGEM DOS POLIMORFISMOS

Os genes e os polimorfismos de único nucleotídeo estudados estão descritos no QUADRO 2.

A genotipagem do rs2146323 foi realizada utilizando a PCR em tempo real com sonda fluorescente específica do sistema TaqMan® (*AppliedBiosystems, Foster City, CA, USA*) no equipamento de PCR em tempo real 7500 Fast™ (*AppliedBiosystems, Foster City, CA, USA*), utilizando-se reagentes (*Master Mix®, SNP GenotypingAssay®*) e demais suplementos fornecidos pelo fabricante (*AppliedBiosystems*).

QUADRO 2 - CARACTERIZAÇÃO DOS POLIMORFISMOS EM ESTUDO

Genes	Designação Omin	Posição no cromossomo	SNPs	Técnica	Local do SNP
VEGFA	192240	6p21.3	rs2146323	TaqMan®	Intron 2
VEGFA	192240	6p21.3	rs3025039	PCR-RFLP	3' UTR
VEGFR2	191306	4q.12	rs2305948	PCR-RFLP	Exon 7

rs, *reference* SNP; OMIM®, *Online Mendelian Inheritance in Man®*; *VEGFA*, fator de crescimento endotelial vascular; *VEGFR2*, receptor 2 do fator de crescimento endotelial vascular. Fonte: O autor (2020).

Os experimentos realizados em placas de 96 poços em câmara de fluxo laminar evitando contaminação, seguiram o protocolo descrito na QUADRO 3. A placa foi coberta com filme específico e posteriormente centrifugada (*Hermle*Z326K) por 2 minutos a 4.000 rpm para remoção de bolhas e sedimentação da mistura. Em cada placa foram adicionados dois controles negativos (NTC: *no template control*), para avaliar a contaminação no sistema, os quais continham apenas a mistura de reação e água (sem DNA). Os grupos DM2 e CTRL foram ensaiados de forma aleatória, na mesma placa.

A identificação das variantes genéticas rs3025039 e rs2305498 foram realizadas através da técnica de PCR-RFLP. A técnica do polimorfismo do comprimento do fragmento de restrição (RFLP) é um método enzimático de genotipagem em que uma região contendo um alelo específico é direcionada e amplificada por PCR e subsequentemente digerida usando uma enzima endonuclease. Os resultados são interpretados com base na variação do tamanho dos fragmentos de PCR digeridos resultantes, que são distinguidos por eletroforese

em gel. RFLP é um método relativamente simples, rápido, barato e conveniente para genotipagem do polimorfismo, em contraste com os métodos mais complexos como TAQMAN e sequenciamento de DNA (SAIFULLAH; TSUKAHARA, 2018). A reação em cadeia da polimerase (PCR) foi realizada em termociclador Biocycler (Biosystems).

QUADRO 3 - PROTOCOLO PARA ENSAIO TAQMAN® DO POLIMORFISMO rs2146323 DO GENE VEGFA

Reagentes	**rs2146323** **Volume parea reação de 8 µL**
Sonda TaqMan®	0,1 µL
Master Mix	3,0 µL
Água ultra pura estéril	1,9 µL
DNA (20 ng/µL)	3,0 µL
Ciclos Térmicos	
1 ciclo pré-PCR	60° por 30 segundos
1 ciclo	95° por 10 segundos
50 ciclos	95° por 15 segundos 60° por 90 segundos
1 ciclo pós-PCR	60° por 30 segundos

Sonda TaqMan® SNP Genotyping Assays – Life Technologies, contendo um par de oligonucleotídeos iniciadores (primers), marcados com fluoróforos distintos (VIC e FAN). Master Mix: reagente comercial contendo DNA polimerase AmpliTaq Gold® ultrapura, desoxirribonucleotídeos trifosfato (dNTPs), referência passiva ROX e tampão.
Fonte: O autor (2020).

As condições de PCR utilizadas para a amplificação do polimorfismo rs3025039 do gene VEGF estão descritas no QUADRO 4. Os oligonucleotídeos iniciadores (Sigma-Aldrich) e as condições da PCR foram descritos por (POROJAN, MIHAI DUMITRU *et al.*, 2015).

As condições de PCR utilizadas para a amplificação do polimorfismo rs2305948 do gene *VEGFR2* estão descritas no QUADRO 5. Os oligonucleotídeos iniciadores (Sigma-Aldrich) e as condições da PCR foram descritos por (NOURI *et al.*, 2014).

Uma alíquota de 2 µL do produto de PCR após a amplificação adicionada de 3,0 µL de solução tampão (glicerol 30%; azul de bromofenol 0,05% e xilenocianol 0,05%) foram submetidos à eletroforese aplicada em gel de agarose 2% com voltagem constante de 80 Volts (~22 mA) em temperatura ambiente durante 1 hora e 30 minutos

em tampão TBE 1x (Tris-hidroximetilaminometano 89 mmol/L; ácido bórico 89 mmol/L e EDTA 1 mmol/L, pH 8,2). Ao fim da eletroforese os géis foram corados com uma solução de brometo de etídeo (0,5 µg/mL) e visualizados em transiluminador sob luz UV (302 nm), e as imagens obtidas do sistema de fotodocumentação L-PIX (Loccus biotecnologia).

QUADRO 4 - PROTOCOLO UTILIZADO PARA GENOTIPAGEM POR PCR-RFLP DO POLIMORFISMO rs3025039 DO GENE VEGFA

Reagentes	**rs3025039 do gene VEGF**	
	Concentração Final	**Volume (total 10µL)**
Água Regente estéril		5,8 µL
Tampão Taq 10x *	1x	1,0 µL
Primer Forward (10 pmol/µL)	0,5 pmol	0,5 µL
Primer Reverse (10 pmol/µL)	0,5 pmol	0,5 µL
$MgCl_2$ 25 mM	1,5 mM	0,6 µL
dNTP 5 mM	0,2 mM	0,4 µL
Taq DNA polimerase (5 U/µL)	1.0 U	0,2 µL
DNA molde (100 ng/µL)	10 ng/µL	1,0 µL
	Ciclos Térmicos	**Temperatura – tempo**
	1 ciclo	94° por 5 minutos
	35 ciclos	94° por 30 segundos 64° por 1 minuto 72° por 75 segundos
	1 ciclo	72° por 5 mimutos
Primers	F - 5' CGAGACGCTCTCAGAGGAGAAGGAA 3'	
	R - 5' TAAATGTATGTATGTGGGTGGGTGTGTCTACAGG 3'	

*Tampão TAQ 10X, (NH4)2SO4 750 mM, Tris-HCl (pH 8,8; 25ºC); 0,1% (v/v) Tween 20. Taq DNA polymerase (Invitrogen).

Fonte: O autor (2020).

Os amplicons obtidos da PCR, após conferência do seu tamanho através da visualização em gel, foram digeridos com suas respectivas enzimas de restrição: NlaIII (rs3025039) e BstZ17I (rs2305948) seguindo os protocolos apresentados no QUADRO 6 por incubação em banho maria a 37°C. Os fragmentos obtidos após a incubação foram separados em eletroforese em gel de policrilamida (29:1) a 12%, em cuba mini Protean 3 BioRad (100x75x0,75mm) com voltagem de 120 Volts (~80 mA) por 1 hora e 30 minutos. As visualizações dos géis foram realizadas em transiluminador sob luz UV e as imagens obtidas com o sistema de foto-

documentação L-PIX (Loccus biotecnologia) após serem coradas em solução de brometo de etídeo (0,5 µg/mL).

QUADRO 5 - PROTOCOLO UTILIZADO PARA GENOTIPAGEM POR PCR-RFLP DO POLIMORFISMO rs2305498 DO GENE VEGFR2

Reagentes	**rs2305498 do gene VEGFR-2**	
	Concentração Final	**Volume (total 10µL)**
Água Regente estéril		5,8 µL
Tampão Taq 10x *	1x	1,0 µL
Primer Forward (10 pmol/µL)	0,5 pmol	0,5 µL
Primer Reverse (10 pmol/µL)	0,5 pmol	0,5 µL
$MgCl_2$ 25 mM	1,5 mM	0,6 µL
dNTP 5 mM	0,2 mM	0,4 µL
Taq DNA polimerase (5 U/µL)	1.0 U	0,2 µL
DNA molde (100 ng/µL)	10 ng/µL	1,0 µL
	Ciclos Térmicos	**Temperatura – tempo**
	1 ciclo	94° por 5 minutos
	30 ciclos	95° por 1 minuto 58° por 1 minuto 72° por 1 minuto
	1 ciclo	72° por 5 mimutos
Primers	F - 5' TGAGGTTAAAAGTTCTGGTGTCCCTGTT 3'	
	R - 5' AATGTACAATCCTTGGTCACTCCGGGGTA 3'	

*Tampão TAQ 10X, (NH4)2SO4 750 mM, Tris-HCl (pH 8,8; 25ºC); 0,1% (v/v) Tween 20. Taq DNA polymerase (Invitrogen).

Fonte: O autor (2020).

QUADRO 6 - PROTOCOLO PARA A REAÇÃO DE RESTRIÇÃO E DETECÇÃO DOS POLIMORFISMOS rs3025039 E rs2305498

Reagentes	***VEGFA*** **rs3025039**	***VEGFR2*** **rs2305948**
Produto de PCR (~20 ng/µL)	1,0 µL	1,0 µL
Tampão 10x *	0,5 µL	0,5 µL
Água ultrapura estéril	3,3 µL	3,3 µL
Enzima de Restrição (10 U/µL)	0,2 µL (NlaIII)	0,2 µL (BstZ17I)
Volume final da reação	5,0 µL	5,0 µL
Temperatura de incubação	37°C	37°C
Tempo de incubação	4 horas	4 horas

*Tampão 10X, Biolabs, 500 mM de acetato de potássio, 200 mM Tris-acetato, 100 mM de acetato de magnésio, 100 µg/ml de Albumina Recombinante - Enzima BstZ17I(BioLabs); Tampão 10X, ThermoScientific), 100 mM Tris-HCl (pH 7.5), 100 mM MgCl2, 500 mM NaCl, 0.1 mg/mL BSA - Enzima NlaIII (ThermoScientific).

Fonte: o autor (2020)

3.4 PARÂMETROS BIOQUÍMICOS

As dosagens realizadas de parâmetros bioquímicos, o princípio do método e os valores de referência estão apresentados no QUADRO 7.

QUADRO 7 - PARÂMETROS BIOQUÍMICOS AVALIADOS (PRINCÍPIO METODOLÓGICO, COEFICIENTE DE VARIAÇÃO E INTERVALO DE REFERÊNCIA)

Dosagem	Princípio do Método	Cva	Intervalo de Referência
Albumina	Colorimétrico (Verde de Bromocresol)	1,6	2,9-4,7 g/dL
ALT	Ensaio cinético UV com L-alanina, cetoglutarato, NADH e piridoxal fosfato	1,6	10 – 45 U/L
AST	Ensaio cinético UV com L-aspartato, cetoglutarato, NADH e piridoxal fosfato	2,2	15 – 40 U/L
Colesterol Total	Enzimático Colorimétrico (Reação de Trinder)	2,7	Desejável: <170 mg/dL Limítrofe: 170-199 mg/dL Elevado: >200 mg/dL
Creatinina	Colorimétrico (Picrato alcalino)	2,7	0,26-0,81 mg/dL
Gama GT	Cinético - Colorimétrico	1,13	5 - 58 mg/dL
Glicose	Glucose oxidase (Reação de Trinder)	2,2	<100 mg/dL
HDL - colesterol	Enzimático Colorimétrico (Acelerador - Detergente Seletivo)	3,6	Desejável: 35-40 mg/dL
LDL - colesterol	Surfactante Seletivo	4,2	Desejável: <110 mg/dL Limítrofe: 110-129 mg/dL Elevado: >130 mg/dL
Hemoglobina glicada	Imunoensaio (padronizado DCCT)	1,7	4,0-6,0%
Proteínas Totais	Reação do Biurero	1,4	6,0 – 8,0 g/dL
Triglicérides	Enzimático Colorimétrico (Reação de Trinder)	3,4	Desejável: <100 mg/dL Elevado: >130 mg/dL
Ureia	Ensaio cinético com uréase, GLDH e NADH	1,1	15 – 44 mg/dL
VEGF-A	Imunoensaio (Luminex)	-	-
sVEGFR-2	Imunoensaio (Luminex)	-	-

Determinações realizadas com reagentes, padrões e calibradores da Abbott, em sistema automatizado Architect Ci8200 (Abbott Diagnóstica Laboratórios do Brasil) e da Labtest em sistema automatizado Labmax 400 (Labtest) empregando-se reagentes, calibradores e controles fornecidos pelo fabricante. CVa, coeficiente de variação analítica inter-ensaio, em porcentagem, para soro controle com concentração "normal". *Equação de *Friedewald*, LDL-colesterol = Colesterol total – HDL-colesterol – Triglicérides/5.
Fonte: O autor (2021).

As determinações de biomarcadores de controle glicêmico, perfil lipídico, perfil nutricional e função renal foram quantificados nas amostras de soro de indivíduos dos

grupos controle e DM2 em sistema automatizado Architect Ci8200 (Abbott) ou sistema automatizado Labmax 400 (Labtest AS), utilizando reagentes, controles e calibradores adequados.

3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a análise das variáveis contínuas para normalidade foi utilizado o teste de *Kolmogorov-Smirnov*. A verificação de *outliers* foi realizada pelo método gráfico disponível no programa Statistica 8.0. Variáveis que apresentaram distribuição normal foram comparadas pelo teste "t" de *Student* para amostras não pareadas (bidirecional) ou análise de variância (ANOVA) quando a comparação envolvia mais de dois grupos, sendo os valores expressos em média e desvio padrão (±1SD). As variáveis que não apresentaram distribuição normal foram comparadas com o teste U de *Mann-Whitney*, ou o teste de *Kruskall-Wallis* (mais de 2 grupos), sendo os valores apresentados como mediana e intervalo interquartil (25%-75%). Para as variáveis categóricas foram utilizados o teste do Chi-quadrado (χ^2) ou o teste Exato de Fischer bidirecional, conforme apropriado.

As análises de correlação foram realizadas através de testes descritos por *Pearson* (variáveis com distribuição normal) ou *Spearman* (variáveis sem distribuição normal). Os genótipos foram caracterizados como 1 (homozigoto usual); 2 (heterozigoto) e 3 (homozigoto raro) para todas as análises de correlação.

O programa Statistica para Windows 8.0 (StatSoft Inc, Tulsa OK, USA) foi utilizado nas análises de dados.

A verificação do equilíbrio de *Hardy-Weinberg*, cálculos das frequências genotípicas e alélicas e o intervalo de confiança de 95% (IC95%) para os alelos de menor frequência (AMF) foram calculadas com o programa DeFinetti (http://ihg.gsf.de/cgi-bin/hw/hwa1.pl). Para comparações das frequências alélicas com outras populações, foi considerado semelhante quando a frequência do AMF (alelo menos frequente) se encontrava dentro do limite de 95% do intervalo de confiança. Frequências acima ou abaixo do 95%IC foram consideradas diferentes.

Uma probabilidade inferior a 5% ($P < 0,05$) foi considerada significativa em todas as análises. Para os resultados que apresentaram significância, foi aplicado o teste de *Odds Ratio* (OR) que indica a relação entre a hipótese de acontecer um acontecimento entre diversas situações.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados estão descritos em três grupos: dados antropométricos (4.1), análises bioquímicas (4.2) e análises moleculares (4.3).

4.1 DADOS ANTROPOMÉTRICOS

O estudo contemplou 268 mulheres, das quais 134 grupo DM2 e 134 mulheres grupo CTRL, as quais foram subdivididas conforme IMC, 64 com IMC≥30 e 70 com IMC<30. A estatística descritiva dos grupos do estudo encontra-se na TABELA 1.

Pela definição da Organização Mundial da Saúde, obesidade é o excesso de gordura corporal, em quantidade que afete a saúde e o bem-estar. Para quantificar utiliza-se a relação peso (kg)/altura^2 definido como o Índice de Massa Corporal (IMC). Uma pessoa é considerada obesa quando seu IMC é maior ou igual a 30 kg/m^2. O valor do IMC considerado normal fica compreendido entre 18,5 e 24,9 kg/m^2 e sobrepeso entre 25 e 29,9 kg/m^2 (MANUEL FERNÁNDEZ-REAL *et al.*, 2001).

O pareamento das amostras foi realizado por idade e IMC e o grupo DM2 apresentou um tempo médio de diabetes de 8 anos (TABELA 1).

4.2 ANÁLISES BIOQUÍMICAS

As concentrações séricas e a estatística descritiva dos biomarcadores bioquímicos para os grupos em estudo (CTRL e DM2) está representada na TABELA 2. Os ensaios utilizados para quantificação dos biomarcadores estão descritos no item 3.4 da seção de Materiais e Métodos (QUADRO 7).

O grupo Controle foi formado por mulheres doadoras de sangue que não apresentavam o diagnóstico de diabetes do tipo 2 no momento da coleta e a glicemia foi obtida na ausência de jejum. Mesmo na ausência de jejum o grupo controle não apresentou concentrações de glicose superiores a 104 mg/dL. As amostras do grupo DM2 foram obtidas após aproximadamente 12 horas de jejum.

TABELA 1 - DADOS ANTROPOMÉTRICOS DE MULHERES CTRL E DM2

Parâmetros	CTRL			DM2			CTRL x DM2		
	TOTAL(n=134)	IMC <30(n=70)	IMC >=30 (n=64)	TOTAL(n=134)	IMC <30 (n=70)	IMC >= 30 (n=64)	P	P(IMC<30)	P(IMC>=30)
Idade (anos)	49(45-56)	52(48-60)	45(37-51)	52(43-60)	60(54-65)	45 (37-50)	0,378	0,155	0,947
Peso (kg)	71(60-84)	61,5(56-67)	84,5(80-92,5)	69,5(58-84)	59(53-63)	84(80-90)	0,262	**0,002**	0,862
Altura (m)	1,62 ± 0,07	1,64 ± 0,07	1,61 ± 0,07	1,58 ± 0,07	1,59 ± 0,07	1,58 ± 0,06	**<0,001***	**<0,001***	**0,004***
IMC (kg/m^2)	24,9(23,1-32)	23,1(21,9-23,9)	32(31,2-34,2)	24,8(23,3-33,4)	23,4(22,1-24,2)	33,9(32-36,9)	0,209	0,669	**0,002**
Tempo de Diabetes (anos)	NA	NA	NA	8(4-15)	10(4 - 18)	6(4-10)	NA	NA	NA

LEGENDA: Os resultados estão apresentados como média ± Desvio Padrão para variáveis com distribuição normal, ou mediana (intervalo interquartil) para variáveis sem distribuição normal. P*, probabilidade teste t-Student bidirecional; P, probabilidade teste U de Mann-Whitney. P<0,05 destacado em negrito. NA, não se aplica para a amostra.

Fonte: O autor (2021).

TABELA 2 - CONCENTRAÇÕES SÉRICAS DE PARÂMETROS BIOQUÍMICOS PARA OS GRUPOS CTRL E DM2

Parâmetros	CTRL			DM2			CTRL x DM2		
	TOTAL(n=134)	IMC <30(n=70)	IMC >=30 (n=64)	TOTAL(n=134)	IMC <30 (n=70)	IMC >= 30 (n=64)	P	P(IMC<30)	P(IMC>=30)
Albumina (g/dL)	3,88 (3,72 - 3,99)	3,91(3,80 - 4,03)	3,83(3,69 - 3,95)	4,17(3,90 - 4,40)	4,25(3,96 - 4,41)	4,11(3,89 - 4,38)	**< 0,001**	**< 0,001**	**< 0,001**
ALT (U/L)	20 (17 - 23)	20(17 - 23)	20(17 -24)	16(12 - 20)	16(12 -20)	14,5(12 - 20,5)	**< 0,001**	**< 0,001**	**< 0,001**
AST (U/L)	15 (12 - 19)	13(11 - 18)	16(13 - 19)	16(10 - 22)	17(11 - 22)	15(10 - 21,5)	0,403	0,075	0,510
Colesterol Total (mg/dL)	195,71 ± 43,28	202,33 ± 47,55	188,47 ± 37,09	191,40± 47,50	187 ± 44,9	196,2 ± 50,11	0,438*	0,052*	0,323*
Creatinina (mg/dL)	0,61 (0,48 - 0,71)	0,64(0,48 - 0,75)	0,57(0,48 - 0,67)	0,8(0,7 - 0,9)	0,81(0,71 - 1,01)	0,80(0,7 - 0,89)	**< 0,001**	**< 0,001**	**< 0,001**
Gama GT (mg/dL)	25,5 (18 - 38)	22(17 - 31)	29,5(21,5 - 46,5)	27,5(18 - 47)	26(18 - 43)	29,5(19,5 - 53)	0,326	0,134	0,854
Glicose (mg/dL)	91,50 (83 - 104)	90,5(80 - 98)	94(84,5 - 109)	129,5(100 - 172)	141,5(104 - 185)	119(96,5 - 158,5)	**< 0,001**	**< 0,001**	**< 0,001**
HbA1c (%)	5,4 (5,1 - 5,6)	5,3(5,0 - 5,6)	5,4(5,2 - 5,6)	7,25(6,10 - 9,60)	7,45(6,3 - 9,5)	6,95(5,95 - 9,75)	**< 0,001**	**< 0,001**	**< 0,001**
HDL-colesterol (mg/dL)	56(48 - 69)	60(53 - 73)	53(46-63)	43,5(36 - 55)	44,50 37 - 61)	43(34,5 - 51)	**< 0,001**	**< 0,001**	**< 0,001**
LDL-colesterol (mg/dL)	108,94 ± 37,31	114,87 ± 42,60	102,46 ± 29,48	111,8 ± 37,78	110,54 ± 40,65	113,18 ± 34,65	0,534*	0,540*	0,062*
Proteínas Totais (g/dL)	6,85 (6,54 - 7,24)	6,78(6,51 - 7,14)	6,89(6,6 - 7,28)	8,36(7,80 - 8,86)	8,5(7,94 - 9,07)	8,24(7,6 - 8,68)	**< 0,001**	**< 0,001**	**< 0,001**
Triglicérides (mg/dL)	122 (87 - 182)	104,5(72,5 - 169)	135,5(105,5 - 197)	134,50(102 - 192)	122,5(80 - 175)	157,5(117,5 - 214,5)	0,148	0,447	0,178
Ureia (mg/dL)	26 (21 - 32)	28(22 - 32)	23,5(20,5 - 29)	31(26 - 39)	35(27 - 43)	28(23 - 33,5)	**< 0,001**	**< 0,001**	**< 0,001**

LEGENDA: Os resultados estão apresentados como média ± Desvio Padrão para variáveis com distribuição normal, ou mediana (intervalo interquartil) para variáveis sem distribuição normal. P*, probabilidade teste t-Student bidirecional; P, probabilidade teste U de Mann-Whitney. P<0,05 destacado em negrito.

Fonte: O autor (2021).

4.2.1 Biomarcadores de controle glicêmico

As concentrações dos biomarcadores glicêmicos, como a glicemia e HbA1c entre os indivíduos do grupo DM2 foi significativamente maior em relação ao grupo CTRL. Esta diferença era esperada e confirma o critério de seleção dos grupos, pois no grupo CTRL, como esperado apresentou uma glicemia ao acaso ≤ 200 mg/dL (QUADRO 1). O grupo DM2 apresentou bom controle glicêmico, uma vez que apresentaram uma glicemia (129,5 mg/dL) e $HbA1_C$ (7,25%) médios inferiores aos valores preconizado pela ADA (ADA, 2022b) e SBD (SBD, 2019) como bom controle glicêmico em relação a glicemia pós-prandial (Glicemia em jejum <180 mg/dL) mas um mal controle glicêmico em relação a HbA1c (HbA1c >7,0 %). As complicações causadas por um descontrole glicêmico são representadas por doenças macro vasculares e microvasculares. Se existirem, podem levar ao aumento da mortalidade, diminuição da qualidade de vida e aumento dos custos do tratamento da doença (SBD, 2019).

4.2.2 Biomarcadores de perfil lipídico

O perfil lipídico compreende a quantificação sérica do colesterol total, HDL-colesterol, LDL-colesterol e triglicérides. A dislipidemia é uma alteração do metabolismo de lipoproteínas circulantes no sangue e um dos principais fatores de risco para doenças cardiovasculares no DM. As características da dislipidemia diabética no DM2 são uma alta concentração de triglicerídeos no plasma, baixa concentração de colesterol HDL e concentração aumentada de colesterol LDL. As alterações lipídicas associadas ao DM2 são atribuídas ao aumento do fluxo de ácidos graxos livres secundário à resistência à insulina e a obesidade (MOORADIAN, 2009; PEREIRA, 2011). Pacientes com diabetes com pobre controle glicêmico têm maior probabilidade de desenvolver dislipidemia, porque altas concentrações de ácidos graxos livres em pacientes diabéticos são um fator que leva à diminuição da sensibilidade à insulina e ao aumento da produção de lipídeos (BARBOSA, 2017).

Pacientes com DM2 têm, em média, risco duas a quatro vezes maior de desenvolver doença coronariana que indivíduos sem diabetes (SARWAR *et al.*, 2010). O DM2 também é fator de risco para acidente vascular cerebral (AVC) isquêmico, insuficiência cardíaca (IC), doença arterial obstrutiva periférica (DAOP) e doença

microvascular, afetando significativamente a expectativa e a qualidade de vida. Pacientes com DM2 também têm aumento – de 1,5 a 3,6 vezes – do risco de mortalidade geral, estimando-se uma redução da expectativa de vida de 4 a 8 anos, em comparação com indivíduos sem diabetes (GU *et al.*, 1998). Pacientes com DM2 têm uma prevalência aumentada de anormalidades lipídicas, contribuindo para o alto risco de doença cardiovascular aterosclerótica (DCVA). Múltiplos ensaios clínicos demonstraram os efeitos benéficos da terapia com estatinas nos resultados da DCVA em indivíduos com e sem doença arterial coronariana (DAC) (BAIGENT *et al.*, 2005; MIHAYLOVA *et al.*, 2012). Análises de subgrupos de pacientes com diabetes em estudos maiores (COLLINS *et al.*, 2003; GOLDBERG *et al.*, 1998; PYÖRÄLÄ *et al.*, 1997; SEVER *et al.*, 2005; SHEPHERD *et al.*, 2006) e estudos em pacientes com diabetes (COLHOUN *et al.*, 2004; KNOPP *et al.*, 2006) mostraram prevenção primária e secundária significativa de eventos DCVA e morte por doença coronariana em pacientes com diabetes. Meta-análises, incluindo dados de mais de 18.000 pacientes com diabetes de 14 estudos randomizados de terapia com estatina (seguimento médio de 4,3 anos), demonstram uma redução proporcional de 9% na mortalidade por todas as causas e redução de 13% na mortalidade vascular para cada 1 mmol/L (39 mg/dL) redução do colesterol LDL (KEARNEY *et al.*, 2008). Desta forma a recomendação é que pacientes diabéticos entre 40 a 75 anos sem doença cardiovascular aterosclerótica, usar terapia com estatina de intensidade moderada, além da terapia de estilo de vida (ADA, 2022b).

Até há pouco tempo, considerava-se que pacientes com DM2 tinham risco coronariano similar ao de indivíduos com doença coronariana prévia, sem diabetes. Essa percepção devia-se ao estudo de Haffner e colaboradores (1998) sobre uma coorte finlandesa de risco muito alto (BERTOLUCI; ROCHA, 2017). Em função disso, essa classificação de risco foi adotada pelo *National Cholesterol Education Program/Adult Treatment Panel III* (NCEP/ATP-III), em 2001. Posteriormente, metanálise incluindo diversos estudos em populações etnicamente variadas mostrou haver grande heterogeneidade no risco coronariano em pacientes com DM2, indicando a existência de subgrupos de pacientes de menor risco. Dessa forma, passou a ser necessário estratificar o risco cardiovascular de pacientes com diabetes mellitus (DM), tanto tipo 2 como tipo 1, de maneira a evitar o subtratamento de pacientes de maior risco ou o tratamento exacerbado de pacientes de menor risco. E as metas para as concentrações de LDL-C vão depender da categoria de risco (risco

baixo e intermediário <100 mg/dL; risco alto <70 mg/dL e risco muito alto <50 mg/dL) (SBD, 2019).

Para o perfil lipídico as concentrações de colesterol total, LDL-colesterol (LDL-C) e triglicérides não apresentaram diferenças significativas comparadas aos grupos DM2 com o grupo controle e em relação aos grupos separados por IMC. As concentrações de HDL-colesterol (HDL-C) apresentaram diferenças significativas quando comparadas aos grupos DM2 e controle pareadas por IMC (P<0,001). Os valores obtidos das medianas destas concentrações para o grupo DM2 foi inferior ao do grupo controle. A baixa concentração de HLD-C no grupo DM2 também foi observada em um estudo, onde não houve diferença entre as concentrações de colesterol total, enquanto as concentrações de HDL-C foram marcadamente reduzidas em mulheres com DM em comparação com controle não diabéticos (MOORADIAN, 2009). Inclusive a recomendação é intensificar a terapia de estilo de vida e otimizar o controle glicêmico para pacientes com concentrações elevadas de triglicerídeos (>150 mg/dL [1,7 mmol/L]) e/ou colesterol HDL baixo (<40 mg/dL [1,0 mmol/L] para homens, <50 mg/ dL [1,3 mmol/L] para mulheres) (ADA, 2022b).

4.2.3 Biomarcadores de função renal

Os marcadores endógenos extensamente usados para avaliação da filtração glomerular e consequentemente da função renal são a ureia e a creatinina. A principal utilidade clínica da dosagens destes biomarcadores consiste em analisar ambos marcadores, pois concentrações elevadas podem estar relacionados à diminuição da taxa de filtração glomerular e função tubular, e um quadro de insuficiência renal (PRATES *et al.*, 2007). A perda progressiva da função renal em pacientes diabéticos ocorre como o resultado do mau controle glicêmico e por consequência surgem as complicações vasculares como a nefropatia diabética que se apresenta como um quadro crônico de alta prevalência e mortalidade afetando a sobrevida desses pacientes (MORUSSI *et al.*, 2003). As concentrações de creatinina e ureia foram significativamente maiores nos pacientes com DM2 em comparação ao grupo CTRL, contudo as concentrações de ureia e de creatinina ainda estão dentro dos intervalos de referência para ureia (15 – 44 mg/dL) e creatinina (0,26-0,81 mg/dL).

4.2.4 Biomarcadores de perfil nutricional

Os marcadores de perfil nutricional, albumina e proteínas totais, tiveram suas concentrações plasmáticas significativamente maiores nos grupos diabéticos em relação ao grupo controle. A determinação das proteínas totais e da albumina sérica é um importante parâmetro bioquímico para avaliação de estado nutricional e da presença de doenças sistêmicas agudas ou crônicas, no processo inflamatório e índice de prognóstico para várias doenças (CABRAL, 2001). A mediana do grupo DM2 para albumina de 4,17 g/dL e do grupo CTRL de 3,88 g/dL se encontram dentro do intervalo de referência (2,9 - 4,7 g/dL) não evidenciando alterações patológicas ou metabólicas relacionadas a estes biomarcadores. A mediana das concentrações de proteínas totais 8,36 g/dL se encontra um pouco elevada em comparação com os valores de referência, o que pode sugerir um processo inflamatório como o que ocorre no curso do diabetes tipo 2 (ESSER *et al.*, 2014; PRADHAN *et al.*, 2001).

4.2.5 Biomarcadores de função hepática

As concentrações de alanina amino transferase (ALT) foram significativamente menores no grupo DM2 em relação ao grupo CTRL, enquanto as concentrações de aspartato amino transferase (AST) e gama glutamil transpeptidase (γ-GT) não apresentaram diferenças entre os grupos. As aminotransferases são consideradas indicadores de função hepatocelular, enquanto a (γ-GT) também reflete a função do trato biliar. A ALT é encontrada principalmente no fígado. A AST e γ-GT também são encontradas em outros tecidos portanto, são marcadores menos específicos da função hepática. Vários estudos sugerem que a função hepatocelular anormal está associada à obesidade, resistência à insulina e DM2. As atividades elevadas das enzimas hepáticas, incluindo ALT e γ-GT estão associadas ao desenvolvimento futuro de diabetes (SATTAR *et al.*, 2004; VOZAROVA *et al.*, 2002). Embora tenha sido encontrado diferença significativa entre a atividade da enzima hepática ALT entre os grupos do estudo, a mediana desta atividade está dentro do intervalo de referência, não sugerindo lesão hepática.

4.2.6 Biomarcadores séricos VEGFR e sVEGFR-2

A expressão normal do VEGF-A é necessária para manter a homeostase estrutural e funcional das ilhotas pancreáticas, mas o aumento na sua expressão contribui para a lesão das células β, falha microvascular e consequente diabetes (AGUDO *et al.*, 2012). Em um estudo anterior de Nandy e colaboradores observou-se que as concentrações séricas de VEGF-A aumentaram significativamente em pessoas com diabetes quando comparados ao grupo controle saudável, e houve uma correlação óbvia entre as concentrações séricas de VEGF-A com nefropatia diabética e retinopatia diabética (NANDY *et al.*, 2010). Em nosso estudo não houve diferença significativa na concentração de VEGF-A sérica entre o grupo DM2 e CTRL (TABELA 3) em concordância com o estudo de Kim e colaboradores (2009) e Ciastek e colaboradores onde as concentrações de VEGF-A e seu receptor 2 em pacientes com diabetes bem controlado são comparáveis às de indivíduos saudáveis, o que pode indicar que o controle adequado dos níveis de glicose retarda a ocorrência de complicações vasculares (RUSZKOWSKA-CIASTEK *et al.*, 2014). Contudo, alguns estudos encontraram contrações maiores em paciente DM2 na população asiática (WASADA *et al.*, 1998). Também foi demonstrado que pacientes com DMG (DONG, 2019) e DM1 (CHIARELLI *et al.*, 2000) apresentavam maiores concentrações plasmáticas que o grupo controle.

TABELA 3 - CONCENTRAÇÕES SÉRICAS DOS BIOMARCADORES VEGF-A E SVEGFR-2 PARA OS GRUPOS CTRL E DM2

	n	CONTROLE	n	DM2	P
VEGF-A	106	61,5 (40,2 - 168,6)	60	74,8 (32 - 168,6)	0,705
sVEGFR-2	106	12127 (10198 - 1607)	30	13133 (11121 - 15727)	0,548

Os resultados estão apresentados como mediana (intervalo interquartil) pois as variáveis não possuem distribuição normal. P, probabilidade teste U de Mann-Whitney. P<0,05 destacado em negrito. VEGF-A apresentados em (pg/mL) e sVEGFR-2 em (pg/mL).
Fonte: o autor (2021).

Na população finlandesa as concentrações plasmáticas de VEGF-A também não foi associada com retinopatia diabética (KANGAS-KONTIO, TIIA *et al.*, 2009). A severidade da retinopatia (AWATA *et al.*, 2002; CHIARELLI *et al.*, 2000; KIM, H. W. *et al.*, 2009) e nefropatia (CHIARELLI *et al.*, 2000) foram associadas a um aumento acentuado das concentrações de VEGF-A.

TABELA 4 - CONCENTRAÇÕES SÉRICAS DOS BIOMARCADORES VEGF-A E SVEGFR-2 DESCRITOS NA LITERATURA.

Grupo étnico	Grupos	N	VEGF-A (pg/mL)	sVEGFR-2 (pg/mL)
Brasileiros Presente estudo	DM2	134	74,8 (32-168,6)	13133 (11121-15727)
	Controle	134	61,5 (40,2-168,6)	12127 (10198-1607)
Americana (NANDY *et al.*, 2010)	DM2	08	42,1±4,0	119,4±4,9 44
	Controle	11	29,4±3,8	58,9±3,2
	IGJ	15	24,2±0,9	56,7±1,2
Caucasianos (WIECZÓR *et al.*, 2016)	PAD	46	76,3±103,6	8329,0±2658,5
	Controle	30	18,0±7,7	14 481,5±3669,9
Finlandesa (KANGAS-KONTIO, TIIA *e al.*, 2009)	RD	131	145,0 ±104,5	ND
	Controle	526	ND	ND
Poloneses (RUSZKOWSKA-CIASTEK *al.*, 2014)	DM2	31	11,15(7,22 – 17,06)	12794,22±2411,12
	Controle	30	12.13(9,18 – 16,07)	13625,84±2397,41

IGJ: intolerância a glicemia de jejum; AMD: Degeneração Macular Idade; RD: retinopatia diabética; PAD: doença arterial periférica; arterial ND: não determinado

Fonte: O autor(2022)

Os mecanismos específicos que levam a concentrações mais elevadas de VEGF-A no diabetes e suas complicações vasculares ainda não estão totalmente elucidados. Estudos disponíveis sugerem que o receptor do fator de crescimento endotelial vascular solúvel (sVEGFR-2) pode ser considerado um inibidor angiogênico. Estudos de Liu e colaboradores (2014) indicaram que sVEGFR-2 ao formar complexos com VEGF-A, diminui a disponibilidade do VEGF-A para os receptores endoteliais, afetando assim uma diminuição da atividade biológica de VEGF-A (LIU, W. *et al.*, 2014). Podem ser encontradas concentrações plasmáticas mais elevadas de VEGF-A em pacientes com aterosclerose e diabéticos, causados por hipóxia tecidual (BOTTI *et al.*, 2012). No entanto, o papel de diferentes concentrações de sVEGFR-2 no processo de angiogênese ainda é desconhecido (WIECZÓR *et al.*, 2015).

O *splicing* alternativo do gene *VEGFA* leva a diferentes isoformas que foram propostas promover resultados de sinalização distintos (WOOLARD *et al.*, 2009). Desta forma, a existência de diferentes isoformas de VEGF-A e formas solúveis de seus receptores (sVEGFR-1 e sVEGFR-2) poderiam justificar os resultados divergentes em diferentes estudos.

Em um estudo conduzido na população de indianos(KAMAL SHARMA *et al.*, 2012) e um estudo em caucasianos (WIECZÓR *et al.*, 2016) foi verificado a associação do sVEGFR-2 com doenças coronarianas, em nosso estudo esta

associação também foi encontrada. Concentrações mais baixas de sVEGFR-2 foram encontradas em indivíduos que tinham diagnóstico de IAM (TABELA 5). Nas outras complicações microvasculares analisadas do diabetes não foi verificado associação.

TABELA 5 - VALORES DE SIGNIFICÂNCIA PARA AS CONCENTRAÇÕES SÉRICAS DOS BIOMARCADORES VEGF-A E SVEGFR-2 PARA AS COMPLICAÇÕES DIABÉTICAS DO GRUPO DM2

DM2	P			
	RETINOPATIA	NEFROPATIA	NEUROPATIA	IAM
VEGF	0,543	0,427	0,393	0,359
VEGFR-2	0,810	0,816	0,422	**0,034**

P, probabilidade teste U de Mann-Whitney. P<0,05 destacado em negrito.
Fonte: o autor (2021).

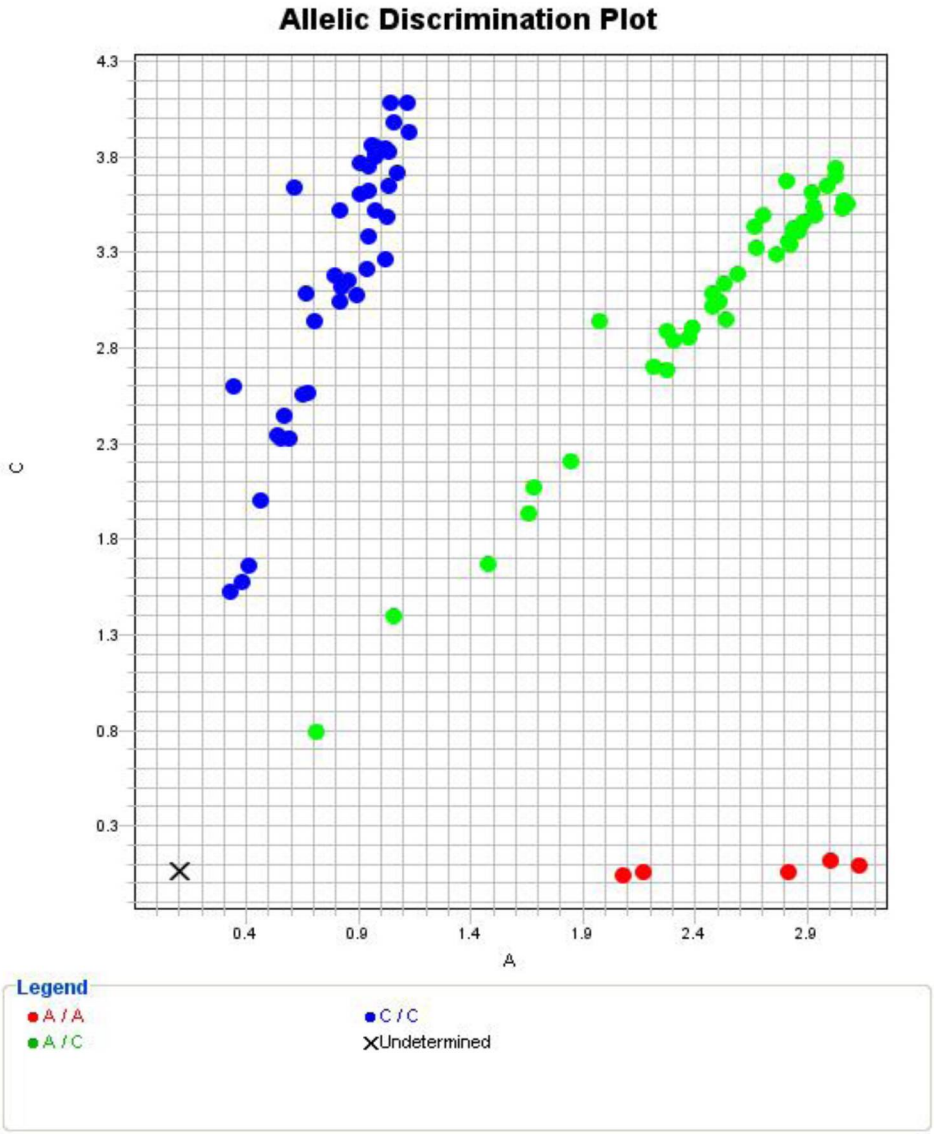
4.3 ANÁLISES MOLECULARES

As frequências genotípicas e alélicas dos genes *VEGFA* e *VEGFR2* para os polimorfismos nos grupos DM2 e CTRL com e sem subclassificação por IMC se apresentaram dentro do equilíbrio de *Hardy-Weinberg* (HWE; P>0,05) (TABELA 6, 7 e 8), evidenciando, ausência de migração, mutação, seleção natural e acasalamento seletivo na população estudada, ou seja, as frequências genotípicas e alélicas permanecem constantes de uma geração à outra (WIGGINTON *et al.*, 2005). Desvios no equilíbrio de *Hardy-Weinberg* podem refletir problemas importantes, incluindo viés de seleção, estratificação populacional e erros de genotipagem (NAMIPASHAKI *et al.*, 2015).

4.3.1 Polimorfismo rs2146323 (+5092 C/A) do gene *VEGFA*

A genotipagem do polimorfismo rs2146323 foi realizada utilizando a PCR em tempo real com sondas fluorescentes específicas do sistema TaqMan®, como descrito em Materiais e Métodos. A FIGURA 16 apresenta o exemplo para a determinação do genótipo de 96 amostras.

FIGURA 16 - RESULTADO DE GENOTIPAGEM DO POLIMORFISMO rs2146323 (+5092 C/A) DO GENE VEGFA POR PCR EM TEMPO REAL



Determinação dos genótipos do polimorfismo rs2146323(C/A) por PCR em tempo real no ensaio de uma placa de 96 poços. Em azul os indivíduos com genótipo homozigoto CC; em verde, os heterozigotos CA e, em vermelho, os homozigotos raros AA. O X em preto é o controle negativo.
Fonte: O autor (2021).

As frequências genotípicas e alélicas e as comparações entre os grupos para o polimorfismo rs2146323 estão apresentados na TABELA 6.

Não houve diferença das frequências genotípicas e alélicas nos grupos CTRL e DM2, independente do pareamento por IMC, ou seja, o polimorfismo rs2146323 não foi associado ao DM2 neste estudo (TABELA 6). Dong (2019) mostrou que portadoras dos genótipos rs2146323 AA, CA+AA e alelo A mostraram o risco aumentado de DGM ($P < 0,05$).

TABELA 6 - FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS DO POLIMORFISMO rs2146323 (+5092 C/A) DO GENE VEGFA

POLIMORFISMO		CONTROLE			DM2			CONTROLE X DM2		
		CTRL (n=134)	IMC NORMAL (n=70)	IMC >=30 (n=64)	DM2 (n=134)	IMC NORMAL (n=70)	IMC >=30 (n=64)	P	P IMC NORMAL	P IMC >=30
rs2146323	C/C	63(47)	27(38,6)	36(56,2)	63(47)	31(44,3)	32(50)			
C>A	C/A	56(41,8)	34(48,6)	22(34,4)	61(45,5)	31(44,3)	30(46,9)	0,545	0,789	0,177
VEGF	A/A	15(11,2)	9(12,9)	6(9,4)	10(7,5)	8(11,4)	2(3,1)			
MAF [95% CI]	A	32,1[27 - 38]	37,1[29-45]	26,6[19-34]	30,2 [25 - 36]	33,6[26-41]	26,6[19-34]	0,641	0,532	1,000
Dominante	CC vs CA + AA	63/71	27/43	36/28	63/71	31/39	32/32	1,000	0,492	0,479
Recessivo	AA vs CC + CA	15/119	9/61	6/58	10/124	8/62	2/62	0,294	0,796	0,273
H-W		0,6339	0,7400	0,3400	0,3587	0,9500	0,1000			

LEGENDA: Valores dos genótipos do controle e DM2 são n(%); P, probabilidade, teste de Chi-quadrado; H-W, equilibrio de Hardy-Weinberg(teste do Chi-quadrado);[95% IC] , intervalo de confiança de 95% ;P<0,05 é considerado significativo.

Fonte : o autor(2021).

TABELA 7 - FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS DO POLIMORFISMO rs3025039 (+936 C/T) DO GENE VEGFA

POLIMORFISMO		CONTROLE			DM2			CONTROLE X DM2		
		CTRL (n=134)	IMC NORMAL (n=70)	IMC >=30 (n=64)	DM2 (n=134)	IMC NORMAL (n=70)	IMC >=30 (n=64)	P	P IMC NORMAL	P IMC >=30
rs3025039	C/C	99(73,9)	51(72,9)	48(75)	104(77,6)	55(78,6)	49(76,6)			
C>T	C/T	33(24,6)	18(25,7)	15(23,4)	30(22,4)	15(21,4)	15(23,4)	0,322	0,491	0,603
VEGF	T/T	2(1,5)	1(1,4)	1(1,6)	0	0	0			
MAF [95% CI]	T	13,8 [10 - 18]	14,3[8 -20]	13,3[7-19]	11,2 [7 - 15]	10,7[6-16]	11,7[6-17]	0,361	0,366	0,705
Dominante	CC vs CT + TT	99/35	51/19	48/16	104/30	55/15	49/15	0,476	0,430	0,836
Recessivo	TT vs CC + CT	2/132	1/69	1/63	0/134	0/70	0/64	0,478	1,000	1,000
H-W		0,6875	0,6757	0,8887	0,1445	0,3154	0,2883			

LEGENDA: Valores dos genótipos do controle e DM2 são n(%); P, probabilidade, teste de Chi-quadrado; H-W, equilibrio de Hardy-Weinberg(teste do Chi-quadrado);[95% IC] , intervalo de confiança de 95% ;P<0,05 é considerado significativo.

Fonte : o autor(2021).

TABELA 8 - FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS DO POLIMORFISMO rs2305948 (+1192 C/T) DO GENE VEGFR2

POLIMORFISMO		CONTROLE			DM2			CONTROLE X DM2		
		CTRL (n=134)	IMC NORMAL (n=70)	IMC >=30 (n=64)	DM2 (n=134)	IMC NORMAL (n=70)	IMC >=30 (n=64)	P	P IMC NORMAL	P IMC >=30
rs2305948	C/C	98(73,1)	56(80)	42(65,6)	110(82,1)	57(81,4)	53(82,8)			
C>T	C/T	34(25,4)	13(18,6)	21(32,8)	22(16,4)	12(17,2)	10(15,6)	0,196	0,976	0,075
VEGFR-2	T/T	2(1,5)	1(1,4)	1(1,6)	2(1,5)	1(1,4)	1(1,6)			
MAF [95% CI]	T	14,2 [10 - 18]	10,7[6-16]	18[11-25]	9,7 [6 - 13]	10[5-15]	9,4[4-14]	0,110	0,845	0,045
Dominante	CC vs CT + TT	98/36	56/14	42/22	110/24	57/13	53/11	0,079	0,830	0,026
Recessivo	TT vs CC + CT	2/132	1/69	1/63	2/132	1/69	1/63	1,000	1,000	1,000
H-W		0,6222	0,8061	0,3658	0,4663	0,6903	0,5198			

LEGENDA: Valores dos genótipos do controle e DM2 são n(%); P, probabilidade, teste de Chi-quadrado; H-W, equilibrio de Hardy-Weinberg(teste do Chi-quadrado);[95% IC] , intervalo de confiança de 95% ;P<0,05 é considerado significativo.

Fonte : o autor(2021).

Um estudo de Nakanishi e colaboradores mostrou que o alelo T constitui fator de risco para a retinopatia diabética e uma meta análise conduzida por Yuqing Liu e colaboradores associou o mesmo alelo T com o risco para degeneração macular (LIU, Y. *et al.*, 2014; NAKANISHI; WATANABE, 2009). Foi mostrado em uma meta-análise que VEGF 5092 (6112)A/C (rs2146323) protege contra RD em todas as populações asiáticas. No entanto, uma associação significativa foi observada entre rs2146323 e um risco aumentado de RD em caucasianos. Além disso, diferentes origens genéticas, tamanho da amostra, viés de medição e outros fatores ambientais podem contribuir. Uma mistura de diferentes variáveis em cada estudo tem um grande impacto na distribuição agrupada de cada genótipo, o que pode ser um elemento importante sobre os resultados finais em todas as populações. Da mesma forma, seu papel na patogênese da RD precisaria ser mais explorado (YANG *et al.*, 2020).

Em nosso estudo o polimorfismo rs2146323 não apresentou associação com a retinopatia, nefropatia, neuropatia e infarto agudo do miocárdio, em concordância com estudos conduzidos na população caucasoide que não encontraram associação com a retinopatia (ABHARY, S. *et al.*, 2009; KANGAS-KONTIO, TIIA *et al.*, 2009). As frequências genotípicas e alélicas do polimorfismo rs2146323 em comparação com as complicações diabéticas está apresentada na TABELA 9.

A frequência do alelo A observado para o grupo controle (30,2%) e para o grupo DM2 (31,1%) foram semelhantes às descritas para as populações de alemães (ZARBOCK *et al.*, 2009), americanos (LIZANO *et al.*, 2018) e caucasoides (ABHARY, SOTOODEH *et al.*, 2009), porém foram superiores e inferiores as descritas para as populações turca (BULGU *et al.*, 2014) e chinesa (DONG, 2019), respectivamente (TABELA 12).

TABELA 9 - FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS DO POLIMORFISMO rs2146323 EM COMPARAÇÃO COM AS COMPLICAÇÕES DIABÉTICAS

POLIMORFISMO		SEM RET	RET	P	SEM NEU	NEU	P	SEM NEFRO	NEFRO	P	SEM IAM	IAM	P
		n=109	n=25		n=125	n=9		n=125	n=9		n=125	n=9	
rs2146323	C/C	52(47,7)	11(44)		60(48)	3(33,3)		58(47,7)	5(55,5)		59(47,2)	4(44,4)	
C>A	C/A	51(46,8)	10(40)	0,195	57(45,6)	4(44,4)	0,202	58(46,8)	3(33,3)	0,727	57(45,6)	4(44,4)	0,910
VEGF	A/A	6(5,5)	4(16)		8(6,4)	2(22,3)		9(5,5)	1(11,2)		9(7,2)	1(11,2)	
MAF [95% CI]	A	28,9[23 - 35]	36[23 - 49]	0,324	29,2[24 - 35]	44,4[21 - 67]	0,174	30,4[25 - 36]	27,8[7 - 48]	0,815	30[24 - 36]	33,3[12 - 55]	0,766
Dominante	CC vs CA + AA	52/57	11/14	0,456	60/65	3/6	0,309	58/67	5/4	0,424	59/66	4/5	0,574
Recessivo	AA vs CC + CA	6/103	4/21	0,09	8/117	2/7	0,136	9/116	1/8	0,513	9/116	1/8	0,513

Valores dos genótipos de DM2 com e sem as complicações diabeticas)retinopatia, neuropatia, nefropatia e infato agudo do miocárdio. n(%); P, probabilidade, teste de Chi-quadrado; [95% IC] , intervalo de confiança de 95% ;P<0,05 é considerado significativo. Fonte: o autor (2022)

TABELA 10 - FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS DO POLIMORFISMO rs3025039 EM COMPARAÇÃO COM AS COMPLICAÇÕES DIABÉTICAS

POLIMORFISMO		SEM RET	RET	P	SEM NEU	NEU	P	SEM NEFRO	NEFRO	P	SEM IAM	IAM	P
		n=109	n=25		n=125	n=9		n=125	n=9		n=125	n=9	
rs3025039	C/C	86(78,9)	18(72)		96(76,8)	8(88,9)		97(77,6)	7(77,8)		96(76,8)	8(88,9)	
C>T	C/T	23(21,1)	7(28)	0,486	29(23,2)	1(11,1)	0,359	28(22,4)	2(22,2)	0,676	29(23,2)	1(11,1)	0,359
VEGF	T/T	0	0		0	0		0	0		0	0	
MAF [95% CI]	T	10,5(6 - 15]	14[4 - 24]	0,485	11,6[8 - 16]	5,56 [5 - 16]	0,432	11,2[7 - 15]	11,1[3 - 26]	0,991	11,6[8 - 16]	5,56 [5 - 16]	0,432
Dominante	CC vs CT + TT	86/23	18/7	0,307	96/29	8/1	0,359	97/28	7/2	0,659	96/29	8/1	0,359
Recessivo	TT vs CC + CT	0/109	0/25	-	0/125	0/9	-	0/125	0/9	-	0/125	0/9	-

Valores dos genótipos de DM2 com e sem as complicações diabeticas)retinopatia, neuropatia, nefropatia e infato agudo do miocárdio. n(%); P, probabilidade, teste de Chi-quadrado; [95% IC] , intervalo de confiança de 95% ;P<0,05 é considerado significativo. Fonte: o autor (2022)

TABELA 11 - FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS DO POLIMORFISMO rs2305948 EM COMPARAÇÃO COM AS COMPLICAÇÕES DIABÉTICAS

POLIMORFISMO		SEM RET	RET	P	SEM NEU	NEU	P	SEM NEFRO	NEFRO	P	SEM IAM	IAM	P
		n=109	n=25		n=125	n=9		n=125	n=9		n=125	n=9	
rs2305948	C/C	91(83,5)	19(76)		103(82,4)	7(77,8)		102(81,6)	8(88,9)		102(81,6)	8(88,9)	
C>T	C/T	16(14,7)	6(24)	0,433	20(16)	2(22,2)	0,934	21(16,8)	1(1,1)	0,834	21(16,8)	1(1,1)	0,834
VEGFR-2	T/T	2(1,8)	0		2(1,6)	0		2(1,6)	0		2(1,6)	0	
MAF [95% CI]	T	9,2[5 -13]	12[3 - 21]	0,543	9,6[6 - 13]	11.1[3 -26]	0,834	10[6 - 14]	5,6[5 - 16]	0,538	10[6 - 14]	5,6[5 - 16]	0,538
Dominante	CC vs CT + TT	91/18	19/6	0,269	103/22	7/2	0,504	102/23	8/1	0,496	102/23	8/1	0,496
Recessivo	TT vs CC + CT	2/107	0/25	0,661	2/123	0/9	0,869	2/123	0/9	0,869	2/123	0/9	0,869

Valores dos genótipos de DM2 com e sem as complicações diabeticas)retinopatia, neuropatia, nefropatia e infato agudo do miocárdio. n(%); P, probabilidade, teste de Chi-quadrado; [95% IC] , intervalo de confiança de 95% ;P<0,05 é considerado significativo. Fonte: o autor (2022)

TABELA 12 - COMPARAÇÃO DAS FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS DO POLIMORFISMO rs2146323 DO GENE VEGFA COM DADOS DA LITERATURA

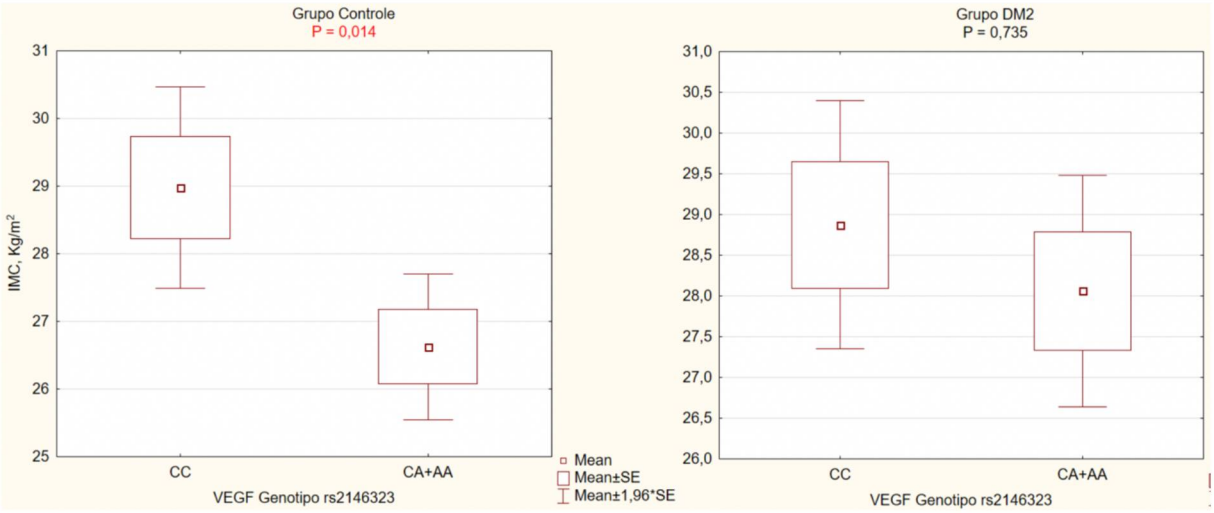
***VEGFA* – rs2146323**		**Genótipo (%)**				**Alelo MAF (%)**
Grupo étnico	**Características**	**N**	**CC**	**CA**	**AA**	**A**
Brasileiros Presente estudo	DM2	134	47	45,5	7,5	30,2
	Controle	134	47	41,8	11,2	32,1
Finlandeses (KANGAS-KONTIO, T. *et al.*, 2009)	DM	97	40	44	13	36
	Controle	507	37	48	15	39
Chineses (YANG *et al.*, 2011)	Retinopatia	128	52,3	35,9	11,7	29,7
	Controle	138	63,8	30,4	5,8	21,0
Caucasianos (ABHARY, SOTOODEH *et al.*, 2009)	Retinopatia	182	39	50	10	31,9
	Controle	137	47	43	10	35,4
Caucasianos (CHURCHILL *et al.*, 2008)	Retinopatia	45	42,2	57,8	0	39,3
	Controle	61	42,6	36,1	21,3	28,9
Turcos (BULGU *et al.*, 2014)	AMD	43	27,9	27,9	44,2	58,1
	Controle	80	36,3	25,0	38,7	51,3
Chineses (DONG, 2019)	DMG	239	53,6	36,0	10,4	28,5
	Controle	275	63,3	30,5	6,2	21,5
Finlandeses (IMMONEN *et al.*, 2010)	AMD	162	47	38	15	34
	Controle	85	34	51	15	41
Turcos (KEPEZ YILDIZ *et al.*, 2016)	AMD	109	36,7	53,2	10,1	36,7
	Controle	70	42,9	50,0	7,1	32,1
Americanos (LIZANO *et al.*, 2018)	PROBANDS	479	51	38	11	30,3
	Controle	165	40	54	6	33,1
Alemães (ZARBOCK *et al.*, 2009)	PXE	326	45,4	33,13	21,47	31,6
	Controle	326	41,7	33,45	24,85	37,7

MAF, alelo menos frequente; AMD, degeneração macular da retina; PROBANDS, desordens psicóticas; PXE, pseudoxantoma elástico.
Fonte: O autor (2021)

MAF, alelo menos frequente; AMD, degeneração macular da retina; PROBANDS, desordens psicóticas; PXE, pseudoxantoma elástico.
Fonte: O autor (2021)

Em relação a associação com os biomarcadores e dados antropométricos foi verificado que os indivíduos do grupo controle portadores do genótipo CC apresentaram maior IMC em relação aos indivíduos portadores do genótipo CA ou AA. Contudo, esta associação não foi detectada no grupo DM2 (FIGURA 17).

FIGURA 17 - EFEITO ENTRE GENÓTIPOS DE VEGFA rs2146323 SOBRE O ÍNDICE DE MASSA CORPÓREA (IMC)



Os resultados são apresentados como média e desvio padrão para IMC e para grupo controle (**P=0,014**) e para DM2 (P=0,735). Analisado pelo teste t (bidirecional) os genótipos CC comparados com CA+AA foi significativo a diferença entre IMC para o grupo Controle (**P=0,0014**). As demais comparações apresentaram P>0,05.
Fonte: O autor, 2022.

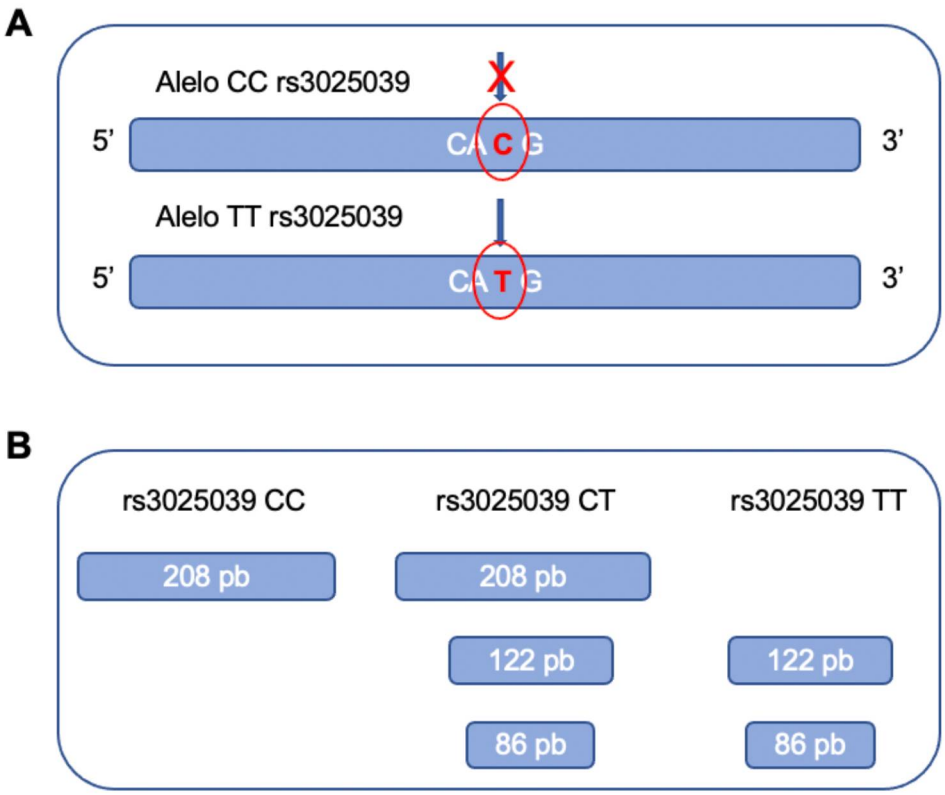
As concentrações plasmáticas de VEGF-A foram associadas ao IMC e que este efeito dependia do sexo, foi observado um efeito significativo do IMC em mulheres, mas não em homens. No entanto, a interação entre IMC e gênero não foi estatisticamente significativo (ELFVING *et al.*, 2014).

De forma divergente ao nosso estudo, o genótipo CA+AA do polimorfismo rs2146323 e o IMC foram associados ao risco para o DMG de forma independente (DONG, 2019). Neste mesmo estudo o polimorfismo rs2146323 e as concentrações plasmáticas de VEGF-A foram associados ao risco para o DMG.

4.3.2 Polimorfismo rs3025039 (+936 C/T) do gene *VEGFA*

A genotipagem do polimorfismo rs3025039 no gene *VEGFA* foi realizada através da técnica de PCR-RFLP como descrita em Materiais e Métodos, onde o fragmento de 208 pb foi tratado com a enzima de restrição NlaIII. A enzima reconhece a sequência CATG, desta forma só haverá restrição dos fragmentos de indivíduos portadores do alelo T. Não haverá restrição dos fragmentos de indivíduos portadores do alelo C. A FIGURA 18 e 19 mostram o perfil de restrição esperado e o perfil eletroforético para os diferentes genótipos do polimorfismo rs3025039 após tratamento com a enzina de restrição dos amplicons de 208 pb, respectivamente.

FIGURA 18 - PERFIL DE RESTRIÇÃO OBTIDO PELO TRATAMENTO DO FRAGMENTO AMPLIFICADO COM A ENZIMA NIAIII PARA O POLIMORFISMO rs3025039 DO GENE VEGFA

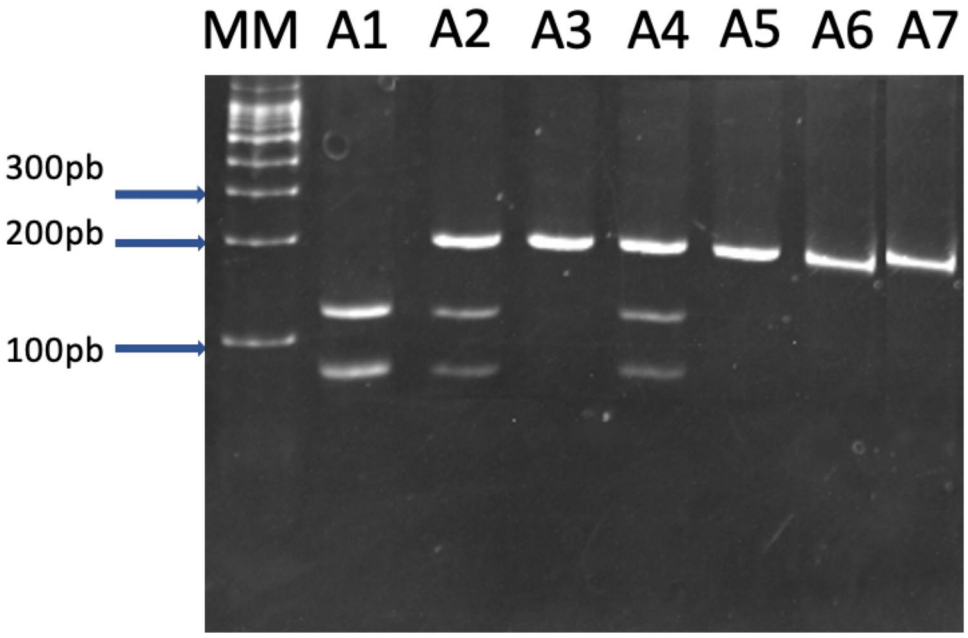


Painel A. mapa de restrição do produto de PCR (208 pb) do gene *VEGFA*. As setas indicam o sítio de restrição reconhecido pela enzima. O "X" indica a ausência deste sítio na presença do alelo rs2025039C e, consequentemente, falta completa no reconhecimento e subsequente clivagem, não alterando o fragmento inicial com 208 pares de base. Na presença do alelo T, há reconhecimento e clivagem pela enzima, gerando fragmentos de 122 e 86 pares de base. **Painel B.** Fragmentos esperados para os genótipos do polimorfismo rs3025039 C>T do gene *VEGFA*. Genótipo CC = 208 pb, CT = 208 pb + 122 pb + 86 pb e TT = 122 pb + 86 pb.
Fonte: O autor (2021).

A TABELA 7 exibe os resultados das frequências genotípicas e alélicas do polimorfismo rs3025039 para os grupos em estudo. As frequências genotípicas e alélicas não se diferenciaram entre os grupos CTRL e DM2 (P=0,322) e não houve diferença entre os grupos pareados com relação ao IMC ($P^{IMC<30}$ = 0,491 e $P^{IMC>30}$ = 0,603) não evidenciando associação do DM2 com este polimorfismo.

Este polimorfismo foi associado ao risco para o DM2 (POROJAN, M. D. *et al.*, 2015) na população caucasoide, e DMG (DONG, 2019) e síndrome metabólica (KIM; HONG, 2015) na população asiática.

FIGURA 19 - PERFIL ELETROFORÉTICO OBTIDO PELO TRATAMENTO DO FRAGMENTO AMPLIFICADO COM A ENZIMA NIAIII PARA O POLIMORFISMO rs3025039 DO GENE VEGFA



MM- Marcador de Massa Molecular de 100 pb; A1- Amostra Homozigoto TT (122 pb +86 pb); A2 e A4: Heterozigoto CT (208 pb +122 pb +86 pb); A3, A5 e A6: Homozigoto CC (208 pb); A7: Amostra com produto de PCR sem adição de enzima de restrição, controle sem corte. À esquerda da figura estão destacados os fragmentos de 300 pb, 200 pb e 100 pb do marcador de massa molecular.
Fonte: O autor (2021).

Estudos de meta-análise mostraram associação deste polimorfismo com a retinopatia diabética em iranianos (KHODAEIAN *et al.*, 2015) e asiáticos (YANG *et al.*, 2020), porém em nosso estudo não observamos esta associação em concordância com meta-analise em população caucasoide (YANG *et al.*, 2020) e também não foi evidenciada a associação com as outras complicações diabéticas como a neuropatia, nefropatia e infarto agudo do miocárdio (TABELA 10).

Este polimorfismo também foi associado as contrações plasmáticas de VEGF-A (AWATA *et al.*, 2002; KIM, H. W. *et al.*, 2009; WATSON, C. J. *et al.*, 2000), contudo não encontramos esta associação.

A TABELA 13 apresenta as frequências genotípicas e alélicas de outras populações em comparação com este estudo. A frequência do alelo T nesse estudo para o grupo controle (13,8%, IC 95% 10-18) e DM2 (11,2% IC 95% 7-15) é semelhante ao das populações alemã (GALAN *et al.*, 2010), finlandesa (KANGAS-KONTIO, T. *et al.*, 2009) e polonesa (SZCZEPAŃSKA *et al.*, 2015) porém inferior a chinesa (DONG, 2019).

TABELA 13 - COMPARAÇÃO DAS FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS DO POLIMORFISMO rs3025039 DO GENE VEGFA COM DADOS DA LITERATURA

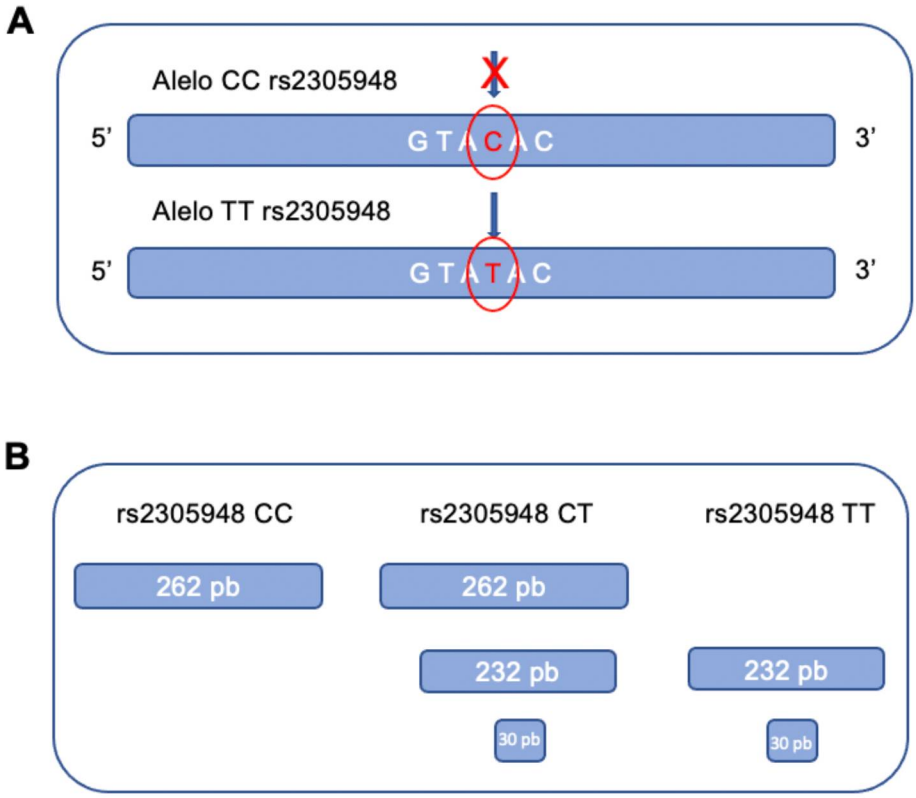
***VEGFA* - rs3025039**		**Genótipo (%)**				**Alelo MAF (%)**
Grupo étnico	**Características**	**N**	**CC**	**CT**	**TT**	**T**
Brasileiros Presente estudo	DM2	134	77,6	22,4	0	11,2
	Controle	134	73,9	24,6	1,5	13,8
Chineses (LIN *et al.*, 2008)	AMD	104	72	26	2	15
	Controle	180	75	23	2	14
Alemães (GALAN *et al.*, 2010)	AMD	226	77	21	2	12
	Controle	248	77	22	1	13
Coreanos (KIM, H. *et al.*, 2009)	DM2	238	68,9	27,8	3,3	17,2
	Controle	408	71,0	29,0	0	14,5
Coreanos (KIM *et al.*, 2011)	AVC	615	62,0	34,7	3,3	20,7
	Controle	494	69,6	27,6	2,8	16,5
Finlandeses (KANGAS-KONTIO, T. *et al.*, 2009)	DM	98	75	22	3	14
	Controle	526	70	28	2	16
Indianos (UTHRA *et al.*, 2008)	DM2 com RD	130	85,4	14,6	0	7,3
	Controle	82	79,3	20,7	0	10,4
Poloneses (SZCZEPAŃSKA *et al.*, 2015)	Endometriose	153	76	22	2	13
	Controle	384	68	30	2	17
Brasileiros (GONÇALVES *et al.*, 2015)	AMD	88	78,4	21,6	0	11
	Controle	95	80,0	20,0	0	10
Gregos (PAPAZOGLOU *et al.*, 2005)	RSA	52	67,3	30,7	1,9	17,3
	Controle	82	78,0	20,7	1,2	11,6
Caucasianos (POROJAN, MIHAI DUMITRU *et al.*, 2015)	DM2	200	59,0	30,0	11,0	16,0
	Controle	208	78,85	18,3	2,9	12,0
Chineses (DONG, 2019)	DMG	239	46,0	47,7	6,3	30,1
	Controle	275	64,4	34,2	1,4	18,5

MAF, alelo menos frequente; AMD, degeneração macular da retina; AVC, acidente vascular cerebral; RSA, abortos espontâneos recorrentes.
Fonte: O autor (2021).

4.3.3 Polimorfismo rs2305948 (+1192 C/T) do gene *VEGFR2*

A genotipagem do polimorfismo rs2305948 no gene *VEGFR2* foi realizada através da técnica de PCR-RFLP como descrita em Materiais e Métodos, onde o fragmento de 262 pb foi tratado com a enzima de restrição BstZ17I. A enzima reconhece a sequência GTATAC, havendo restrição apenas na presença do alelo T como descrito na FIGURA 20.

FIGURA 20 - PERFIL DE RESTRIÇÃO OBTIDO PELO TRATAMENTO DO FRAGMENTO AMPLIFICADO COM A ENZIMA BSTZ17I PARA O POLIMORFISMO rs2305948 DO GENE VEGFR2



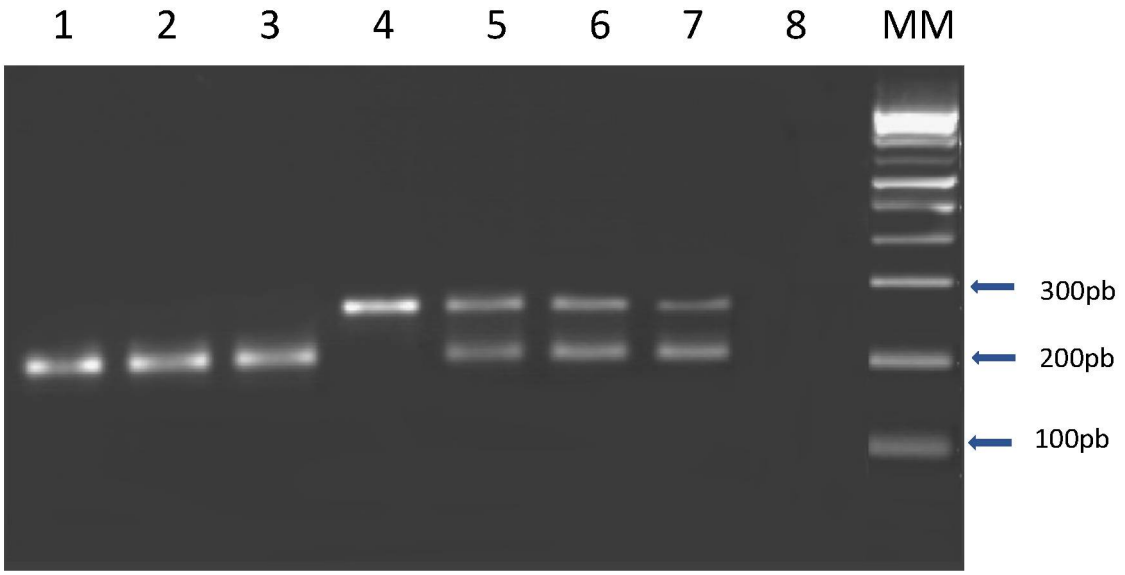
Painel A. mapa de restrição do produto de PCR (262 pb) do gene *VEGFR2*. As setas indicam o sítio de restrição reconhecido pela enzima. O "X" indica a ausência deste sítio na presença do alelo rs2305948C e, consequentemente, falta completa no reconhecimento e subsequente clivagem, não alterando o fragmento inicial com 262 pares de base. Na presença do alelo T, há reconhecimento e clivagem pela enzima, gerando fragmentos de 232 pares de base e de 30 pares de base. **Painel B.** fragmentos esperados para os genótipos do polimorfismo rs2305948 C>T do gene *VEGFR2*. Genótipo CC = 262 pb, CT = 262 pb + 232 pb + 30 pb e TT = 232 pb + 30 pb.
Fonte: O autor (2021).

A FIGURA 21 apresenta o perfil eletroforético dos fragmentos encontrados após o tratamento com a enzima de restrição.

A TABELA 8 exibe os resultados das frequências genotípicas e alélicas do polimorfismo rs2305948 dos grupos em estudo. As frequências alélicas (P=0,196) e genotípicas (P=0,110) nos modelos dominante (P=0,079) e recessivo (P=1,000), não apresentou diferença significativa entre os grupos estudados. Não havendo, portando, associação do polimorfismo rs2305948, na população estudada, ao risco ou proteção ao DM2.

A falta de associação com o DM2 do polimorfismo rs2305948 no nosso estudo está em concordância com a população Egípcia (ABDELGHANY *et al.*, 2021).

FIGURA 21 - PERFIL ELETROFORÉTICO OBTIDO PELO TRATAMENTO DO FRAGMENTO AMPLIFICADO COM A ENZIMA BSTZ17I PARA O POLIMORFISMO rs2305948 DO GENE VEGFR2



MM- Marcador de Massa Molecular de 100 pb; 1, 2 e 3 : Amostra Homozigoto TT (232 pb); 5, 6 e 7: Heterozigoto CT (262 pb + 232 pb); 4: Homozigoto CC (262 pb); À esquerda da figura estão destacados os fragmentos de 300 pb, 200 pb e 100 pb do marcador de massa molecular; 8 : Controle negativo. Fonte: O autor (2021).

Estudos recentes mostraram associações significativas entre vários polimorfismos do gene *VEGFR2* e doenças vasculares clínicas, como doença arterial coronariana(WANG *et al.*, 2007a), lesões de artéria coronária em pacientes com doença de Kawasaki (REF) e acidente vascular cerebral isquêmico (ZHANG *et al.*, 2012). Evidências encontradas nesses estudos sugerem que este polimorfismo pode estar associado com o risco de AVC e outras doenças vasculares cerebrais, pois o aumento da sinalização de VEGF-A agrava a aterosclerose por meio da neovascularização e da inflamação nas placas de ateroma. O aumento da densidade de micro vasos dentro da placa contribui para o crescimento e desestabilização da placa, resultando no estreitamento e oclusão de grandes artérias cerebrais (HAN *et al.*, 2012; QIU *et al.*, 2016).

Estudos pré-clínicos provaram que o alelo de menor frequência do polimorfismo rs2071559 (−604T>C) pode levar a diminuição da atividade de transcrição do *VEGFR2*, enquanto os alelos de menor frequência dos polimorfismos rs1870377 (+1719A>T) e rs2305948 (+1192G>A) foram associados com afinidade de ligação reduzida de VEGFR-2 (GAŁECKI *et al.*, 2013). Então teoricamente, é possível que essas variantes genéticas funcionais possam afetar a função biológica de VEGFR-2 e VEGF-A, em última análise, influenciar a suscetibilidade individual à

DCVA. Um estudo de meta-análise após análises estratificadas desses dados, mostraram que os resultados positivos foram principalmente impulsionados pelo subgrupo DAC, sugerindo que a magnitude dos efeitos do polimorfismo do *VEGFR2* na suscetibilidade individual à DAC e acidente vascular cerebral isquêmico (AVCI) pode ser um pouco diferente. No entanto, tendo em conta que as tendências de associações em DAC e AVCI foram semelhantes, e os tamanhos de amostra das análises combinadas sobre AVCI ainda eram relativamente pequenas (WANG *et al.*, 2019). E considerando que a etiologia da DCVA é muito complicada, consequentemente, recomenda-se fortemente futuros estudos para realizar análises de haplótipos e investigar potenciais interações gênicas de genes para explorar de forma mais abrangente os efeitos de genética na suscetibilidade à doença (NISHI *et al.*, 2016). Ainda, é importante ressaltar que a maioria dos estudos elegíveis pela meta-análise foram de países asiáticos, mas estudos de países caucasianos e africanos ainda são escassos (WANG *et al.*, 2019). Estudo realizado na população caucasoide não encontrou associação com infarto do miocárdio em pacientes com DM2 e nem com as concentrações plasmáticas de VEGF-A (KARIŽ; PETROVIČ, 2014) que estão de acordo com nosso estudo que não evidenciou associação do polimorfismo rs2305948 com as complicações diabéticas na população estudada (TABELA 11). Estas informações podem justificar a ausência de associação do polimorfismo rs2305948 com as complicações associadas ao DM2 e a importância da realização de estudos em outras populações, especialmente miscigenadas como a brasileira.

A frequência do alelo de menor frequência (T), no grupo controle do presente estudo foi de 14,2% (95%IC 10-18%) e do grupo DM2 foi de 9,7% (95%IC 6-13%), semelhante a frequência observada em outros estudos com população de austríacos (NOURI *et al.*, 2014), espanhóis (DURAN *et al.*, 2015) e chineses (WANG *et al.*, 2007a), e inferior em caucasianos (KARIŽ; PETROVIČ, 2014) e iranianos (SHAHSAVARI *et al.*, 2015) (TABELA 14).

Embora com os grandes avanços na compreensão dos determinantes genéticos, a elucidação dos mecanismos envolvidos no desenvolvimento do DM2 e suas complicações ainda não é bem compreendida. Considerando evidencias que VEGF-A aumenta a permeabilidade vascular contribuindo para o surgimento de complicações macro e microvasculares, e que concentrações elevadas de VEGF-A

são encontradas em indivíduos com complicações diabéticas, os resultados que não evidenciam nenhuma relação sugerem que a ligação entre o *VEGFA* e o DM2 e com suas complicações são mais complexos.

TABELA 14 - COMPARAÇÃO DAS FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS DO POLIMORFISMO rs2305948 DO GENE VEGFR2 COM DADOS DA LITERATURA

***VEGFR2* - rs2305948**		**Genótipo (%)**				**Alelo MAF (%)**
Grupo étnico	**Características**	**N**	**CC**	**CT**	**TT**	**T**
Brasileiros Presente estudo	DM2	134	73,1	25,4	1,5	14,2
	Controle	134	82,1	16,4	1,5	9,7
Austríacos (NOURI et al., 2014)	OHSS	116	56,9	38,8	4,3	13,4
	Controle	124	55,6	40,3	1,6	8,1
Chineses (LIU et al., 2016)	CHD	810	19	25	56	68,6
	Controle	805	25	39	36	55,3
Chineses (WANG et al., 2007)	CHD	665	78,3	20,5	1,2	11,4
	Controle	1015	82,7	16,4	1,0	9,2
Iranianos (SHAHSAVARI et al., 2015)	RSA	100	26	21	53	64
	Controle	100	21	23	56	68
Caucasianos (KARIŽ; PETROVIČ, 2014)	MI	171	40,9	43,9	15,2	37,1
	Controle	850	37,1	45,5	17,4	40
Coreanos (HAN et al., 2012)	SBI	383	80,2	18,5	1,3	10,6
	Controle	387	77,3	21,4	1,3	12,0
Gregos (MATALLIOTAKI et al., 2019)	Endometriose	162	85,2	14,2	0,6	7,72
	Controle	170	84,1	15,3	0,6	8,24
Italianos (SCARTOZZI et al., 2014)	HCC	148	85	13	2	9
	Controle	148	86	13	1	7
Espanhóis DURAN et al., 2015)	CCC	153	78,4	20,9	0,6	11,1
	Controle	582	83,7	15,1	1,2	8,76
Poloneses PARADOWSKA-GORYCKA et al., 2019)	RA	272	45,6	54,0	0,4	27,4
	Controle	289	70,9	28,8	0,3	14,7
Chineses (GAO et al., 2016)	Astrocitomas	157	58,0	29,3	12,7	27,4
	Controle	160	63,1	30	6,9	21,9

MAF, alelo menos frequente; OHSS, síndrome da hiperestimulação do ovário; CHD, doença arterial coronariana; RSA, abortos espontâneos recorrentes; MI, infarto do miocárdio; SBI, infarto cerebral silencioso; HCC, carcinoma hepatocelular; CCC, Circulação colateral coronariana; RA, artrite reumatoide.
Fonte: O autor (2021).

A análise das variantes genéticas auxilia na compreensão do mecanismo molecular do DM2, e esse conhecimento pode aproximar o desenvolvimento de estratégias eficazes de tratamento e prevenção. Portanto, enfatizamos a importância de novas pesquisas para confirmar os achados de nosso estudo.

Há evidências conflitantes para a associação de variantes no gene *VEGFA* com desenvolvimento da retinopatia, com variabilidade entre estudos incluindo etnia participante, desenho do estudo, classificação do grau da retinopatia, métodos analíticos estatísticos e com o poder estatístico do estudo constituindo o papel principal (ABHARY, SOTOODEH *et al.*, 2009).

Este estudo possui algumas limitações. Primeiro, o número amostral é baixo. Em segundo lugar, fatores ambientais também podem afetar a relação entre polimorfismos de *VEGFA* e *VEGFR2* e DM2 e complicações associadas.

Contudo também foi mostrado que indivíduos com DM2 e sem retinopatia tinham maior probabilidade de ser do sexo feminino e ter menor duração da doença, concentrações mais baixas de HbA1c, e índice de massa corporal (IMC) mais baixas e menores taxas de nefropatia quando comparadas com sujeitos com DM2 e severa retinopatia não proliferativa (ABHARY, 2010), características da amostra avaliada em nosso estudo que poderia justificar a falta de associação entre os polimorfismos avaliados e as complicações diabéticas.

5 CONCLUSÕES

De acordo com os resultados do nosso estudo, os polimorfismos rs2146323 e rs3025039 do gene *VEGFA* e o polimorfismo rs2305948 do gene *VEGFR2* não estão relacionados ao risco do desenvolvimento do DM2, complicações associadas (como a retinopatia, nefropatia e neuropatia diabéticas, infarto agudo do miocárdio) ou concentrações plasmáticas de VEGF-A e sVEGFR-2.

Indivíduos saudáveis portadores do genótipo CC do rs2146323 do gene *VEGFA* apresentaram maior IMC.

As concentrações plasmáticas de sVEGFR-2 foram associadas com o Infarto Agudo do Miocárdio em pacientes diabéticos.

REFERÊNCIAS

ABDELGHANY, A. A. *et al.* Association of VEGF Gene Family Variants with Central Macular Thickness and Visual Acuity after Aflibercept Short-Term Treatment in Diabetic Patients: A Pilot Study. **Ophthalmic Res**, 64, n. 2, p. 261-272, 2021.

ABDUL-GHANI, M. A.; DEFRONZO, R. A. Pathogenesis of insulin resistance in skeletal muscle. **J Biomed Biotechnol**, 2010, p. 476279, 2010.

ABHARY, S. **The Genetic Study of Diabetic Retinopathy**. 2010. (Doctor of Philosophy) - Ophthalmology, Flinders University.

ABHARY, S. *et al.* Common Sequence Variation in the VEGFA Gene Predicts Risk of Diabetic Retinopathy. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, 50, n. 12, p. 5552-5558, 2009.

ABHARY, S. *et al.* Common sequence variation in the VEGFA gene predicts risk of diabetic retinopathy. **Invest Ophthalmol Vis Sci**, 50, n. 12, p. 5552-5558, Dec 2009.

ADA. Standards of Medical Care in Diabetes - 2019. **Diabetes Care**, 1, 41, p. 14-31, 2019.

ADA. Standards of Medical Care in Diabetes - 2020. **Diabetes Care**, 1, 41, p. 14-31, 2022a.

ADA. Standards of Medical Care in Diabetes - 2022. **Diabetes Care**, 45, n. 1, 2022b.

AGUDO, J. *et al.* Vascular endothelial growth factor-mediated islet hypervascularization and inflammation contribute to progressive reduction of β-cell mass. **Diabetes**, 61, n. 11, p. 2851-2861, 2012.

AIELLO, L. P.; WONG, J.-S. Role of vascular endothelial growth factor in diabetic vascular complications. **Kidney International**, 58, p. S113-S119, 2000.

AL-HABBOUBI, H. H. *et al.* Contribution of VEGF polymorphisms to variation in VEGF serum levels in a healthy population. **Eur Cytokine Netw**, 22, n. 3, p. 154-158, Sep 2011.

AL-HADDAD, R. *et al.* Epigenetic changes in diabetes. **Neurosci Lett**, 625, p. 64-69, Jun 20 2016.

ALBUQUERQUE, R. J. *et al.* Alternatively spliced vascular endothelial growth factor receptor-2 is an essential endogenous inhibitor of lymphatic vessel growth. **Nat Med**, 15, n. 9, p. 1023-1030, Sep 2009.

ALEXANDER, S. P. *et al.* The Concise Guide to PHARMACOLOGY 2015/16: Catalytic receptors. **Br J Pharmacol**, 172, n. 24, p. 5979-6023, Dec 2015.

ALEXANDRE, C. *et al.* A importância da associação de dieta e de atividade física na prevenção e controle do Diabetes mellitus tipo 2. **Acta Sci. Health Sci. Maringá**, 27, p. 195-205, 03/26 2005.

ALKIM, C. *et al.* Angiogenesis in Inflammatory Bowel Disease. **Int J Inflam**, 2015, p. 970890, 2015.

ANDERSEN, N. F. *et al.* Vascular endothelial growth factor (VEGF) gene polymorphisms may influence the efficacy of thalidomide in multiple myeloma. **International Journal of Cancer**, 131, n. 5, p. E636-E642, 2012.

ASAHARA, T. *et al.* VEGF contributes to postnatal neovascularization by mobilizing bone marrow-derived endothelial progenitor cells. **EMBO J**, 18, n. 14, p. 3964-3972, Jul 15 1999.

AWATA, T. *et al.* A common polymorphism in the 5'-untranslated region of the VEGF gene is associated with diabetic retinopathy in type 2 diabetes. **Diabetes**, 51, n. 5, p. 1635-1639, May 2002.

AZIZI, G. *et al.* The potential role of angiogenic factors in rheumatoid arthritis. **Int J Rheum Dis**, 17, n. 4, p. 369-383, May 2014.

BACH, D. *et al.* Expression of Mfn2, the Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 2A gene, in human skeletal muscle: effects of type 2 diabetes, obesity, weight loss, and the regulatory role of tumor necrosis factor alpha and interleukin-6. **Diabetes**, 54, n. 9, p. 2685-2693, Sep 2005.

BAIGENT, C. *et al.* Efficacy and safety of cholesterol-lowering treatment: prospective meta-analysis of data from 90,056 participants in 14 randomised trials of statins. **Lancet**, 366, n. 9493, p. 1267-1278, Oct 8 2005.

BANKS, R. E. *et al.* Release of the angiogenic cytokine vascular endothelial growth factor (VEGF) from platelets: significance for VEGF measurements and cancer biology. **Br J Cancer**, 77, n. 6, p. 956-964, Mar 1998.

BARBOSA, V. S. d. n. G., Leuciney Santana ; Palma,Danielly Cristina Andrade. Dislipidemia em pacientes com diabetes tipo 2. **Revista Saúde e Pesquisa**, 3, 10, p. 579-585, 2017.

BARRATT, S. L. *et al.* Differential Expression of VEGF-A(xxx) Isoforms Is Critical for Development of Pulmonary Fibrosis. **Am J Respir Crit Care Med**, 196, n. 4, p. 479-493, Aug 15 2017.

BATES, D. O. *et al.* Detection of VEGF-A(xxx)b isoforms in human tissues. **PLoS One**, 8, n. 7, p. e68399, 2013.

BAUER, J. *et al.* In vitro model of angiogenesis using a human endothelium-derived permanent cell line: contributions of induced gene expression, G-proteins, and integrins. **J Cell Physiol**, 153, n. 3, p. 437-449, Dec 1992.

BECKER, J. *et al.* Neuroblastoma progression correlates with downregulation of the lymphangiogenesis inhibitor sVEGFR-2. **Clin Cancer Res**, 16, n. 5, p. 1431-1441, Mar 1 2010.

BELLOU, V. *et al.* Risk factors for type 2 diabetes mellitus: An exposure-wide umbrella review of meta-analyses. **PLoS One**, 13, n. 3, p. e0194127, 2018.

BERSE, B. *et al.* Vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) gene is expressed differentially in normal tissues, macrophages, and tumors. **Mol Biol Cell**, 3, n. 2, p. 211-220, Feb 1992.

BERTOLUCI, M. C.; ROCHA, V. Z. Cardiovascular risk assessment in patients with diabetes. **Diabetol Metab Syndr**, 9, p. 25, 2017.

BIAGI, E. *et al.* Aging of the human metaorganism: the microbial counterpart. **Age (Dordrecht, Netherlands)**, 34, n. 1, p. 247-267, 2012.

BLOMEN, V. A.; BOONSTRA, J. Stable transmission of reversible modifications: maintenance of epigenetic information through the cell cycle. **Cellular and molecular life sciences : CMLS**, 68, n. 1, p. 27-44, 2011.

BOGDANOVIĆ, O.; VEENSTRA, G. J. C. DNA methylation and methyl-CpG binding proteins: developmental requirements and function. **Chromosoma**, 118, n. 5, p. 549-565, 2009/10/01 2009.

BOLAND, B. B. *et al.* The dynamic plasticity of insulin production in β-cells. **Molecular metabolism**, 6, n. 9, p. 958-973, 2017.

BONNER-WEIR, S. Morphological evidence for pancreatic polarity of beta-cell within islets of Langerhans. **Diabetes**, 37, n. 5, p. 616-621, May 1988.

BOSTRÖM, P. *et al.* A PGC1-α-dependent myokine that drives brown-fat-like development of white fat and thermogenesis. **Nature**, 481, n. 7382, p. 463-468, 2012.

BOTTI, C. *et al.* Circulating cytokines present in the serum of peripheral arterial disease patients induce endothelial dysfunction. **J Biol Regul Homeost Agents**, 26, n. 1, p. 67-79, Jan-Mar 2012.

BRASACCHIO, D. *et al.* Hyperglycemia induces a dynamic cooperativity of histone methylase and demethylase enzymes associated with gene-activating epigenetic marks that coexist on the lysine tail. **Diabetes**, 58, n. 5, p. 1229-1236, May 2009.

BREVING, K.; ESQUELA-KERSCHER, A. The complexities of microRNA regulation: mirandering around the rules. **Int J Biochem Cell Biol**, 42, n. 8, p. 1316-1329, Aug 2010.

BRISSOVA, M. *et al.* Islet microenvironment, modulated by vascular endothelial growth factor-A signaling, promotes β cell regeneration. **Cell Metab**, 19, n. 3, p. 498-511, Mar 4 2014.

BRISSOVA, M. *et al.* Human Islets Have Fewer Blood Vessels than Mouse Islets and the Density of Islet Vascular Structures Is Increased in Type 2 Diabetes. **The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society**, 63, n. 8, p. 637-645, 2015.

BRISSOVA, M. *et al.* Pancreatic islet production of vascular endothelial growth factor--a is essential for islet vascularization, revascularization, and function. **Diabetes**, 55, n. 11, p. 2974-2985, Nov 2006.

BROGI, E. *et al.* Indirect angiogenic cytokines upregulate VEGF and bFGF gene expression in vascular smooth muscle cells, whereas hypoxia upregulates VEGF expression only. **Circulation**, 90, n. 2, p. 649-652, Aug 1994.

BULGU, Y. *et al.* Vascular endothelial growth factor gene polymorphisms in age-related macular degeneration in a Turkish population. **Int J Ophthalmol**, 7, n. 5, p. 773-777, 2014.

BUNNEY, P. E. *et al.* Orexin activation counteracts decreases in nonexercise activity thermogenesis (NEAT) caused by high-fat diet. **Physiol Behav**, 176, p. 139-148, Jul 1 2017.

BUYSSCHAERT, I. *et al.* Genetics, epigenetics and pharmaco-(epi)genomics in angiogenesis. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, 12, n. 6b, p. 2533-2551, 2008.

CABRAL, V. L. R., CARVALHO, Luciana de e MISZPUTEN, Sender Importância da albumina sérica na avaliação nutricional e de atividade inflamatória em pacientes com doença de Crohn. **Arquivos de Gastroenterologia**, 2, 38, p. 104-108., 2001.

CAMERON, N. E. *et al.* Protein kinase C effects on nerve function, perfusion, Na(+), K(+)-ATPase activity and glutathione content in diabetic rats. **Diabetologia**, 42, n. 9, p. 1120-1130, Sep 1999.

CANI, P. D. *et al.* Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. **Diabetes**, 56, n. 7, p. 1761-1772, Jul 2007.

CAREY, V. J. *et al.* Body Fat Distribution and Risk of Non-Insulin-dependent Diabetes Mellitus in Women: The Nurses' Health Study. **American Journal of Epidemiology**, 145, n. 7, p. 614-619, 1997.

CARMELIET, P. Angiogenesis in life, disease and medicine. **Nature**, 438, n. 7070, p. 932-936, Dec 15 2005.

CASELLA, I. *et al.* Autocrine-paracrine VEGF loops potentiate the maturation of megakaryocytic precursors through Flt1 receptor. **Blood**, 101, n. 4, p. 1316-1323, Feb 15 2003.

CERF, M. Beta Cell Dysfunction and Insulin Resistance. **Frontiers in Endocrinology**, 4, 2013-March-27 2013. Review.

CERF, M. E. Beta cell dysfunction and insulin resistance. **Frontiers in endocrinology**, 4, p. 37-37, 2013.

CERIELLO, A. The emerging challenge in diabetes: the "metabolic memory". **Vascul Pharmacol**, 57, n. 5-6, p. 133-138, Nov-Dec 2012.

CERIELLO, A. *et al.* The “Metabolic Memory”: Is More Than Just Tight Glucose Control Necessary to Prevent Diabetic Complications? **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, 94, n. 2, p. 410-415, 2009.

CHAN, J. C. *et al.* Obesity, albuminuria and hypertension among Hong Kong Chinese with non-insulin-dependent diabetes mellitus (NIDDM). **Postgraduate Medical Journal**, 69, n. 809, p. 204-210, 1993.

CHATTERJEE, S. *et al.* Type 2 diabetes. **The Lancet**, 389, n. 10085, p. 2239-2251, 2017.

CHAVEZ, J. A.; SUMMERS, S. A. A ceramide-centric view of insulin resistance. **Cell Metab**, 15, n. 5, p. 585-594, May 2 2012.

CHERRINGTON, A. D. *et al.* Insulin action on the liver in vivo. **Biochem Soc Trans**, 35, n. Pt 5, p. 1171-1174, Nov 2007.

CHIARELLI, F. *et al.* Vascular endothelial growth factor (VEGF) in children, adolescents and young adults with Type 1 diabetes mellitus: relation to glycaemic control and microvascular complications. **Diabet Med**, 17, n. 9, p. 650-656, Sep 2000.

CHRISTENSEN, A. A.; GANNON, M. The Beta Cell in Type 2 Diabetes. **Curr Diab Rep**, 19, n. 9, p. 81, Aug 9 2019.

CHUNG, S. S. M. *et al.* Contribution of Polyol Pathway to Diabetes-Induced Oxidative Stress. **Journal of the American Society of Nephrology**, 14, n. suppl 3, p. S233-S236, 2003.

CHURCHILL, A. J. *et al.* VEGF Polymorphisms Are Associated with Severity of Diabetic Retinopathy. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, 49, n. 8, p. 3611-3616, 2008.

COELHO, M. *et al.* Biochemistry of adipose tissue: an endocrine organ. **Archives of medical science : AMS**, 9, n. 2, p. 191-200, 2013.

COLHOUN, H. M. *et al.* Primary prevention of cardiovascular disease with atorvastatin in type 2 diabetes in the Collaborative Atorvastatin Diabetes Study (CARDS): multicentre randomised placebo-controlled trial. **Lancet**, 364, n. 9435, p. 685-696, Aug 21-27 2004.

COLLINS, R. *et al.* MRC/BHF Heart Protection Study of cholesterol-lowering with simvastatin in 5963 people with diabetes: a randomised placebo-controlled trial. **Lancet**, 361, n. 9374, p. 2005-2016, Jun 14 2003.

CUÍÑAS, A. *et al.* Activation of PKA and Epac proteins by cyclic AMP depletes intracellular calcium stores and reduces calcium availability for vasoconstriction. **Life Sci**, 155, p. 102-109, Jun 15 2016.

CZECH, M. P. Insulin action and resistance in obesity and type 2 diabetes. **Nat Med**, 23, n. 7, p. 804-814, Jul 11 2017.

CZECH, M. P. Mechanisms of insulin resistance related to white, beige, and brown adipocytes. **Mol Metab**, 34, p. 27-42, Apr 2020.

DABELEA, D. *et al.* Diabetes in Navajo Youth: Prevalence, incidence, and clinical characteristics: the SEARCH for Diabetes in Youth Study. **Diabetes Care**, 32, n. Supplement_2, p. S141-S147, 2009.

DAI, C. *et al.* Beta-cell-specific ablation of the hepatocyte growth factor receptor results in reduced islet size, impaired insulin secretion, and glucose intolerance. **Am J Pathol**, 167, n. 2, p. 429-436, Aug 2005.

DAI, C. *et al.* Hepatocyte growth factor preserves beta cell mass and mitigates hyperglycemia in streptozotocin-induced diabetic mice. **J Biol Chem**, 278, n. 29, p. 27080-27087, Jul 18 2003.

DALI-YOUCEF, N. *et al.* Metabolic inflammation: connecting obesity and insulin resistance. **Ann Med**, 45, n. 3, p. 242-253, May 2013.

DE, B. S. *et al.* Oxidative stress as an underlying contributor in the development of chronic complications in diabetes mellitus. **Int J Mol Sci**, 14, n. 2, p. 3265-3284, Feb 5 2013.

DE LEU, N. *et al.* Short-term overexpression of VEGF-A in mouse beta cells indirectly stimulates their proliferation and protects against diabetes. **Diabetologia**, 57, n. 1, p. 140-147, Jan 2014.

DEFRONZO, R. A. Lilly lecture 1987. The triumvirate: beta-cell, muscle, liver. A collusion responsible for NIDDM. **Diabetes**, 37, n. 6, p. 667-687, Jun 1988.

DEFRONZO, R. A. Banting Lecture. From the triumvirate to the ominous octet: a new paradigm for the treatment of type 2 diabetes mellitus. **Diabetes**, 58, n. 4, p. 773-795, Apr 2009.

DEGUCHI, T. *et al.* Serum VEGF increases in diabetic polyneuropathy, particularly in the neurologically active symptomatic stage. **Diabet Med**, 26, n. 3, p. 247-252, Mar 2009.

DEHGHANIAN, F.; HOJATI, Z. Comparative insight into expression of recombinant human VEGF111b, a newly identified anti-angiogenic isoform, in eukaryotic cell lines. **Gene**, 553, n. 1, p. 57-62, Dec 10 2014.

DETORAKI, A. *et al.* Vascular endothelial growth factors synthesized by human lung mast cells exert angiogenic effects. **J Allergy Clin Immunol**, 123, n. 5, p. 1142-1149, 1149.e1141-1145, May 2009.

DIABETES, C. *et al.* The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. **N Engl J Med**, 329, n. 14, p. 977-986, Sep 30 1993.

DIMAS, A. S. *et al.* Impact of type 2 diabetes susceptibility variants on quantitative glycemic traits reveals mechanistic heterogeneity. **Diabetes**, 63, n. 6, p. 2158-2171, Jun 2014.

DING, W. X.; YIN, X. M. Mitophagy: mechanisms, pathophysiological roles, and analysis. **Biol Chem**, 393, n. 7, p. 547-564, Jul 2012.

DONG, P. P. Association of vascular endothelial growth factor expression and polymorphisms with the risk of gestational diabetes mellitus. **J Clin Lab Anal**, 33, n. 2, p. e22686, Feb 2019.

DONNELLY, R. *et al.* ABC of arterial and venous disease: vascular complications of diabetes. **BMJ (Clinical research ed.)**, 320, n. 7241, p. 1062-1066, 2000.

DRAZNIN, B. *et al.* 2. Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes-2022. **Diabetes Care**, 45, n. Supplement_1, p. S17-s38, Jan 1 2022.

DUH, E.; AIELLO, L. P. Vascular endothelial growth factor and diabetes: the agonist versus antagonist paradox. **Diabetes**, 48, n. 10, p. 1899-1906, Oct 1999.

DURAN, J. *et al.* Genetic association study of coronary collateral circulation in patients with coronary artery disease using 22 single nucleotide polymorphisms corresponding to 10 genes involved in postischemic neovascularization. **BMC Cardiovascular Disorders**, 15, 2015/05/12/
// 2015. Report.

DVORAK, H. F. *et al.* Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability, and angiogenesis. **Am J Pathol**, 146, n. 5, p. 1029-1039, May 1995.

EDGERTON, D. S. *et al.* Insulin's direct effects on the liver dominate the control of hepatic glucose production. **J Clin Invest**, 116, n. 2, p. 521-527, Feb 2006.

EL-LEBEDY, D. H. *et al.* Novel adipokines vaspin and irisin as risk biomarkers for cardiovascular diseases in type 2 diabetes mellitus. **Diabetes Metab Syndr**, 12, n. 5, p. 643-648, Sep 2018.

EL-SHAZLY, S. F. *et al.* Vascular endothelial growth factor gene polymorphism prevalence in patients with diabetic macular oedema and its correlation with anti-vascular endothelial growth factor treatment outcomes. **Clin Exp Ophthalmol**, 42, n. 4, p. 369-378, May-Jun 2014.

ELFVING, B. *et al.* Depression and BMI influences the serum vascular endothelial growth factor level. **Int J Neuropsychopharmacol**, 17, n. 9, p. 1409-1417, Sep 2014.

EMERGING RISK FACTORS, C. *et al.* Diabetes mellitus, fasting blood glucose concentration, and risk of vascular disease: a collaborative meta-analysis of 102 prospective studies. **Lancet**, 375, n. 9733, p. 2215-2222, Jun 26 2010.

ENGERMAN, R. L. Pathogenesis of diabetic retinopathy. **Diabetes**, 38, n. 10, p. 1203-1206, Oct 1989.

EREMINA, V. *et al.* VEGF inhibition and renal thrombotic microangiopathy. **N Engl J Med**, 358, n. 11, p. 1129-1136, Mar 13 2008.

ESGUERRA, J. L. S. *et al.* MicroRNAs in islet hormone secretion. **Diabetes Obes Metab**, 20 Suppl 2, p. 11-19, Sep 2018.

ESSER, N. *et al.* Inflammation as a link between obesity, metabolic syndrome and type 2 diabetes. **Diabetes Res Clin Pract**, 105, n. 2, p. 141-150, Aug 2014.

ESSER, S. *et al.* Vascular endothelial growth factor induces endothelial fenestrations in vitro. **J Cell Biol**, 140, n. 4, p. 947-959, Feb 23 1998.

ESWARAPPA, S. M. *et al.* Programmed translational readthrough generates antiangiogenic VEGF-Ax. **Cell**, 157, n. 7, p. 1605-1618, Jun 19 2014.

EZRATY, B. *et al.* Oxidative stress, protein damage and repair in bacteria. **Nat Rev Microbiol**, 15, n. 7, p. 385-396, Jul 2017.

FÁTIMA, L. A. d.; PAPA, P. d. C. Fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF): regulação transcricional e pós-transcricional. **Revista da Biologia**, 4, n. 1, p. 22-27, 04/23 2018.

FEARNLEY, G. W. *et al.* VEGF-A isoforms differentially regulate ATF-2-dependent VCAM-1 gene expression and endothelial-leukocyte interactions. **Mol Biol Cell**, 25, n. 16, p. 2509-2521, Aug 15 2014.

FERRARA, N. Molecular and biological properties of vascular endothelial growth factor. **J Mol Med (Berl)**, 77, n. 7, p. 527-543, Jul 1999.

FERRARA, N. Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. **Endocr Rev**, 25, n. 4, p. 581-611, Aug 2004.

FERRARA, N.; ADAMIS, A. P. Ten years of anti-vascular endothelial growth factor therapy. **Nat Rev Drug Discov**, 15, n. 6, p. 385-403, Jun 2016.

FERRARA, N.; DAVIS-SMYTH, T. The Biology of Vascular Endothelial Growth Factor. **Endocrine Reviews**, 18, n. 1, p. 4-25, 1997.

FERRARA, N. *et al.* The biology of VEGF and its receptors. **Nat Med**, 9, n. 6, p. 669-676, Jun 2003.

FERRARA, N.; HENZEL, W. J. Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 161, n. 2, p. 851-858, 1989/06/15/ 1989.

FERRARA, N. *et al.* Molecular and biological properties of the vascular endothelial growth factor family of proteins. **Endocr Rev**, 13, n. 1, p. 18-32, Feb 1992.

FIEDLER, L. **VEGF signaling : methods and protocols**. New York: Humana Press, 2015. x, 225 pages p. (Methods in molecular biology,, v. 1332). 9781493929160 149392916X
1064-3745 ;.

FIGUEROA-ROMERO, C. *et al.* Mechanisms of disease: the oxidative stress theory of diabetic neuropathy. **Rev Endocr Metab Disord**, 9, n. 4, p. 301-314, Dec 2008.

FLANNICK, J.; FLOREZ, J. C. Type 2 diabetes: genetic data sharing to advance complex disease research. **Nat Rev Genet**, 17, n. 9, p. 535-549, Sep 2016.

Focusing on mitochondrial form and function. **Nat Cell Biol**, 20, n. 7, p. 735, Jul 2018.

FOLKMAN, J. Angiogenesis in psoriasis: therapeutic implications. **J Invest Dermatol**, 59, n. 1, p. 40-43, Jul 1972.

FOLKMAN, J. Angiogenesis: an organizing principle for drug discovery? **Nat Rev Drug Discov**, 6, n. 4, p. 273-286, Apr 2007.

FORBES, J. M.; COOPER, M. E. Mechanisms of diabetic complications. **Physiol Rev**, 93, n. 1, p. 137-188, Jan 2013.

FORBES, J. M.; FOTHERINGHAM, A. K. Vascular complications in diabetes: old messages, new thoughts. **Diabetologia**, 60, n. 11, p. 2129-2138, Nov 2017.

FRANCO, M. *et al.* Pericytes promote endothelial cell survival through induction of autocrine VEGF-A signaling and Bcl-w expression. **Blood**, 118, n. 10, p. 2906-2917, Sep 8 2011.

FRANKS, P. W. *et al.* Gene-Environment and Gene-Treatment Interactions in Type 2 Diabetes: Progress, pitfalls, and prospects. **Diabetes Care**, 36, n. 5, p. 1413-1421, 2013.

FRAZER, K. A. *et al.* A second generation human haplotype map of over 3.1 million SNPs. **Nature**, 449, n. 7164, p. 851-861, 2007/10/01 2007.

FU, Z. *et al.* Regulation of insulin synthesis and secretion and pancreatic Beta-cell dysfunction in diabetes. **Current diabetes reviews**, 9, n. 1, p. 25-53, 2013.

FUCHSBERGER, C. *et al.* The genetic architecture of type 2 diabetes. **Nature**, 536, n. 7614, p. 41-47, Aug 4 2016.

FUH, G. *et al.* Requirements for binding and signaling of the kinase domain receptor for vascular endothelial growth factor. **J Biol Chem**, 273, n. 18, p. 11197-11204, May 1 1998.

GAEDE, P. *et al.* Multifactorial intervention and cardiovascular disease in patients with type 2 diabetes. **N Engl J Med**, 348, n. 5, p. 383-393, Jan 30 2003.

GAEDE, P. H. *et al.* [The Steno-2 study. Intensive multifactorial intervention reduces the occurrence of cardiovascular disease in patients with type 2 diabetes]. **Ugeskr Laeger**, 165, n. 26, p. 2658-2661, Jun 23 2003.

GALAN, A. *et al.* Association of age-related macular degeneration with polymorphisms in vascular endothelial growth factor and its receptor. **Ophthalmology**, 117, n. 9, p. 1769-1774, Sep 2010.

GAŁECKI, P. *et al.* Vascular endothelial growth factor receptor 2 gene (KDR) polymorphisms and expression levels in depressive disorder. **J Affect Disord**, 147, n. 1-3, p. 144-149, May 2013.

GALICIA-GARCIA, U. *et al.* Pathophysiology of Type 2 Diabetes Mellitus. **International journal of molecular sciences**, 21, n. 17, p. 6275, 2020.

GAO, K. *et al.* Interactions between genetic polymorphisms of glucose metabolizing genes and smoking and alcohol consumption in the risk of type 2 diabetes mellitus. **Appl Physiol Nutr Metab**, 42, n. 12, p. 1316-1321, Dec 2017.

GARCIA-OCANA, A. *et al.* Hepatocyte growth factor overexpression in the islet of transgenic mice increases beta cell proliferation, enhances islet mass, and induces mild hypoglycemia. **J Biol Chem**, 275, n. 2, p. 1226-1232, Jan 14 2000.

GARCIA-OCANA, A. *et al.* Transgenic overexpression of hepatocyte growth factor in the beta-cell markedly improves islet function and islet transplant outcomes in mice. **Diabetes**, 50, n. 12, p. 2752-2762, Dec 2001.

GASTALDELLI, A. *et al.* Role of Adipose Tissue Insulin Resistance in the Natural History of Type 2 Diabetes: Results From the San Antonio Metabolism Study. **Diabetes**, 66, n. 4, p. 815-822, 2017.

GAUDRY, M. *et al.* Intracellular pool of vascular endothelial growth factor in human neutrophils. **Blood**, 90, n. 10, p. 4153-4161, Nov 15 1997.

GEISS, L. S. *et al.* Prevalence and incidence trends for diagnosed diabetes among adults aged 20 to 79 years, United States, 1980-2012. **Jama**, 312, n. 12, p. 1218-1226, Sep 24 2014.

GEMBAL, M. *et al.* Mechanisms by which glucose can control insulin release independently from its action on adenosine triphosphate-sensitive K+ channels in mouse B cells. **The Journal of clinical investigation**, 91, n. 3, p. 871-880, 1993.

GERBER, H.-P. *et al.* Vascular Endothelial Growth Factor Regulates Endothelial Cell Survival through the Phosphatidylinositol 3′-Kinase/Akt Signal Transduction Pathway: REQUIREMENT FOR Flk-1/KDR ACTIVATION*. **Journal of Biological Chemistry**, 273, n. 46, p. 30336-30343, 1998/11/13/ 1998.

GIACCO, F.; BROWNLEE, M. Oxidative stress and diabetic complications. **Circulation research**, 107, n. 9, p. 1058-1070, 2010.

GINTER, E.; SIMKO, V. Type 2 diabetes mellitus, pandemic in 21st century. **Adv Exp Med Biol**, 771, p. 42-50, 2012.

GOLDBERG, R. B. *et al.* Cardiovascular events and their reduction with pravastatin in diabetic and glucose-intolerant myocardial infarction survivors with average cholesterol levels: subgroup analyses in the cholesterol and recurrent events (CARE) trial. The Care Investigators. **Circulation**, 98, n. 23, p. 2513-2519, Dec 8 1998.

GONÇALVES, F. T. I. *et al.* Influence of VEGF-C936T genetic variant on age-related macular degeneration. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, 78, p. 290-294, 2015.

GRACIANO, M. F. *et al.* Regulation of insulin secretion and reactive oxygen species production by free fatty acids in pancreatic islets. **Islets**, 3, n. 5, p. 213-223, Sep-Oct 2011.

GRARUP, N. *et al.* Genetic susceptibility to type 2 diabetes and obesity: from genome-wide association studies to rare variants and beyond. **Diabetologia**, 57, n. 8, p. 1528-1541, Aug 2014.

GU, F. *et al.* VEGF111b, a new member of VEGFxxxb isoforms and induced by mitomycin C, inhibits angiogenesis. **Biochem Biophys Res Commun**, 441, n. 1, p. 18-24, Nov 8 2013.

GU, K. *et al.* Mortality in adults with and without diabetes in a national cohort of the U.S. population, 1971-1993. **Diabetes Care**, 21, n. 7, p. 1138-1145, Jul 1998.

GUARNER, V.; RUBIO-RUIZ, M. E. Low-grade systemic inflammation connects aging, metabolic syndrome and cardiovascular disease. **Interdiscip Top Gerontol**, 40, p. 99-106, 2015.

HAFFNER, S. M. *et al.* Mortality from coronary heart disease in subjects with type 2 diabetes and in nondiabetic subjects with and without prior myocardial infarction. **N Engl J Med**, 339, n. 4, p. 229-234, Jul 23 1998.

HAINES, L. *et al.* Rising Incidence of Type 2 Diabetes in Children in the U.K. **Diabetes Care**, 30, n. 5, p. 1097-1101, 2007.

HALBAN, P. A. Proinsulin processing in the regulated and the constitutive secretory pathway. **Diabetologia**, 37 Suppl 2, p. S65-72, Sep 1994.

HALBAN, P. A. *et al.* β-cell failure in type 2 diabetes: postulated mechanisms and prospects for prevention and treatment. **Diabetes care**, 37, n. 6, p. 1751-1758, 2014.

HAMRAH, P. *et al.* Novel expression of vascular endothelial growth factor receptor (VEGFR)-3 and VEGF-C on corneal dendritic cells. **Am J Pathol**, 163, n. 1, p. 57-68, Jul 2003.

HAN, I.-B. *et al.* Association between kinase insert domain-containing receptor gene polymorphisms and silent brain infarction: A Korean study. **Journal of the Neurological Sciences**, 318, n. 1, p. 85-89, 2012/07/15/ 2012.

HAN, L. *et al.* The associations between VEGF gene polymorphisms and diabetic retinopathy susceptibility: a meta-analysis of 11 case-control studies. **J Diabetes Res**, 2014, p. 805801, 2014.

HAN, L. *et al.* The Associations between VEGF Gene Polymorphisms and Diabetic Retinopathy Susceptibility: A Meta-Analysis of 11 Case-Control Studies. **Journal of Diabetes Research**, 2014, p. 805801, 2014/04/28 2014.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, 144, n. 5, p. 646-674, Mar 4 2011.

HANDELSMAN, Y. *et al.* American Association of Clinical Endocrinologists Medical Guidelines for Clinical Practice for Developing a Diabetes Mellitus Comprehensive Care Plan. **Endocrine Practice**, 17, p. 1-53, 2011.

HANDSCHIN, C.; SPIEGELMAN, B. M. The role of exercise and PGC1alpha in inflammation and chronic disease. **Nature**, 454, n. 7203, p. 463-469, 2008.

HILLIER, T. A.; PEDULA, K. L. Complications in Young Adults With Early-Onset Type 2 Diabetes: Losing the relative protection of youth. **Diabetes Care**, 26, n. 11, p. 2999-3005, 2003.

HOANG DO, O.; THORN, P. Insulin secretion from beta cells within intact islets: location matters. **Clinical and experimental pharmacology & physiology**, 42, n. 4, p. 406-414, 2015.

HOGAN, M. F. *et al.* Markers of Islet Endothelial Dysfunction Occur in Male B6.BKS(D)-Leprdb/J Mice and May Contribute to Reduced Insulin Release. **Endocrinology**, 158, n. 2, p. 293-303, 2017.

HOLMAN, R. R. *et al.* 10-year follow-up of intensive glucose control in type 2 diabetes. **N Engl J Med**, 359, n. 15, p. 1577-1589, Oct 9 2008.

HOTAMISLIGIL, G. S. Inflammation and endoplasmic reticulum stress in obesity and diabetes. **Int J Obes (Lond)**, 32 Suppl 7, n. Suppl 7, p. S52-54, Dec 2008.

HU, F. B. *et al.* Diet, lifestyle, and the risk of type 2 diabetes mellitus in women. **N Engl J Med**, 345, n. 11, p. 790-797, Sep 13 2001.

IDF. **IDF DIABETES ATLAS**. www.diabetesatlas.org, 2021. ISSN 978-2-930229-98-0. Acesso em: 05/01/2021.

IHNAT, M. A. *et al.* Reactive oxygen species mediate a cellular 'memory' of high glucose stress signalling. **Diabetologia**, 50, n. 7, p. 1523-1531, Jul 2007.

IKEDA, S. *et al.* Novel role of ARF6 in vascular endothelial growth factor-induced signaling and angiogenesis. **Circ Res**, 96, n. 4, p. 467-475, Mar 4 2005.

IMAMURA, M.; MAEDA, S. Genetics of type 2 diabetes: the GWAS era and future perspectives [Review]. **Endocr J**, 58, n. 9, p. 723-739, 2011.

IMMONEN, I. *et al.* Vascular Endothelial Growth Factor Gene Variation and the Response to Photodynamic Therapy in Age-Related Macular Degeneration. **Ophthalmology**, 117, n. 1, p. 103-108, 2010/01/01/ 2010.

IMOUKHUEDE, P. I.; POPEL, A. S. Quantification and cell-to-cell variation of vascular endothelial growth factor receptors. **Exp Cell Res**, 317, n. 7, p. 955-965, Apr 15 2011.

INOUE, M. *et al.* VEGF-A has a critical, nonredundant role in angiogenic switching and pancreatic beta cell carcinogenesis. **Cancer Cell**, 1, n. 2, p. 193-202, Mar 2002.

ISHIDA, A. *et al.* Expression of vascular endothelial growth factor receptors in smooth muscle cells. **J Cell Physiol**, 188, n. 3, p. 359-368, Sep 2001.

ISLAM, M. S. The ryanodine receptor calcium channel of beta-cells: molecular regulation and physiological significance. **Diabetes**, 51, n. 5, p. 1299-1309, May 2002.

ISSBRÜCKER, K. *et al.* p38 MAP kinase--a molecular switch between VEGF-induced angiogenesis and vascular hyperpermeability. **Faseb j**, 17, n. 2, p. 262-264, Feb 2003.

IWASHITA, N. *et al.* Impaired insulin secretion in vivo but enhanced insulin secretion from isolated islets in pancreatic beta cell-specific vascular endothelial growth factor-A knock-out mice. **Diabetologia**, 50, n. 2, p. 380-389, Feb 2007.

IYER, S.; ACHARYA, K. R. Tying the knot: the cystine signature and molecular-recognition processes of the vascular endothelial growth factor family of angiogenic cytokines. **Febs j**, 278, n. 22, p. 4304-4322, Nov 2011.

IZZEDINE, H. *et al.* Thrombotic microangiopathy and anti-VEGF agents. **Nephrol Dial Transplant**, 22, n. 5, p. 1481-1482, May 2007.

JÁBALI, B.; CYRILLO, D. Análise da composição dos gastos com alimentação no Município de São Paulo (Brasil) na década de 1990. **Revista de Saúde Pública**, 35, 02/01 2001.

JANG, M. J. *et al.* Association of VEGF and KDR single nucleotide polymorphisms with colorectal cancer susceptibility in Koreans. **Mol Carcinog**, 52 Suppl 1, p. E60-69, Nov 2013.

JHENG, H. F. *et al.* Mitochondrial fission contributes to mitochondrial dysfunction and insulin resistance in skeletal muscle. **Mol Cell Biol**, 32, n. 2, p. 309-319, Jan 2012.

JOHNSON, A. R. *et al.* The inflammation highway: metabolism accelerates inflammatory traffic in obesity. **Immunol Rev**, 249, n. 1, p. 218-238, Sep 2012.

JOHNSON, K. E.; WILGUS, T. A. Vascular Endothelial Growth Factor and Angiogenesis in the Regulation of Cutaneous Wound Repair. **Adv Wound Care (New Rochelle)**, 3, n. 10, p. 647-661, Oct 1 2014.

KABRUN, N. *et al.* Flk-1 expression defines a population of early embryonic hematopoietic precursors. **Development**, 124, n. 10, p. 2039-2048, May 1997.

KADOWAKI, T. *et al.* A subtype of diabetes mellitus associated with a mutation of mitochondrial DNA. **N Engl J Med**, 330, n. 14, p. 962-968, Apr 7 1994.

KAMAL SHARMA, N. *et al.* Single Nucleotide Polymorphism and Serum Levels of VEGFR2 are Associated With Age Related Macular Degeneration. **Current Neurovascular Research**, 9, n. 4, p. 256-265, 2012.

KAMBA, T. *et al.* VEGF-dependent plasticity of fenestrated capillaries in the normal adult microvasculature. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, 290, n. 2, p. H560-576, Feb 2006.

KANGAS-KONTIO, T. *et al.* Polymorphism of the manganese superoxide dismutase gene but not of vascular endothelial growth factor gene is a risk factor for diabetic retinopathy. **British Journal of Ophthalmology**, 93, p. 1401 - 1406, 2009.

KANGAS-KONTIO, T. *et al.* Polymorphism of the manganese superoxide dismutase gene but not of vascular endothelial growth factor gene is a risk factor for diabetic retinopathy. **Br J Ophthalmol**, 93, n. 10, p. 1401-1406, Oct 2009.

KARIŽ, S.; PETROVIČ, D. Minor association of kinase insert domain-containing receptor gene polymorphism (rs2071559) with myocardial infarction in Caucasians with type 2 diabetes mellitus: case-control cross-sectional study. **Clin Biochem**, 47, n. 16-17, p. 192-196, Nov 2014.

KARTER, A. J. *et al.* Elevated Rates of Diabetes in Pacific Islanders and Asian Subgroups: The Diabetes Study of Northern California (DISTANCE). **Diabetes Care**, 36, n. 3, p. 574-579, 2013.

KEARNEY, P. M. *et al.* Efficacy of cholesterol-lowering therapy in 18,686 people with diabetes in 14 randomised trials of statins: a meta-analysis. **Lancet**, 371, n. 9607, p. 117-125, Jan 12 2008.

KELLEY, D. E. *et al.* Skeletal muscle fatty acid metabolism in association with insulin resistance, obesity, and weight loss. **Am J Physiol**, 277, n. 6, p. E1130-1141, Dec 1999.

KEPEZ YILDIZ, B. *et al.* CFH Y402H and VEGF Polymorphisms and Anti-VEGF Treatment Response in Exudative Age-Related Macular Degeneration. **Ophthalmic Research**, 56, n. 3, p. 132-138, 2016.

KHARROUBI, A. T.; DARWISH, H. M. Diabetes mellitus: The epidemic of the century. **World J Diabetes**, 6, n. 6, p. 850-867, Jun 25 2015.

KHODAEIAN, M. *et al.* Association between Genetic Variants and Diabetes Mellitus in Iranian Populations: A Systematic Review of Observational Studies. **J Diabetes Res**, 2015, p. 585917, 2015.

KIM, H. *et al.* Role of the VEGF 936 C/T polymorphism in diabetic microvascular complications in type 2 diabetic patients. **Nephrology**, 14, 2009.

KIM, H. W. *et al.* Role of the VEGF 936 C/T polymorphism in diabetic microvascular complications in type 2 diabetic patients. **Nephrology (Carlton)**, 14, n. 7, p. 681-688, Oct 2009.

KIM, J.-A. *et al.* Role of mitochondrial dysfunction in insulin resistance. **Circulation research**, 102, n. 4, p. 401-414, 2008.

KIM, J. Y. *et al.* Lipid oxidation is reduced in obese human skeletal muscle. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, 279, n. 5, p. E1039-1044, Nov 2000.

KIM, O. J. *et al.* Association between VEGF polymorphisms and homocysteine levels in patients with ischemic stroke and silent brain infarction. **Stroke**, 42, n. 9, p. 2393-2402, Sep 2011.

KIM, Y. R.; HONG, S. H. Association between the polymorphisms of the vascular endothelial growth factor gene and metabolic syndrome. **Biomed Rep**, 3, n. 3, p. 319-326, May 2015.

KNOPP, R. H. *et al.* Efficacy and safety of atorvastatin in the prevention of cardiovascular end points in subjects with type 2 diabetes: the Atorvastatin Study for Prevention of Coronary Heart Disease Endpoints in non-insulin-dependent diabetes mellitus (ASPEN). **Diabetes Care**, 29, n. 7, p. 1478-1485, Jul 2006.

KOCH, S. *et al.* Signal transduction by vascular endothelial growth factor receptors. **Biochem J**, 437, n. 2, p. 169-183, Jul 15 2011.

KOWLURU, R. A. *et al.* Reversal of hyperglycemia and diabetic nephropathy: effect of reinstitution of good metabolic control on oxidative stress in the kidney of diabetic rats. **J Diabetes Complications**, 18, n. 5, p. 282-288, Sep-Oct 2004.

KOWLURU, R. A. *et al.* Metabolic memory phenomenon and accumulation of peroxynitrite in retinal capillaries. **Experimental diabetes research**, 2007, p. 21976-21976, 2007.

LACRAZ, G. *et al.* Islet Endothelial Activation and Oxidative Stress Gene Expression Is Reduced by IL-1Ra Treatment in the Type 2 Diabetic GK Rat. **PLOS ONE**, 4, n. 9, p. e6963, 2009.

LAHIRI, D. K.; NURNBERGER, J. I., Jr. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. **Nucleic acids research**, 19, n. 19, p. 5444-5444, 1991.

LAI, T. H. *et al.* Expression Patterns of VEGF and Flk-1 in Human Endometrium during the Menstrual Cycle. **J Reprod Infertil**, 16, n. 1, p. 3-9, Jan-Mar 2015.

LAMMERT, E. *et al.* Induction of pancreatic differentiation by signals from blood vessels. **Science**, 294, n. 5542, p. 564-567, Oct 19 2001.

LAMMERT, E. *et al.* Role of VEGF-A in vascularization of pancreatic islets. **Curr Biol**, 13, n. 12, p. 1070-1074, Jun 17 2003.

LAMPUGNANI, M. G. *et al.* Vascular endothelial cadherin controls VEGFR-2 internalization and signaling from intracellular compartments. **J Cell Biol**, 174, n. 4, p. 593-604, Aug 14 2006.

LAN, K.-C. *et al.* Advanced glycation end-products induce apoptosis in pancreatic islet endothelial cells via NF-κB-activated cyclooxygenase-2/prostaglandin E2 up-regulation. **PloS one**, 10, n. 4, p. e0124418-e0124418, 2015.

LAPIERRE, M. P.; STOFFEL, M. MicroRNAs as stress regulators in pancreatic beta cells and diabetes. **Molecular metabolism**, 6, n. 9, p. 1010-1023, 2017.

LATREILLE, M. *et al.* MicroRNA-7a regulates pancreatic β cell function. **J Clin Invest**, 124, n. 6, p. 2722-2735, Jun 2014.

LATREILLE, M. *et al.* miR-375 gene dosage in pancreatic β-cells: implications for regulation of β-cell mass and biomarker development. **Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)**, 93, n. 10, p. 1159-1169, 2015.

LECLERCQ, I. A. *et al.* Insulin resistance in hepatocytes and sinusoidal liver cells: mechanisms and consequences. **J Hepatol**, 47, n. 1, p. 142-156, Jul 2007.

LEEUWENBURGH, C. *et al.* Aging and exercise training in skeletal muscle: responses of glutathione and antioxidant enzyme systems. **Am J Physiol**, 267, n. 2 Pt 2, p. R439-445, Aug 1994.

LEVEY, A. S. *et al.* Chronic kidney disease as a global public health problem: approaches and initiatives - a position statement from Kidney Disease Improving Global Outcomes. **Kidney Int**, 72, n. 3, p. 247-259, Aug 2007.

LI, G. D. *et al.* Extracellular ATP causes Ca2(+)-dependent and -independent insulin secretion in RINm5F cells. Phospholipase C mediates Ca2+ mobilization but not Ca2+ influx and membrane depolarization. **J Biol Chem**, 266, n. 6, p. 3449-3457, Feb 25 1991.

LI, X. *et al.* Gut Microbiota Dysbiosis Drives and Implies Novel Therapeutic Strategies for Diabetes Mellitus and Related Metabolic Diseases. **Frontiers in immunology**, 8, p. 1882-1882, 2017.

LI, X. *et al.* Islet microvasculature in islet hyperplasia and failure in a model of type 2 diabetes. **Diabetes**, 55, n. 11, p. 2965-2973, Nov 2006.

LI, Y. L. *et al.* Relationship of VEGF/VEGFR with immune and cancer cells: staggering or forward? **Cancer Biol Med**, 13, n. 2, p. 206-214, Jun 2016.

LIANG, H.; WARD, W. F. PGC-1alpha: a key regulator of energy metabolism. **Adv Physiol Educ**, 30, n. 4, p. 145-151, Dec 2006.

LIAO, P.-Y.; LEE, K. H. From SNPs to functional polymorphism: The insight into biotechnology applications. **Biochemical Engineering Journal**, 49, n. 2, p. 149-158, 2010/04/15/ 2010.

LIN, H.-Y. *et al.* The Causal Role of Mitochondrial Dynamics in Regulating Insulin Resistance in Diabetes: Link through Mitochondrial Reactive Oxygen Species. **Oxidative medicine and cellular longevity**, 2018, p. 7514383-7514383, 2018.

LIN, J. M. *et al.* Vascular endothelial growth factor gene polymorphisms in age-related macular degeneration. **Am J Ophthalmol**, 145, n. 6, p. 1045-1051, Jun 2008.

LINDER, K. *et al.* Allele Summation of Diabetes Risk Genes Predicts Impaired Glucose Tolerance in Female and Obese Individuals. **PLOS ONE**, 7, n. 6, p. e38224, 2012.

LIONETTI, L. *et al.* High-lard and high-fish-oil diets differ in their effects on function and dynamic behaviour of rat hepatic mitochondria. **PLoS One**, 9, n. 3, p. e92753, 2014.

LIU, L. L. *et al.* Type 1 and Type 2 Diabetes in Asian and Pacific Islander U.S. Youth: The SEARCH for Diabetes in Youth Study. **Diabetes Care**, 32, n. Supplement_2, p. S133-S140, 2009.

LIU, M. *et al.* Biosynthesis, structure, and folding of the insulin precursor protein. **Diabetes, obesity & metabolism**, 20 Suppl 2, n. Suppl 2, p. 28-50, 2018.

LIU, W. *et al.* Expression and characterization of a soluble VEGF receptor 2 protein. **Cell & Bioscience**, 4, n. 1, p. 14, 2014/03/11 2014.

LIU, Y. *et al.* Roles of three common VEGF polymorphisms in the risk of age-related macular degeneration. **Genetic testing and molecular biomarkers**, 18, n. 4, p. 245-252, 2014.

LIZANO, P. *et al.* VEGFA GENE variation influences hallucinations and frontotemporal morphology in psychotic disorders: a B-SNIP study. **Translational Psychiatry**, 8, n. 1, p. 215, 2018/10/11 2018.

LORQUET, S. *et al.* Soluble forms of VEGF receptor-1 and -2 promote vascular maturation via mural cell recruitment. **Faseb j**, 24, n. 10, p. 3782-3795, Oct 2010.

LUSTIG, K. D. *et al.* Expression cloning of an ATP receptor from mouse neuroblastoma cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 90, n. 11, p. 5113-5117, 1993.

LYNCH, J. *et al.* Moderately intense physical activities and high levels of cardiorespiratory fitness reduce the risk of non-insulin-dependent diabetes mellitus in middle-aged men. **Arch Intern Med**, 156, n. 12, p. 1307-1314, Jun 24 1996.

LYNCH, S. V.; PEDERSEN, O. The Human Intestinal Microbiome in Health and Disease. **N Engl J Med**, 375, n. 24, p. 2369-2379, Dec 15 2016.

MAHARAJ, A. S. *et al.* Vascular endothelial growth factor localization in the adult. **Am J Pathol**, 168, n. 2, p. 639-648, Feb 2006.

MAKI, K. C. *et al.* Validation of insulin sensitivity and secretion indices derived from the liquid meal tolerance test. **Diabetes Technol Ther**, 13, n. 6, p. 661-666, Jun 2011.

MANUEL FERNÁNDEZ-REAL, J. *et al.* Índice de masa corporal (IMC) y porcentaje de masa grasa: un IMC mayor de 27,5 kg/m2 podría suponer obesidad en la población española. **Medicina Clínica**, 117, n. 18, p. 681-684, 2001/01/01/ 2001.

MARTIN, A. *et al.* Abnormal angiogenesis in diabetes mellitus. **Med Res Rev**, 23, n. 2, p. 117-145, Mar 2003.

MATALLIOTAKI, C. *et al.* Implication of VEGFR2 in endometriosis: A structural biological and genetic approach. **World Acad Sci J**, 1, n. 6, p. 283-289, 2019/11/01 2019.

MATSUMOTO, K.; EMA, M. Roles of VEGF-A signalling in development, regeneration, and tumours. **J Biochem**, 156, n. 1, p. 1-10, Jul 2014.

MCCARTHY, M. I. Genomics, type 2 diabetes, and obesity. **N Engl J Med**, 363, n. 24, p. 2339-2350, Dec 9 2010.

MCCOLL, B. K. *et al.* Plasmin activates the lymphangiogenic growth factors VEGF-C and VEGF-D. **J Exp Med**, 198, n. 6, p. 863-868, Sep 15 2003.

MCKEIGUE, P. M. *et al.* Relation of central obesity and insulin resistance with high diabetes prevalence and cardiovascular risk in South Asians. **Lancet**, 337, n. 8738, p. 382-386, Feb 16 1991.

MELLADO-GIL, J. *et al.* Disruption of hepatocyte growth factor/c-Met signaling enhances pancreatic beta-cell death and accelerates the onset of diabetes. **Diabetes**, 60, n. 2, p. 525-536, Feb 2011.

MESHKANI, R.; ADELI, K. Hepatic insulin resistance, metabolic syndrome and cardiovascular disease. **Clin Biochem**, 42, n. 13-14, p. 1331-1346, Sep 2009.

MEYER, R. D. *et al.* A single amino acid substitution in the activation loop defines the decoy characteristic of VEGFR-1/FLT-1. **J Biol Chem**, 281, n. 2, p. 867-875, Jan 13 2006.

MEZA LETELIER, C. E. *et al.* [Pathophysiology of diabetic nephropathy: a literature review]. **Medwave**, 17, n. 1, p. e6839, Jan 12 2017.

MIAO, F. *et al.* In vivo chromatin remodeling events leading to inflammatory gene transcription under diabetic conditions. **J Biol Chem**, 279, n. 17, p. 18091-18097, Apr 23 2004.

MIHAYLOVA, B. *et al.* The effects of lowering LDL cholesterol with statin therapy in people at low risk of vascular disease: meta-analysis of individual data from 27 randomised trials. **Lancet**, 380, n. 9841, p. 581-590, Aug 11 2012.

MILLAUER, B. *et al.* Glioblastoma growth inhibited in vivo by a dominant-negative Flk-1 mutant. **Nature**, 367, n. 6463, p. 576-579, Feb 10 1994.

MILLAUER, B. *et al.* High affinity VEGF binding and developmental expression suggest Flk-1 as a major regulator of vasculogenesis and angiogenesis. **Cell**, 72, n. 6, p. 835-846, Mar 26 1993.

MILLER, J. W. *et al.* Vascular endothelial growth factor a in intraocular vascular disease. **Ophthalmology**, 120, n. 1, p. 106-114, Jan 2013.

MIZUNO, A. *et al.* Changes in islet capillary angioarchitecture coincide with impaired B-cell function but not with insulin resistance in male Otsuka-Long-Evans-Tokushima fatty rats: dimorphism of the diabetic phenotype at an advanced age. **Metabolism**, 48, n. 4, p. 477-483, Apr 1999.

MONTAL, E. D. *et al.* PEPCK Coordinates the Regulation of Central Carbon Metabolism to Promote Cancer Cell Growth. **Molecular cell**, 60, n. 4, p. 571-583, 2015.

MONTGOMERY, M. K.; TURNER, N. Mitochondrial dysfunction and insulin resistance: an update. **Endocr Connect**, 4, n. 1, p. R1-r15, Mar 2015.

MOORADIAN, A. D. Dyslipidemia in type 2 diabetes mellitus. **Nature Reviews Endocrinology**, 5, n. 3, p. 150-159, 2009/03/01 2009.

MOOTHA, V. K. *et al.* PGC-1α-responsive genes involved in oxidative phosphorylation are coordinately downregulated in human diabetes. **Nature Genetics**, 34, n. 3, p. 267-273, 2003/07/01 2003.

MORIYA, J.; FERRARA, N. Inhibiting the response to VEGF in diabetes. **Sci Signal**, 7, n. 307, p. pe1, Jan 7 2014.

MORIYA, J. *et al.* Inhibition of semaphorin as a novel strategy for therapeutic angiogenesis. **Circ Res**, 106, n. 2, p. 391-398, Feb 5 2010.

MORRIS, A. P. *et al.* Large-scale association analysis provides insights into the genetic architecture and pathophysiology of type 2 diabetes. **Nat Genet**, 44, n. 9, p. 981-990, Sep 2012.

MORUSSI, M. *et al.* Diabetic Nephropathy in Type 2 Diabetes Mellitus: Risk Factors and Prevention. **Arq Bras Endocrinol Metab**, 3, 47, p. 207-219, 2003.

MOSAMMAPARAST, N.; SHI, Y. Reversal of histone methylation: biochemical and molecular mechanisms of histone demethylases. **Annu Rev Biochem**, 79, p. 155-179, 2010.

MUKAI, E. *et al.* Enhanced vascular endothelial growth factor signaling in islets contributes to β cell injury and consequential diabetes in spontaneously diabetic Torii rats. **Diabetes Res Clin Pract**, 106, n. 2, p. 303-311, Nov 2014.

MULLER, Y. A. *et al.* The crystal structure of vascular endothelial growth factor (VEGF) refined to 1.93 A resolution: multiple copy flexibility and receptor binding. **Structure**, 5, n. 10, p. 1325-1338, Oct 15 1997.

NAKANISHI, K.; WATANABE, C. Single nucleotide polymorphisms of vascular endothelial growth factor gene intron 2 are markers for early progression of diabetic retinopathy in Japanese with type 1 diabetes. **Clin Chim Acta**, 402, n. 1-2, p. 171-175, Apr 2009.

NAMIKI, A. *et al.* Hypoxia induces vascular endothelial growth factor in cultured human endothelial cells. **J Biol Chem**, 270, n. 52, p. 31189-31195, Dec 29 1995.

NAMIPASHAKI, A. *et al.* The Essentiality of Reporting Hardy-Weinberg Equilibrium Calculations in Population-Based Genetic Association Studies. **Cell J**, 17, n. 2, p. 187-192, Summer 2015.

NANDY, D. *et al.* Both vascular endothelial growth factor and soluble Flt-1 are increased in type 2 diabetes but not in impaired fasting glucose. **J Investig Med**, 58, n. 6, p. 804-806, Aug 2010.

NCD-RISC. Worldwide trends in diabetes since 1980: a pooled analysis of 751 population-based studies with 4·4 million participants. **Lancet**, 387, p. 1513-1530, 2016.

NEIS, E. P. *et al.* The role of microbial amino acid metabolism in host metabolism. **Nutrients**, 7, n. 4, p. 2930-2946, Apr 16 2015.

NEUFELD, G. *et al.* Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. **Faseb j**, 13, n. 1, p. 9-22, Jan 1999.

NIEVES, B. J. *et al.* The function of vascular endothelial growth factor. **Biofactors**, 35, n. 4, p. 332-337, Jul-Aug 2009.

NISHI, A. *et al.* Integration of molecular pathology, epidemiology and social science for global precision medicine. **Expert Rev Mol Diagn**, 16, n. 1, p. 11-23, 2016.

NISHIKAWA, T. *et al.* Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. **Nature**, 404, n. 6779, p. 787-790, Apr 13 2000.

NISSEN, N. N. *et al.* Vascular endothelial growth factor mediates angiogenic activity during the proliferative phase of wound healing. **Am J Pathol**, 152, n. 6, p. 1445-1452, Jun 1998.

NIU, G. *et al.* Constitutive Stat3 activity up-regulates VEGF expression and tumor angiogenesis. **Oncogene**, 21, n. 13, p. 2000-2008, Mar 27 2002.

NOLAN, C. J. *et al.* Type 2 diabetes across generations: from pathophysiology to prevention and management. **Lancet**, 378, n. 9786, p. 169-181, Jul 9 2011.

NOURI, K. *et al.* Polymorphisms of VEGF and VEGF receptors are associated with the occurrence of ovarian hyperstimulation syndrome (OHSS)-a retrospective case-control study. **Journal of ovarian research**, 7, p. 54-54, 2014.

NOVAK, I. Mitophagy: a complex mechanism of mitochondrial removal. **Antioxid Redox Signal**, 17, n. 5, p. 794-802, Sep 1 2012.

NUSSEY, S.; WHITEHEAD, S. *In*: **Endocrinology: An Integrated Approach**. Oxford: BIOS Scientific Publishers
Copyright © 2001, BIOS Scientific Publishers Limited., 2001.

O'BRIEN, T. J. *et al.* Kinase insert domain receptor/vascular endothelial growth factor receptor 2 (KDR) genetic variation is associated with ovarian hyperstimulation syndrome. **Reproductive Biology and Endocrinology**, 12, n. 1, p. 36, 2014/05/09 2014.

OCHOA-REPÁRAZ, J.; KASPER, L. H. Gut microbiome and the risk factors in central nervous system autoimmunity. **FEBS letters**, 588, n. 22, p. 4214-4222, 2014.

OELRICHS, R. B. *et al.* NYK/FLK-1: a putative receptor protein tyrosine kinase isolated from E10 embryonic neuroepithelium is expressed in endothelial cells of the developing embryo. **Oncogene**, 8, n. 1, p. 11-18, Jan 1993.

OFORI, J. K. *et al.* Elevated miR-130a/miR130b/miR-152 expression reduces intracellular ATP levels in the pancreatic beta cell. **Sci Rep**, 7, p. 44986, Mar 23 2017.

OGAWA, S. *et al.* A novel type of vascular endothelial growth factor, VEGF-E (NZ-7 VEGF), preferentially utilizes KDR/Flk-1 receptor and carries a potent mitotic activity without heparin-binding domain. **J Biol Chem**, 273, n. 47, p. 31273-31282, Nov 20 1998.

OH, K. J. *et al.* CREB and FoxO1: two transcription factors for the regulation of hepatic gluconeogenesis. **BMB Rep**, 46, n. 12, p. 567-574, Dec 2013.

OLIVEIRA, C. *et al.* Polymorphisms in the 5'- and 3'-untranslated region of the VEGF gene and sporadic breast cancer risk and clinicopathologic characteristics. **Tumour Biol**, 32, n. 2, p. 295-300, Apr 2011.

OLSEN, A. S. *et al.* Heritable transmission of diabetic metabolic memory in zebrafish correlates with DNA hypomethylation and aberrant gene expression. **Diabetes**, 61, n. 2, p. 485-491, 2012.

OLSSON, A. K. *et al.* VEGF receptor signalling - in control of vascular function. **Nat Rev Mol Cell Biol**, 7, n. 5, p. 359-371, May 2006.

ORCI, L. *et al.* Localization of the pancreatic beta cell glucose transporter to specific plasma membrane domains. **Science**, 245, n. 4915, p. 295-297, Jul 21 1989.

PAJUSOLA, K. *et al.* FLT4 receptor tyrosine kinase contains seven immunoglobulin-like loops and is expressed in multiple human tissues and cell lines. **Cancer Res**, 52, n. 20, p. 5738-5743, Oct 15 1992.

PALLET, N. *et al.* Angiogenic response following renal ischemia reperfusion injury: new players. **Progrès en Urologie**, 24, p. S20-S25, 2014/06/01/ 2014.

PANDEY, A. K. *et al.* Mechanisms of VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) Inhibitor-Associated Hypertension and Vascular Disease. **Hypertension**, 71, n. 2, p. e1-e8, Feb 2018.

PAPAZOGLOU, D. *et al.* Vascular endothelial growth factor gene polymorphisms and idiopathic recurrent pregnancy loss. **Fertil Steril**, 83, n. 4, p. 959-963, Apr 2005.

PARK, K. H. *et al.* Circulating irisin in relation to insulin resistance and the metabolic syndrome. **The Journal of clinical endocrinology and metabolism**, 98, n. 12, p. 4899-4907, 2013.

PARTANEN, T. A. *et al.* VEGF-C and VEGF-D expression in neuroendocrine cells and their receptor, VEGFR-3, in fenestrated blood vessels in human tissues. **FASEB J**, 14, n. 13, p. 2087-2096, Oct 2000.

PATTI, M. E. *et al.* Coordinated reduction of genes of oxidative metabolism in humans with insulin resistance and diabetes: Potential role of PGC1 and NRF1. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 100, n. 14, p. 8466-8471, Jul 8 2003.

PAVLAKOVIC, H. *et al.* Soluble VEGFR-2: an antilymphangiogenic variant of VEGF receptors. **Ann N Y Acad Sci**, 1207 Suppl 1, n. Suppl 1, p. E7-15, Oct 2010.

PEACH, C. J. *et al.* Molecular Pharmacology of VEGF-A Isoforms: Binding and Signalling at VEGFR2. **Int J Mol Sci**, 19, n. 4, Apr 23 2018.

PEARSON, T. *et al.* The Effects of Insulin Resistance on Individual Tissues: An Application of a Mathematical Model of Metabolism in Humans. **Bull Math Biol**, 78, n. 6, p. 1189-1217, Jun 2016.

PEREIRA, R. The relation between Dyslipidemia and Diabetes Mellitus type 2. **Cadernos UniFOA**, 17, p. 89-93, 2011.

PETERSEN, K. F. *et al.* Mitochondrial dysfunction in the elderly: possible role in insulin resistance. **Science (New York, N.Y.)**, 300, n. 5622, p. 1140-1142, 2003.

PETERSEN, K. F.; SHULMAN, G. I. Cellular mechanism of insulin resistance in skeletal muscle. **Journal of the Royal Society of Medicine**, 95 Suppl 42, n. Suppl 42, p. 8-13, 2002.

PETERSEN, K. F.; SHULMAN, G. I. Pathogenesis of skeletal muscle insulin resistance in type 2 diabetes mellitus. **Am J Cardiol**, 90, n. 5a, p. 11g-18g, Sep 5 2002.

PHIELIX, E. *et al.* Lower intrinsic ADP-stimulated mitochondrial respiration underlies in vivo mitochondrial dysfunction in muscle of male type 2 diabetic patients. **Diabetes**, 57, n. 11, p. 2943-2949, Nov 2008.

PLATE, K. H. *et al.* Up-regulation of vascular endothelial growth factor and its cognate receptors in a rat glioma model of tumor angiogenesis. **Cancer Res**, 53, n. 23, p. 5822-5827, Dec 1 1993.

POLAK, K. *et al.* New markers of insulin resistance in polycystic ovary syndrome. **Journal of endocrinological investigation**, 40, n. 1, p. 1-8, 2017.

POROJAN, M. D. *et al.* The role of NOS2A -954G/C and vascular endothelial growth factor +936C/T polymorphisms in type 2 diabetes mellitus and diabetic nonproliferative retinopathy risk management. **Ther Clin Risk Manag**, 11, p. 1743-1748, 2015.

POROJAN, M. D. *et al.* The role of NOS2A -954G/C and vascular endothelial growth factor +936C/T polymorphisms in type 2 diabetes mellitus and diabetic nonproliferative retinopathy risk management. **Therapeutics and clinical risk management**, 11, p. 1743-1748, 2015.

POULTON, J. *et al.* Type 2 diabetes is associated with a common mitochondrial variant: evidence from a population-based case-control study. **Hum Mol Genet**, 11, n. 13, p. 1581-1583, Jun 15 2002.

POY, M. N. *et al.* miR-375 maintains normal pancreatic alpha- and beta-cell mass. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 106, n. 14, p. 5813-5818, 2009.

PRADHAN, A. D. *et al.* C-reactive protein, interleukin 6, and risk of developing type 2 diabetes mellitus. **Jama**, 286, n. 3, p. 327-334, Jul 18 2001.

PRATES, A. B. *et al.* Glomerular Filtration Evaluation Employing Serum Cystatin C Measurement. **J Bras Nefrol**, 1, 29, p. 48-55, 2007.

PRITCHARD-JONES, R. O. *et al.* Expression of VEGF(xxx)b, the inhibitory isoforms of VEGF, in malignant melanoma. **Br J Cancer**, 97, n. 2, p. 223-230, Jul 16 2007a.

PRITCHARD-JONES, R. O. *et al.* Expression of VEGFxxxb, the inhibitory isoforms of VEGF, in malignant melanoma. **British Journal of Cancer**, 97, n. 2, p. 223-230, 2007/07/01 2007b.

PYÖRÄLÄ, K. *et al.* Cholesterol lowering with simvastatin improves prognosis of diabetic patients with coronary heart disease. A subgroup analysis of the Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S). **Diabetes Care**, 20, n. 4, p. 614-620, Apr 1997.

QIU, S. *et al.* The Association between VEGFR Gene Polymorphisms and Stroke: A Meta-Analysis. **PLoS One**, 11, n. 3, p. e0151371, 2016.

QUINN, T. P. *et al.* Fetal liver kinase 1 is a receptor for vascular endothelial growth factor and is selectively expressed in vascular endothelium. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 90, n. 16, p. 7533-7537, Aug 15 1993.

QUIRÓS, P. M. *et al.* Loss of mitochondrial protease OMA1 alters processing of the GTPase OPA1 and causes obesity and defective thermogenesis in mice. **Embo j**, 31, n. 9, p. 2117-2133, May 2 2012.

RAHIMI, N. Vascular endothelial growth factor receptors: Molecular mechanisms of activation and therapeutic potentials. **Experimental Eye Research**, 83, n. 5, p. 1005-1016, 2006/11/01/ 2006.

REDDY, M. A.; NATARAJAN, R. Epigenetic mechanisms in diabetic vascular complications. **Cardiovascular research**, 90, n. 3, p. 421-429, 2011.

REDDY, M. A.; NATARAJAN, R. Epigenetic mechanisms in diabetic vascular complications. **Cardiovasc Res**, 90, n. 3, p. 421-429, Jun 1 2011.

REDDY, M. A. *et al.* Epigenetic mechanisms in diabetic complications and metabolic memory. **Diabetologia**, 58, n. 3, p. 443-455, Mar 2015.

REINERT, R. B. *et al.* Vascular endothelial growth factor-a and islet vascularization are necessary in developing, but not adult, pancreatic islets. **Diabetes**, 62, n. 12, p. 4154-4164, Dec 2013.

ROCA-RIVADA, A. *et al.* FNDC5/Irisin Is Not Only a Myokine but Also an Adipokine. **PLOS ONE**, 8, n. 4, p. e60563, 2013.

RODEN, M.; SHULMAN, G. I. The integrative biology of type 2 diabetes. **Nature**, 576, n. 7785, p. 51-60, Dec 2019.

RORSMAN, P.; ASHCROFT, F. M. Pancreatic β-Cell Electrical Activity and Insulin Secretion: Of Mice and Men. **Physiological reviews**, 98, n. 1, p. 117-214, 2018.

ROSEN, E. D. *et al.* Epigenetics and Epigenomics: Implications for Diabetes and Obesity. **Diabetes**, 67, n. 10, p. 1923-1931, 2018.

ROSEN, E. D.; SPIEGELMAN, B. M. Adipocytes as regulators of energy balance and glucose homeostasis. **Nature**, 444, n. 7121, p. 847-853, Dec 14 2006.

ROSKOSKI, R., Jr. VEGF receptor protein-tyrosine kinases: structure and regulation. **Biochem Biophys Res Commun**, 375, n. 3, p. 287-291, Oct 24 2008.

ROSS, R. Does Exercise Without Weight Loss Improve Insulin Sensitivity? **Diabetes Care**, 26, n. 3, p. 944-945, 2003.

RUGGIERO, D. *et al.* Genetics of VEGF Serum Variation in Human Isolated Populations of Cilento: Importance of VEGF Polymorphisms. **PLOS ONE**, 6, n. 2, p. e16982, 2011.

RUSZKOWSKA-CIASTEK, B. *et al.* A preliminary evaluation of VEGF-A, VEGFR1 and VEGFR2 in patients with well-controlled type 2 diabetes mellitus. **J Zhejiang Univ Sci B**, 15, n. 6, p. 575-581, Jun 2014.

SAEEDI, P. *et al.* Global and regional diabetes prevalence estimates for 2019 and projections for 2030 and 2045: Results from the International Diabetes Federation Diabetes Atlas, 9(th) edition. **Diabetes Res Clin Pract**, 157, p. 107843, Nov 2019.

SAIFULLAH; TSUKAHARA, T. Genotyping of single nucleotide polymorphisms using the SNP-RFLP method. **BioScience Trends**, 12, n. 3, p. 240-246, 2018.

SAIT, S. N. *et al.* The kinase insert domain receptor gene (KDR) has been relocated to chromosome 4q11-->q12. **Cytogenet Cell Genet**, 70, n. 1-2, p. 145-146, 1995.

SAJOVIC, J. *et al.* Vascular endothelial growth factor (VEGF)-related polymorphisms rs10738760 and rs6921438 are not risk factors for proliferative diabetic retinopathy (PDR) in patients with type 2 diabetes mellitus (T2DM). **Bosnian Journal of Basic Medical Sciences**, 19, n. 1, p. 94-100, 02/12 2019.

SANDIREDDY, R. *et al.* Neuroinflammation and oxidative stress in diabetic neuropathy: futuristic strategies based on these targets. **Int J Endocrinol**, 2014, p. 674987, 2014.

SARWAR, N. *et al.* Diabetes mellitus, fasting blood glucose concentration, and risk of vascular disease: a collaborative meta-analysis of 102 prospective studies. **Lancet**, 375, n. 9733, p. 2215-2222, Jun 26 2010.

SATOH, T. Molecular Mechanisms for the Regulation of Insulin-Stimulated Glucose Uptake by Small Guanosine Triphosphatases in Skeletal Muscle and Adipocytes. **International Journal of Molecular Sciences**, 15, n. 10, p. 18677-18692, 2014.

SATTAR, N.; GILL, J. M. Type 2 diabetes in migrant south Asians: mechanisms, mitigation, and management. **Lancet Diabetes Endocrinol**, 3, n. 12, p. 1004-1016, Dec 2015.

SATTAR, N. *et al.* Elevated alanine aminotransferase predicts new-onset type 2 diabetes independently of classical risk factors, metabolic syndrome, and C-reactive

protein in the west of Scotland coronary prevention study. **Diabetes**, 53, n. 11, p. 2855-2860, Nov 2004.

SAWANO, A. *et al.* Flt-1, vascular endothelial growth factor receptor 1, is a novel cell surface marker for the lineage of monocyte-macrophages in humans. **Blood**, 97, n. 3, p. 785-791, Feb 1 2001.

SAZANOV, L. A. A giant molecular proton pump: structure and mechanism of respiratory complex I. **Nat Rev Mol Cell Biol**, 16, n. 6, p. 375-388, Jun 2015.

SBD. **Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes 2017-2018**. 2017. 978-85-93746-02-4.

SBD. Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes 2019-2020. https://www.diabetes.org.br/profissionais/images/DIRETRIZES-COMPLETA-2019-2020.pdf: Clannad 2019.

SCARPELLINI, E.; TACK, J. Obesity and metabolic syndrome: an inflammatory condition. **Dig Dis**, 30, n. 2, p. 148-153, 2012.

SCHELLENBERG, E. S. *et al.* Lifestyle interventions for patients with and at risk for type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis. **Ann Intern Med**, 159, n. 8, p. 543-551, Oct 15 2013.

SCHERER, P. E. The many secret lives of adipocytes: implications for diabetes. **Diabetologia**, 62, n. 2, p. 223-232, Feb 2019.

SCHIEBER, M.; CHANDEL, N. S. ROS function in redox signaling and oxidative stress. **Curr Biol**, 24, n. 10, p. R453-462, May 19 2014.

SCHIEKOFER, S. *et al.* Impaired revascularization in a mouse model of type 2 diabetes is associated with dysregulation of a complex angiogenic-regulatory network. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, 25, n. 8, p. 1603-1609, Aug 2005.

SCHOFIELD, J. H.; SCHAFER, Z. T. Mitochondrial Reactive Oxygen Species and Mitophagy: A Complex and Nuanced Relationship. **Antioxid Redox Signal**, 34, n. 7, p. 517-530, Mar 1 2021.

SCHRAUWEN-HINDERLING, V. B. *et al.* Impaired in vivo mitochondrial function but similar intramyocellular lipid content in patients with type 2 diabetes mellitus and BMI-matched control subjects. **Diabetologia**, 50, n. 1, p. 113-120, Jan 2007.

SCHWARTZ, S. S. *et al.* The Time Is Right for a New Classification System for Diabetes: Rationale and Implications of the beta-Cell-Centric Classification Schema. **Diabetes Care**, 39, n. 2, p. 179-186, Feb 2016.

SEBASTIÁN, D. *et al.* Mitofusin 2 (Mfn2) links mitochondrial and endoplasmic reticulum function with insulin signaling and is essential for normal glucose homeostasis. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 109, n. 14, p. 5523-5528, Apr 3 2012.

SEINO, S. *et al.* Dynamics of insulin secretion and the clinical implications for obesity and diabetes. **The Journal of clinical investigation**, 121, n. 6, p. 2118-2125, 2011.

SERGI, D. *et al.* Mitochondrial (Dys)function and Insulin Resistance: From Pathophysiological Molecular Mechanisms to the Impact of Diet. **Frontiers in Physiology**, 10, 2019-May-03 2019. Review.

SEVER, P. S. *et al.* Reduction in cardiovascular events with atorvastatin in 2,532 patients with type 2 diabetes: Anglo-Scandinavian Cardiac Outcomes Trial--lipid-lowering arm (ASCOT-LLA). **Diabetes Care**, 28, n. 5, p. 1151-1157, May 2005.

SHAH, P. *et al.* Angiopoetin-2 Signals Do Not Mediate the Hypervascularization of Islets in Type 2 Diabetes. **PLOS ONE**, 11, n. 9, p. e0161834, 2016.

SHAHSAVARI, S. *et al.* Association of kinase insert domain-containing receptor (KDR) gene polymorphism/ haplotypes with recurrent spontaneous abortion and genetic structure. **Int J Reprod Biomed**, 13, n. 12, p. 755-764, Dec 2015.

SHAKHER, J.; STEVENS, M. J. Update on the management of diabetic polyneuropathies. **Diabetes Metab Syndr Obes**, 4, p. 289-305, 2011.

SHAMSUZZAMAN, A. S. *et al.* Independent association between plasma leptin and C-reactive protein in healthy humans. **Circulation**, 109, n. 18, p. 2181-2185, May 11 2004.

SHAN, Z. *et al.* Association between microbiota-dependent metabolite trimethylamine-N-oxide and type 2 diabetes. **Am J Clin Nutr**, 106, n. 3, p. 888-894, Sep 2017.

SHEPHERD, J. *et al.* Effect of lowering LDL cholesterol substantially below currently recommended levels in patients with coronary heart disease and diabetes: the Treating to New Targets (TNT) study. **Diabetes Care**, 29, n. 6, p. 1220-1226, Jun 2006.

SHI, G. J. *et al.* Involvement of growth factors in diabetes mellitus and its complications: A general review. **Biomed Pharmacother**, 101, p. 510-527, May 2018.

SHI, Q. *et al.* Constitutive Sp1 activity is essential for differential constitutive expression of vascular endothelial growth factor in human pancreatic adenocarcinoma. **Cancer Res**, 61, n. 10, p. 4143-4154, May 15 2001.

SHIBUYA, M. Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and Its Receptor (VEGFR) Signaling in Angiogenesis: A Crucial Target for Anti- and Pro-Angiogenic Therapies. **Genes Cancer**, 2, n. 12, p. 1097-1105, Dec 2011.

SHIBUYA, M. Vascular endothelial growth factor and its receptor system: physiological functions in angiogenesis and pathological roles in various diseases. **J Biochem**, 153, n. 1, p. 13-19, Jan 2013a.

SHIBUYA, M. VEGFR and type-V RTK activation and signaling. **Cold Spring Harb Perspect Biol**, 5, n. 10, p. a009092, Oct 1 2013b.

SHIBUYA, M.; CLAESSON-WELSH, L. Signal transduction by VEGF receptors in regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. **Exp Cell Res**, 312, n. 5, p. 549-560, Mar 10 2006.

SHIGENAGA, M. K. *et al.* Oxidative damage and mitochondrial decay in aging. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 91, n. 23, p. 10771-10778, 1994.

SHINKAI, A. *et al.* Mapping of the sites involved in ligand association and dissociation at the extracellular domain of the kinase insert domain-containing receptor for vascular endothelial growth factor. **J Biol Chem**, 273, n. 47, p. 31283-31288, Nov 20 1998.

SIMON, J. *et al.* Characterization of a P2Y purinoceptor in the brain. **Pharmacol Toxicol**, 76, n. 5, p. 302-307, May 1995.

SIMONEAU, J. A. *et al.* Markers of capacity to utilize fatty acids in human skeletal muscle: relation to insulin resistance and obesity and effects of weight loss. **Faseb j**, 13, n. 14, p. 2051-2060, Nov 1999.

SINGH, R. *et al.* Management of diabetic complications: a chemical constituents based approach. **J Ethnopharmacol**, 150, n. 1, p. 51-70, Oct 28 2013.

SINHA, R. *et al.* Assessment of Skeletal Muscle Triglyceride Content by 1H Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy in Lean and Obese Adolescents: Relationships to Insulin Sensitivity, Total Body Fat, and Central Adiposity. **Diabetes**, 51, n. 4, p. 1022-1027, 2002.

SIRCANA, A. *et al.* Altered Gut Microbiota in Type 2 Diabetes: Just a Coincidence? **Curr Diab Rep**, 18, n. 10, p. 98, Sep 13 2018.

SMITH, G. A. *et al.* The cellular response to vascular endothelial growth factors requires co-ordinated signal transduction, trafficking and proteolysis. **Biosci Rep**, 35, n. 5, Aug 18 2015.

SPINELLI, J. B.; HAIGIS, M. C. The multifaceted contributions of mitochondria to cellular metabolism. **Nat Cell Biol**, 20, n. 7, p. 745-754, Jul 2018.

STAELS, W. *et al.* VEGF-A and blood vessels: a beta cell perspective. **Diabetologia**, 62, n. 11, p. 1961-1968, Nov 2019.

STEVENS, A. *et al.* Haplotype analysis of the polymorphic human vascular endothelial growth factor gene promoter. **Cancer Res**, 63, n. 4, p. 812-816, Feb 15 2003.

STRASSER, B. Physical activity in obesity and metabolic syndrome. **Ann N Y Acad Sci**, 1281, n. 1, p. 141-159, Apr 2013.

STUMP, C. S. *et al.* Effect of insulin on human skeletal muscle mitochondrial ATP production, protein synthesis, and mRNA transcripts. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 100, n. 13, p. 7996-8001, 2003.

STUMVOLL, M. *et al.* Type 2 diabetes: principles of pathogenesis and therapy. **The Lancet**, 365, n. 9467, p. 1333-1346, 2005.

STUMVOLL, M. *et al.* Type 2 diabetes: principles of pathogenesis and therapy. **Lancet**, 365, n. 9467, p. 1333-1346, Apr 9-15 2005.

SUN, L. *et al.* VEGF genetic polymorphisms may contribute to the risk of diabetic nephropathy in patients with diabetes mellitus: a meta-analysis. **ScientificWorldJournal**, 2014, p. 624573, 2014.

SZAFLIK, J. P. *et al.* An association between vascular endothelial growth factor gene promoter polymorphisms and diabetic retinopathy. **Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol**, 246, n. 1, p. 39-43, Jan 2008.

SZCZEPAŃSKA, M. *et al.* Involvement of vascular endothelial growth factor -460 C/T, +405 G/C and +936 C/T polymorphisms in the development of endometriosis. **Biomed Rep**, 3, n. 2, p. 220-224, 2015/03/01 2015.

TABIT, C. E. *et al.* Endothelial dysfunction in diabetes mellitus: molecular mechanisms and clinical implications. **Rev Endocr Metab Disord**, 11, n. 1, p. 61-74, Mar 2010.

TAKAHASHI, T. *et al.* Ischemia- and cytokine-induced mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells for neovascularization. **Nat Med**, 5, n. 4, p. 434-438, Apr 1999.

TAN, J. *et al.* The role of short-chain fatty acids in health and disease. **Adv Immunol**, 121, p. 91-119, 2014.

TAN, K. C. *et al.* Advanced glycation end products and endothelial dysfunction in type 2 diabetes. **Diabetes Care**, 25, n. 6, p. 1055-1059, Jun 2002.

TANG, C. *et al.* Loss of FFA2 and FFA3 increases insulin secretion and improves glucose tolerance in type 2 diabetes. **Nat Med**, 21, n. 2, p. 173-177, Feb 2015.

TANG, D. L. *et al.* Variation of mitochondrial gene and the association with type 2 diabetes mellitus in a Chinese population. **Diabetes Res Clin Pract**, 73, n. 1, p. 77-82, Jul 2006.

TASAKI, Y. *et al.* Expression of VEGF and its receptors in the bovine endometrium throughout the estrous cycle: effects of VEGF on prostaglandin production in endometrial cells. **J Reprod Dev**, 56, n. 2, p. 223-229, Apr 2010.

TAWATA, M. *et al.* A new mitochondrial DNA mutation at 14577 T/C is probably a major pathogenic mutation for maternally inherited type 2 diabetes. **Diabetes**, 49, n. 7, p. 1269-1272, Jul 2000.

TAWATA, M. *et al.* New mitochondrial DNA homoplasmic mutations associated with Japanese patients with type 2 diabetes. **Diabetes**, 47, n. 2, p. 276-277, Feb 1998.

TEMELKOVA-KURKTSCHIEV, T.; STEFANOV, T. Lifestyle and genetics in obesity and type 2 diabetes. **Exp Clin Endocrinol Diabetes**, 120, n. 1, p. 1-6, Jan 2012.

TEPPER, O. M. *et al.* Adult vasculogenesis occurs through in situ recruitment, proliferation, and tubulization of circulating bone marrow-derived cells. **Blood**, 105, n. 3, p. 1068-1077, Feb 1 2005.

THANIGAIMANI, S. *et al.* The Emerging Role of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) in Vascular Homeostasis: Lessons from Recent Trials with Anti-VEGF Drugs. **Current Vascular Pharmacology**, 9, n. 3, p. 358-380, 2011.

THOMPSON, J. A.; WEBB, R. C. Potential role of Toll-like receptors in programming of vascular dysfunction. **Clin Sci (Lond)**, 125, n. 1, p. 19-25, Mar 13 2013.

TISCHER, E. *et al.* The human gene for vascular endothelial growth factor. Multiple protein forms are encoded through alternative exon splicing. **J Biol Chem**, 266, n. 18, p. 11947-11954, Jun 25 1991.

TITCHENELL, P. M. *et al.* Unraveling the Regulation of Hepatic Metabolism by Insulin. **Trends Endocrinol Metab**, 28, n. 7, p. 497-505, Jul 2017.

TURNER, R. C. *et al.* Glycemic control with diet, sulfonylurea, metformin, or insulin in patients with type 2 diabetes mellitus: progressive requirement for multiple therapies (UKPDS 49). UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. **Jama**, 281, n. 21, p. 2005-2012, Jun 2 1999.

UCHIDA, K. *et al.* Glomerular endothelial cells in culture express and secrete vascular endothelial growth factor. **Am J Physiol**, 266, n. 1 Pt 2, p. F81-88, Jan 1994.

USHIO-FUKAI, M. *et al.* Novel role of gp91(phox)-containing NAD(P)H oxidase in vascular endothelial growth factor-induced signaling and angiogenesis. **Circ Res**, 91, n. 12, p. 1160-1167, Dec 13 2002.

UTHRA, S. *et al.* Association of VEGF gene polymorphisms with diabetic retinopathy in a south Indian cohort. **Ophthalmic Genet**, 29, n. 1, p. 11-15, Mar 2008.

VALERA, S. *et al.* A new class of ligand-gated ion channel defined by P2x receptor for extracellular ATP. **Nature**, 371, n. 6497, p. 516-519, Oct 6 1994.

VAN NIEUWENHOVEN, F. A. *et al.* Imbalance of growth factor signalling in diabetic kidney disease: is connective tissue growth factor (CTGF, CCN2) the perfect intervention point? **Nephrol Dial Transplant**, 20, n. 1, p. 6-10, Jan 2005.

VAN SCHAFTINGEN, E.; GERIN, I. The glucose-6-phosphatase system. **The Biochemical journal**, 362, n. Pt 3, p. 513-532, 2002.

VANDANMAGSAR, B. *et al.* The NLRP3 inflammasome instigates obesity-induced inflammation and insulin resistance. **Nature medicine**, 17, n. 2, p. 179-188, 2011.

VED, N. *et al.* Vascular endothelial growth factor-A(165)b ameliorates outer-retinal barrier and vascular dysfunction in the diabetic retina. **Clin Sci (Lond)**, 131, n. 12, p. 1225-1243, Jun 1 2017.

VENKATASAMY, V. V. *et al.* Effect of Physical activity on Insulin Resistance, Inflammation and Oxidative Stress in Diabetes Mellitus. **J Clin Diagn Res**, 7, n. 8, p. 1764-1766, Aug 2013.

VENKATASAMY, V. V. *et al.* Effect of Physical activity on Insulin Resistance, Inflammation and Oxidative Stress in Diabetes Mellitus. **Journal of clinical and diagnostic research : JCDR**, 7, n. 8, p. 1764-1766, 2013.

VINCENTI, V. *et al.* Assignment of the vascular endothelial growth factor gene to human chromosome 6p21.3. **Circulation**, 93, n. 8, p. 1493-1495, Apr 15 1996.

VOZAROVA, B. *et al.* High Alanine Aminotransferase Is Associated With Decreased Hepatic Insulin Sensitivity and Predicts the Development of Type 2 Diabetes. **Diabetes**, 51, n. 6, p. 1889-1895, 2002.

WAHID, F. *et al.* MicroRNAs: synthesis, mechanism, function, and recent clinical trials. **Biochim Biophys Acta**, 1803, n. 11, p. 1231-1243, Nov 2010.

WALTENBERGER, J. VEGF resistance as a molecular basis to explain the angiogenesis paradox in diabetes mellitus. **Biochem Soc Trans**, 37, n. Pt 6, p. 1167-1170, Dec 2009.

WALTENBERGER, J. *et al.* Different signal transduction properties of KDR and Flt1, two receptors for vascular endothelial growth factor. **Journal of Biological Chemistry**, 269, n. 43, p. 26988-26995, 1994/10/28/ 1994a.

WALTENBERGER, J. *et al.* Different signal transduction properties of KDR and Flt1, two receptors for vascular endothelial growth factor. **J Biol Chem**, 269, n. 43, p. 26988-26995, Oct 28 1994b.

WANG, D. *et al.* Association of the mitochondrial DNA 5178A/C polymorphism with maternal inheritance and onset of type 2 diabetes in Japanese patients. **Exp Clin Endocrinol Diabetes**, 109, n. 7, p. 361-364, 2001.

WANG, H. *et al.* Meta-analysis of association between the -2578C/A polymorphism of the vascular endothelial growth factor and retinopathy in type 2 diabetes in Asians and Caucasians. **Ophthalmic Res**, 52, n. 1, p. 1-8, 2014.

WANG, L. *et al.* A meta-analysis of the relationship between VEGFR2 polymorphisms and atherosclerotic cardiovascular diseases. **Clin Cardiol**, 42, n. 10, p. 860-865, Oct 2019.

WANG, Y. *et al.* Polymorphisms of KDR Gene Are Associated With Coronary Heart Disease. **Journal of the American College of Cardiology**, 50, p. 760-767, 09/01 2007a.

WANG, Y. *et al.* Polymorphisms of KDRGene Are Associated With Coronary Heart Disease. **Journal of the American College of Cardiology**, 50, n. 8, p. 760-767, 2007/08/21/ 2007b.

WARREN, C. M. *et al.* A ligand-independent VEGFR2 signaling pathway limits angiogenic responses in diabetes. **Sci Signal**, 7, n. 307, p. ra1, Jan 7 2014.

WASADA, T. *et al.* Plasma concentration of immunoreactive vascular endothelial growth factor and its relation to smoking. **Metabolism**, 47, n. 1, p. 27-30, Jan 1998.

WATADA, H. Role of VEGF-A in pancreatic beta cells. **Endocr J**, 57, n. 3, p. 185-191, 2010.

WATSON, C. J. *et al.* Identification of polymorphisms within the vascular endothelial growth factor (VEGF) gene: correlation with variation in VEGF protein production. **Cytokine**, 12, n. 8, p. 1232-1235, Aug 2000.

WATSON, C. J. *et al.* IDENTIFICATION OF POLYMORPHISMS WITHIN THE VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR (VEGF) GENE: CORRELATION WITH VARIATION IN VEGF PROTEIN PRODUCTION. **Cytokine**, 12, n. 8, p. 1232-1235, 2000/08/01/ 2000.

WEI, H. *et al.* Selective removal of mitochondria via mitophagy: distinct pathways for different mitochondrial stresses. **Biochim Biophys Acta**, 1853, n. 10 Pt B, p. 2784-2790, Oct 2015.

WEINSTEIN, A. R. *et al.* Relationship of Physical Activity vs Body Mass Index With Type 2 Diabetes in Women. **JAMA**, 292, n. 10, p. 1188-1194, 2004.

WESTERMANN, B. Mitochondrial fusion and fission in cell life and death. **Nat Rev Mol Cell Biol**, 11, n. 12, p. 872-884, Dec 2010.

WIECZÓR, R. *et al.* Impact of type 2 diabetes on the plasma levels of vascular endothelial growth factor and its soluble receptors type 1 and type 2 in patients with peripheral arterial disease. **J Zhejiang Univ Sci B**, 16, n. 11, p. 948-956, Nov 2015.

WIECZÓR, R. *et al.* Overweight and obesity versus concentrations of VEGF-A, sVEGFR-1, and sVEGFR-2 in plasma of patients with lower limb chronic ischemia. **J Zhejiang Univ Sci B**, 17, n. 11, p. 842-849, Nov. 2016.

WIGGINTON, J. E. *et al.* A Note on Exact Tests of Hardy-Weinberg Equilibrium. **The American Journal of Human Genetics**, 76, n. 5, p. 887-893, 2005.

WILCOX, G. Insulin and insulin resistance. **Clin Biochem Rev**, 26, n. 2, p. 19-39, May 2005.

WIROSTKO, B. *et al.* Vascular endothelial growth factor and diabetic complications. **Prog Retin Eye Res**, 27, n. 6, p. 608-621, Nov 2008.

WITMER, A. N. *et al.* Expression of vascular endothelial growth factor receptors 1, 2, and 3 in quiescent endothelia. **J Histochem Cytochem**, 50, n. 6, p. 767-777, Jun 2002.

WONG, N. D. *et al.* Cardiovascular Risk Factor Targets and Cardiovascular Disease Event Risk in Diabetes: A Pooling Project of the Atherosclerosis Risk in Communities Study, Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis, and Jackson Heart Study. **Diabetes Care**, 39, n. 5, p. 668-676, May 2016.

WOOLARD, J. *et al.* Molecular diversity of VEGF-A as a regulator of its biological activity. **Microcirculation**, 16, n. 7, p. 572-592, Oct 2009.

WU, H.; BALLANTYNE, C. M. Skeletal muscle inflammation and insulin resistance in obesity. **J Clin Invest**, 127, n. 1, p. 43-54, Jan 3 2017.

YAMAMOTO, W. R. *et al.* Endoplasmic reticulum stress alters ryanodine receptor function in the murine pancreatic β cell. **The Journal of biological chemistry**, 294, n. 1, p. 168-181, 2019.

YAMAZAKI, Y. *et al.* Snake venom Vascular Endothelial Growth Factors (VEGF-Fs) exclusively vary their structures and functions among species. **J Biol Chem**, 284, n. 15, p. 9885-9891, Apr 10 2009.

YAN, Y. *et al.* Vascular endothelial growth factor +936C/T polymorphism and breast cancer risk: a meta-analysis of 13 case-control studies. **Tumour Biol**, 35, n. 3, p. 2687-2692, Mar 2014.

YANG, B. T. *et al.* Increased DNA methylation and decreased expression of PDX-1 in pancreatic islets from patients with type 2 diabetes. **Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)**, 26, n. 7, p. 1203-1212, 2012.

YANG, L. *et al.* Defective hepatic autophagy in obesity promotes ER stress and causes insulin resistance. **Cell Metab**, 11, n. 6, p. 467-478, Jun 9 2010.

YANG, Q. *et al.* Association of VEGF Gene Polymorphisms with Susceptibility to Diabetic Retinopathy: A Systematic Review and Meta-Analysis. **Horm Metab Res**, 52, n. 5, p. 264-279, May 2020.

YANG, X. *et al.* Polymorphisms in the vascular endothelial growth factor gene and the risk of diabetic retinopathy in Chinese patients with type 2 diabetes. **Mol Vis**, 17, p. 3088-3096, 2011.

YE, X. *et al.* Altered ratios of pro- and anti-angiogenic VEGF-A variants and pericyte expression of DLL4 disrupt vascular maturation in infantile haemangioma. **J Pathol**, 239, n. 2, p. 139-151, Jun 2016.

YOUSSOUFIAN, H. *et al.* Review: monoclonal antibodies to the vascular endothelial growth factor receptor-2 in cancer therapy. **Clin Cancer Res**, 13, n. 18 Pt 2, p. 5544s-5548s, Sep 15 2007.

ZARBOCK, R. *et al.* Vascular endothelial growth factor gene polymorphisms as prognostic markers for ocular manifestations in pseudoxanthoma elasticum. **Human Molecular Genetics**, 18, n. 17, p. 3344-3351, 2009.

ZENG, Y. *et al.* Association between a vascular endothelial growth factor gene polymorphism (rs2146323) and diabetic retinopathy: a meta-analysis. **BMC Ophthalmol**, 15, p. 163, Nov 9 2015.

ZHANG, W. *et al.* VEGF Receptor-2 Variants Are Associated With Susceptibility to Stroke and Recurrence. **Stroke**, 40, n. 8, p. 2720-2726, 2009.

ZHANG, Y. *et al.* Glycosylated hemoglobin in relationship to cardiovascular outcomes and death in patients with type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis. **PLoS One**, 7, n. 8, p. e42551, 2012.

ZHENG, Q. *et al.* Association study between of Tie2/angiopoietin-2 and VEGF/KDR pathway gene polymorphisms and vascular malformations. **Gene**, 523, n. 2, p. 195-198, Jul 10 2013.

ZHENG, Y. *et al.* Global aetiology and epidemiology of type 2 diabetes mellitus and its complications. **Nature Reviews Endocrinology**, 14, n. 2, p. 88-98, 2018/02/01 2018.

ZHOU, L. P. *et al.* Vascular endothelial growth factor +936C/T polymorphism and gastric cancer risk: A meta-analysis. **Exp Ther Med**, 2, n. 5, p. 931-936, Sep 2011.

ZHOU, Z. *et al.* Serum fetuin-A concentrations are positively associated with serum VEGF levels in patients with newly diagnosed type 2 diabetes. **Endocrine Journal**, 62, n. 10, p. 879-885, 2015.

ZWICK, E. *et al.* Receptor tyrosine kinase signalling as a target for cancer intervention strategies. **Endocr Relat Cancer**, 8, n. 3, p. 161-173, Sep 2001.

ANEXO 1 – TERMO DE APROVAÇÃO DO COMITE DE ÉTICA

Plataforma Brasil - Ministério da Saúde

Universidade Federal do Paraná - Setor de Ciências da Saúde/ SCS - UFPR

PROJETO DE PESQUISA

Título: Isoformas solúveis do receptor de produtos de glicação avançada (sRAGE) no Diabetes mellitus tipos 1, 2 e gestacional.
Pesquisador: Mauren Isfer Anghebem Oliveira **Versão:** 1
Instituição: Universidade Federal do Paraná - Setor de Ciências da Saúde/ SCS
CAAE: 01038112.0.0000.0102

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Número do Parecer: 7186
Data da Relatoria: *28/03/2012*

Apresentação do Projeto:
É um estudo caso-controle para análise de determinadas proteínas (sRAGE) com retirada de sangue em sujeitos portadores de diabetes mellitus tipo I (n=100), tipo 11 (n= 100) e gestacional (n=100), recrutados na Unidade de Diabetes do Serviço de Endocrinologia e Metabologia do Hospital de Clínicas (HC) da UFPRSEMPR, além de um grupo controle (n=300) composto de voluntários recrutados também no Hospital de Clínicas da UFPR. Para análises de dados da história clínica, biométricos dos sujeitos, os pesquisadores terão acesso ao prontuário dos sujeitos. As sRAGE encontram-se ligadas a complicações vasculares da diabetes, tendo portanto grande importância na compreensão da fisiopatologia da diabetes e de seu tratamento.

Objetivo da Pesquisa:
O objetivo principal da pesquisa é identificar novos biomarcadores de risco/proteção associados à presença e concentração das isoformas solúveis do receptor para produtos finais de glicação avançada (sRAGE) em portadores de diabetes mellitus tipo I, " ou gestacional. Há o objetivo também de criar um biorepositório.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:
O projeto detalha de forma clara os riscos e os benefícios da pesquisa. Os riscos consistem nos riscos de um exame de sangue padrão (dor, incômodo, hematoma). Este exame já é feito de rotina nos pacientes portadores de Diabetes do HC, a amostra podendo ser utilizada para a pesquisa mediante o TCLE. Os benefícios são descritos claramente no projeto, assim como nos seus dois TCLE (para portadores de diabetes e controles).

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:
A pesquisa faz parte de um projeto de Doutorado em Farmácia e Bioquímica. Ela apresenta metodologia sólida, conforme descrito na análise de mérito criteriosa. Ela faz parte da formação de um biorepositório, nos TCLE está explicitado que as amostras poderão ser utilizadas em pesquisas posteriores.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:
Todos os documentos necessários foram apresentados. Os TCLE precisam ser modificados para se adequar a legislação sobre biorepositórios.

Recomendações:
O item g dos TCLE tem de ser modificado. Como se trata de uma pesquisa que cria um biorepositório e não biobanco, todas as novas pesquisas necessitarão de TCLE. O TCLE deve ser modificado para se adequar às considerações descritas acima.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:
Explicar que se trata da criação de um biorepositório nos objetivos. O Projeto de pesquisa pode ser aprovado, se este se adequar a legislação sobre biorepositórios, com modificações no TCLE.
Citar os riscos no TCLE da armazenagem do material biológico.

No TCLE deve-se descrever caso alguma descoberta seja feita referente à pesquisa, os sujeitos tem o direito de saber ou se recusar a saber o resultado da pesquisa.
Cada nova pesquisa necessitará de novo TCLE.
Deve-se descrever no TCLE por quanto tempo a amostra será guardada e como será descartada (ex: riscos ao meio ambiente?).

Situação do Parecer:
Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:
Não

Considerações Finais a critério do CEP:
Não há considerações.
Instituição Co-Participante: Hospital de Clinicas da UFPR.

CURITIBA, 16 de Abril de 2012

Assinado por: Claudia Seely Rocco

ANEXO 2 – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE) ASSINADO PELOS PARTICIPANTES DA PESQUISA

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Nós, Mauren Isfer Anghebem Oliveira e Geraldo Picheth, pesquisadores da Universidade Federal do Paraná, estamos convidando você, paciente com diabetes atendido no Serviço de Endocrinologia Diabética do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná, a participar de um estudo intitulado "Isoformas solúveis do receptor de produtos de glicação avançada (sRAGE) no Diabetes *mellitus* tipos 1, 2 e gestacional", que vai pesquisar a presença de formas solúveis desse receptor no seu sangue. É através de pesquisas como esta que ocorrem os avanços na medicina e sua participação é de fundamental importância.

a) O objetivo desta pesquisa é procurar novos exames para melhor controlar e monitorar o paciente com diabetes e ainda conhecer os fatores que levam o paciente diabético a ter maior ou menor risco para complicações vasculares, como o pé diabético, a cegueira e o infarto do coração.

b) Caso você participe da pesquisa, seus dados pessoais biométricos (como idade, peso, altura) e dados sobre resultados de exames (exames de sangue, histórico clínico) serão repassados para os pesquisadores pelo seu médico. Além disso, será necessário coletar uma amostra de seu sangue.

c) O sangue será coletado durante o procedimento de coleta de rotina do serviço da Unidade de Endocrinologia Diabética do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná - (Rua General Carneiro, 181, Curitiba-PR), após sua consulta médica, sem necessidade de coleta específica para a pesquisa.

d) É possível que você experimente algum desconforto, principalmente relacionado à agulhada da coleta de sangue.

e) Alguns riscos relacionados ao estudo podem ser: dor e aparecimento de pequenos hematomas no local da coleta de sangue, que desaparecerão com o tempo.

f) Os benefícios esperados com essa pesquisa são: 1) melhor conhecimento de doenças que atingem muitos indivíduos como o Diabetes *mellitus* tipos 1, 2 e gestacional, 2) a expectativa do desenvolvimento de novos ensaios laboratoriais que permitam um melhor diagnóstico e acompanhamento sobre o diabetes, 3) novas associações entre a presença das formas do receptor que pretendemos estudar e as complicações do diabetes. No entanto, nem sempre você será diretamente beneficiado com o resultado da pesquisa, mas poderá contribuir para o avanço científico.

g) Caso você autorize, seu sangue será armazenado corretamente e poderá ser utilizado em outras pesquisas semelhantes a esta, que buscam aumentar o conhecimento sobre doenças como o diabetes e melhorar a qualidade de vida dos pacientes. Toda nova pesquisa a ser feita com o seu material armazenado será submetida à apreciação do Comitê de Ética em Pesquisa, e a cada nova pesquisa, o sujeito será contatado para consentir novo uso de sua amostra, o qual será formalizado através de um TCLE específico.

h) Sua amostra de sangue será armazenada por até 10 anos, mas poderá ser descartada devido à inadequação da amostra por critérios de qualidade. Neste caso, a amostra será colocada em recipientes apropriados e será descartada seguindo normas bem definidas, sem causar riscos a saúde de ninguém, tampouco ao meio ambiente.

Rubricas:
Sujeito da Pesquisa e /ou responsável legal_____
Pesquisador Responsável _____
Orientador_____Orientado_____

Comitê de Ética em Pesquisa do Setor de Ciências da Saúde da UFPR
Telefone: (41) 3360-7259 e-mail: cometica.saude@ufpr.br

a) Os pesquisadores responsáveis por este estudo: Mauren Isfer Anghebem Oliveira (mauren.isfer@ufpr.br) e Geraldo Picheth (gpicheth@ufpr.br), farmacêuticos, poderão ser contatados de segunda a sexta-feira, das 14 às 18h, no Laboratório de Bioquímica Clínica da Universidade Federal do Paraná, sito à Rua Lothário Meissner, 632 – Jardim Botânico, Curitiba – PR, ou pelo telefone (41) 3360-4068, para esclarecer eventuais dúvidas que você possa ter e fornecer-lhe as informações que queira, antes, durante ou depois de encerrado o estudo.

b) A sua participação neste estudo é voluntária e se você não quiser mais fazer parte da pesquisa poderá desistir a qualquer momento e solicitar que lhe devolvam o termo de consentimento livre e esclarecido assinado. A sua recusa não implicará na interrupção de seu atendimento e/ou tratamento no serviço de Endocrinologia Diabética, que está assegurado.

l) As informações relacionadas ao estudo poderão ser conhecidas por pessoas autorizadas, como seu médico. No entanto, se qualquer informação for divulgada em relatório ou publicação, isto será feito através de códigos, para que a sua identidade seja preservada e seja mantida a confidencialidade.

m) As despesas necessárias para a realização da pesquisa (exames laboratoriais) não são de sua responsabilidade e pela sua participação no estudo você não receberá qualquer valor em dinheiro. Você terá a garantia de que problemas como: hematomas e dor no local da punção para coleta do sangue decorrentes do estudo serão tratados no próprio serviço de Endocrinologia Diabética do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná - (Rua General Carneiro, 181, Curitiba-PR).

n) Quando os resultados forem publicados, não aparecerá seu nome, e sim um código.

o) Caso alguma descoberta seja feita referente à pesquisa, você terá o direito de saber ou se recusar a saber o resultado.

Eu,_____ li esse termo de consentimento e compreendi a natureza e objetivo do estudo do qual concordei em participar. A explicação que recebi menciona os riscos e benefícios. Eu entendi que sou livre para interromper minha participação a qualquer momento sem justificar minha decisão e sem que esta decisão afete meu tratamento. Eu entendi o que não posso fazer durante a pesquisa e fui informado que serei atendido sem custos para mim se eu apresentar algum problema dos relacionados no item "e". Em relação ao item "o", eu _____ (desejo/ não desejo) saber os resultados/descobertas feitas referentes à pesquisa.

Eu concordo voluntariamente em participar deste estudo, e autorizo a coleta, o armazenamento e guarda do meu sangue para futuras pesquisas, sabendo que a cada nova pesquisa, serei contatado para consentir ou não o novo uso de minha amostra, o qual será formalizado através de um TCLE específico.

_____
(Assinatura do sujeito de pesquisa ou responsável legal)

_____
Local e data

_____
Assinatura do Pesquisador

Comitê de Ética em Pesquisa do Setor de Ciências da Saúde da UFPR
Telefone: (41) 3360-7259 e-mail: cometica.saude@ufpr.br

ANEXO 3 – QUESTIONÁRIO APLICADO AOS INDIVÍDUOS PARTICIPANTES DA PESQUISA

Planilha de coleta de dados:

Caracterização do Paciente		Data
Registro HC:		/ /
Nome:		

Dados clínicos

N	Dados	Obs.
1	Idade	[.] anos
2	Peso	[ ]kg
3	Altura	[ ] cm
4	Etnia	(1)= Euro brasileiro (2)= Afro brasileiro (3)= Índio (4)= Oriental
5	Tipo de Diabetes	(1)= Tipo 1 (2)= Tipo 2 Tempo do início do DM; _____ anos
6	Pressão Arterial (PA)	[_____/_____] mmHg Medicamentos para pressão:
7	Tabagismo	(1) = Nunca fumou (2) = Ex-fumante (3) = Fumante
8	Histórico Obesidade	(1)= Sim (2)= Não pessoal
9	História familiar de diabetes	Pais: (1) = Sim (2) = Não Avós: (1) = Sim (2) = Não Demais familiares: (1)=Sim (2)= Não Quais:
10	História familiar de DAC	Pais: (1)= Sim (2) Não Avós: (1)= Sim (2)= Não Demais familiares: (1)= Sim (2)= Não
11	História familiar de Doença Tireoideana	Pais: (1)= Sim (2) Não Avós: (1)= Sim (2)= Não Demais familiares: (1)= Sim (2)= Não
12	Medicamentos:	Descrever: Hipolipemiante Tireóide Hipoglicemiante: Insulina:
13	Exames:	Glicemia de jejum: TOTG: Perfil: Pós-prandial: Hb glicada: Creatinina Microalbuminúria: TSH: aTG aTPO Outros:
14	Outras patologias:	Doenças Autoimunes: (1)= Sim (2)= Não
15	Outras observações	