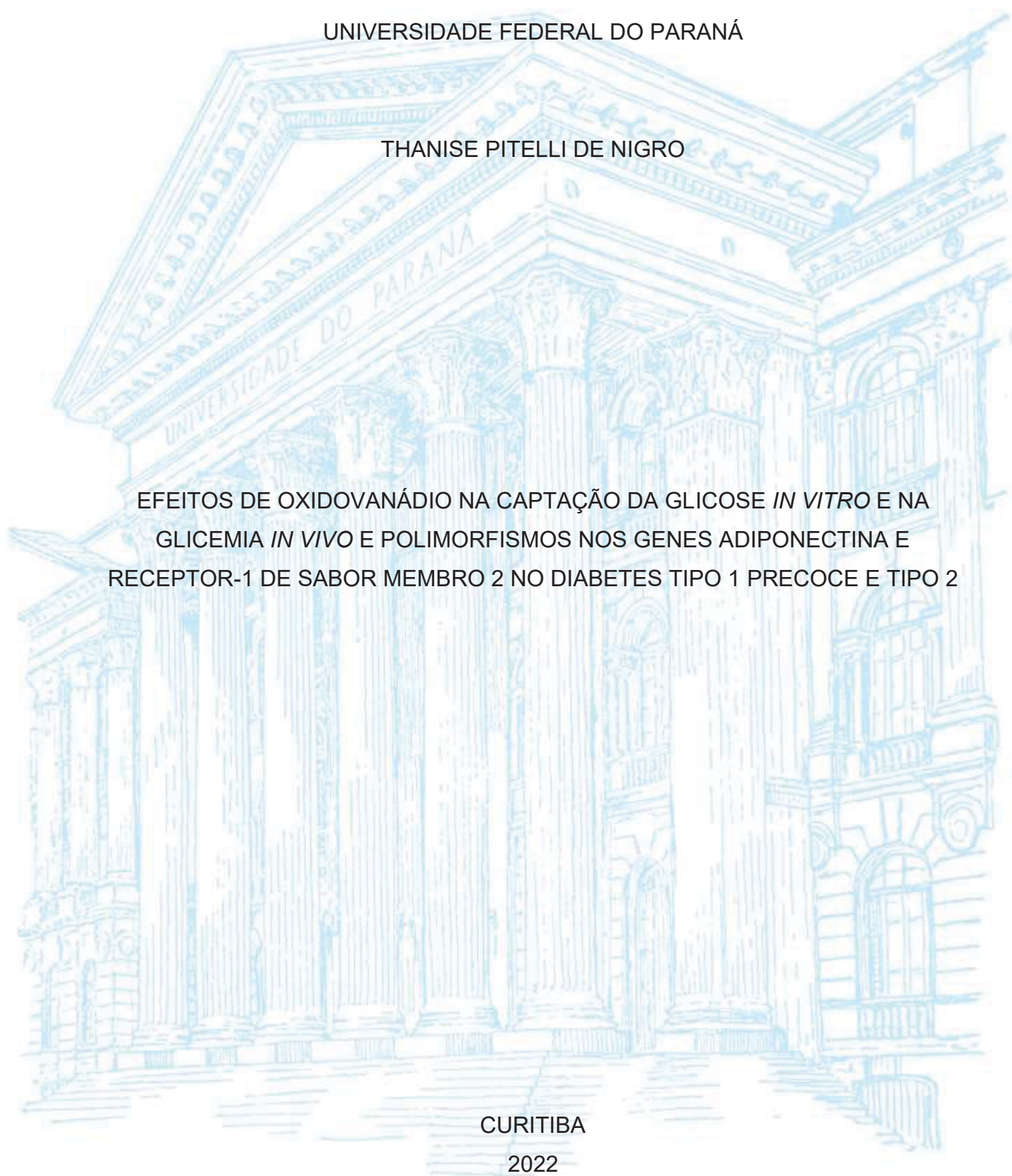




UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

THANISE PITELLI DE NIGRO

EFEITOS DE OXIDOVANÁDIO NA CAPTAÇÃO DA GLICOSE *IN VITRO* E NA
GLICEMIA *IN VIVO* E POLIMORFISMOS NOS GENES ADIPONECTINA E
RECEPTOR-1 DE SABOR MEMBRO 2 NO DIABETES TIPO 1 PRECOCE E TIPO 2

CURITIBA

2022

THANISE PITELLI DE NIGRO

EFEITOS DE OXIDOVANÁDIO NA CAPTAÇÃO DA GLICOSE *IN VITRO* E NA
GLICEMIA *IN VIVO* E POLIMORFISMOS NOS GENES ADIPONECTINA E
RECEPTOR-1 DE SABOR MEMBRO 2 NO DIABETES TIPO 1 PRECOCE E TIPO 2

Tese apresentada ao curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Profa. Dra. Fabiane Gomes de Moraes Rego

Coorientador: Prof. Dr. Geraldo Picheth

Coorientador: Profa. Dra. Graciele Cristiane More Manica

CURITIBA

2022

Nigro, Thanise Pitelli de

Efeitos de oxidovanádio na captação da glicose *in vitro* e na glicemia *in vivo* e polimorfismos nos genes adiponectina e receptor-1 de sabor membro 2 no diabetes tipo 1 precoce e tipo 2 [recurso eletrônico] / Thanise Pitelli de Nigro – Curitiba, 2022.

1 recurso online: PDF.

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

Orientador: Profa. Dra. Fabiane Gomes de Moraes Rego

Coorientadores: Prof. Dr. Geraldo Picheth

Profa. Dra. Graciele Cristiane More Manica

1. Diabetes. 2. Estreptozotocina. 3. Vanádio. 4. Polimorfismo de nucleotídeo único. I. Rego, Fabiane Gomes de Moraes. II. Picheth, Geraldo. III. Manica, Graciele Cristiane More. IV. Universidade Federal do Paraná. V. Título.

CDD 616.462



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 tese de Doutorado de **THANISE PITELLI DE NIGRO** intitulada: **Efeitos de oxidovanádio na captação da glicose *in vitro* e na glicemia *in vivo* e polimorfismos nos genes adiponectina e receptor-1 de sabor membro 2 no diabetes tipo 1 precoce e 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 doutora 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, 30 de Maio de 2022.

FABIANE GOMES DE MORAES REGO
Presidente da Banca Examinadora

IZABELLA CASTILHOS RIBEIRO DOS SANTOS WEISS
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

SELENE ELIFIO ESPOSITO
Avaliador Externo (PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO
PARANÁ - PUC/PR)

JOICE MARIA DA CUNHA
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

AGRADECIMENTOS

Agradeço, inicialmente, a minha orientadora Prof. Fabiane Rego, não somente pela admirável orientação ao longo desse período do doutorado, mas por ter confiado em mim e não ter soltado da minha mão mesmo nos momentos mais difíceis. Agradeço também ao meu coorientador Prof. Geraldo Picheth que é um suporte que vai além da pesquisa, se colocou na posição de pai do laboratório, foi firme quando necessário, mas foi responsável pela maioria do chocolate que consumi ao longo desses anos. Minha coorientadora Prof. Graciele Manica, que incansavelmente, me ajudou, me ligou, revisou... Graci, você se tornou minha inspiração, como pesquisadora, professora, mãe e esposa. Obrigada, professores, por me deixarem participar desse grupo e por estarem comigo diariamente, seja sábado, domingo ou feriado, para que esse trabalho pudesse acontecer.

Agradeço também aos demais professores, Prof. Joice Cunha, Prof. Giovana Gioppo e Prof. Glaucio Valdameri, que possibilitaram que essa pesquisa acontecesse, além de contribuírem com seus laboratórios e materiais, contribuíram com conhecimento e confiança nessa pesquisa. E a todos os professores do departamento de Ciências Farmacêuticas, que compartilharam seus conhecimentos e experiências e agregaram muito à minha formação. Agradeço, ainda, à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa e a todos os técnicos dos laboratórios e biotérios da Universidade Federal do Paraná (UFPR). À banca avaliadora desse trabalho, obrigada por aceitarem o convite e, desde já, pelas contribuições.

Gostaria de agradecer às pessoas que me ajudaram durante a realização desse projeto, que dedicaram tempo, trabalho e conhecimento para me ajudar, Carlos Jesus, Rubia Bottini, Fernando Betim e a todos meus colegas de laboratório, que foram essenciais para deixar o dia a dia mais leve. Meu agradecimento em especial também vai para minhas amigas Louryanna Campos, que tanto me ajudou na experimentação animal e, principalmente me ensinou tudo das genotipagens, e a Susan Webber, que se dedicou a esse projeto como se fosse dela e foi muito além do que uma companheira de “duas gavagens diárias”, mas estudou, pesquisou, chorou e sorriu comigo. Su e Loly, vocês foram meus pilares ao longo desses anos. Obrigada por se tornarem as amigas que levarei para a vida inteira.

E, acima de tudo, gostaria de agradecer às pessoas mais importantes da minha vida, minha mamita Gina, meu bebê Thai e meu amor Bruno, pois sem elas não conseguiria ter feito nem metade do que fiz. Todas as vezes que pensei em desistir, me apoiaram, choraram o meu choro, ficaram sem dormir, enfrentaram inúmeras vezes a estrada Londrina-Curitiba para estar comigo, cuidaram de mim na minha falta de tempo, enfim... Obrigada por fazerem de tudo por mim, lembrem-se que meu amor por vocês é incondicional! Essa conquista também é de vocês.

Sogros, família e amigas, que se fizeram presentes, fizeram orações e me apoiaram mesmo em meio a ausência, meu muito obrigada! E aos meus anjinhos, Wilsinho, vô Pitelli e vó Flori, obrigada por estarem cuidando de mim ai de cima.

Agradeço também a Deus, meu papai do céu, que me abençoa diariamente, me protegeu na estrada ao longo desse período e me capacitou dia após dia. Tenho certeza de que meus sonhos estão se tornando realidade pois Ele está preparando e cuidando de mim!

A todos que participaram dessa trajetória...

MEU MUITO OBRIGADA!

Bíblia sagrada

“Em tudo dai graças, porque esta é a vontade de Deus em Cristo Jesus para convosco”. Amém.

1 Tessalonicenses 5:18

RESUMO

Diabetes *mellitus* tipo 1 (DM1) e tipo 2 (DM2) são doenças crônicas com elevada morbimortalidade e sem cura. Seus fatores de risco são explicados pela combinação de suscetibilidade genética, exposições ambientais e estilo de vida e sua compreensão é vital para prevenção, detecção precoce e manejo da doença. Polimorfismos em diversos genes podem causar a predisposição, como variações no gene do receptor de paladar doce (gene TAS1R2) e da adiponectina. Além da busca por elucidar as causas da doença, várias terapias adjuvantes têm sido estudadas em combinação com a insulina e hipoglicemiantes orais em diabéticos para melhorar o controle glicêmico e minimizar os efeitos adversos do tratamento convencional, dentre elas, as terapias com vanádio. A presente pesquisa foi dividida em dois capítulos. No primeiro, o efeito do complexo [VO(bpy)(mal)].H₂O foi avaliado em uma linhagem celular de hepatocarcinoma humano (HepG2) e em 70 ratos Wistar machos diabéticos induzidos por estreptozotocina (STZ) divididos em sete grupos com diferentes tratamentos. Na linhagem celular, este apresentou baixos efeitos citotóxicos em concentrações de 2,5 a 7,5 µmol/L (IC₅₀ 10,53 µmol/L) e aumentou a captação de glicose (2-NBDG) em até 93%, efeito semelhante ao da insulina. Nos animais diabéticos, o complexo nas doses de 10 e 30 mg/kg de peso corporal administrado por gavagem oral por 12 dias não afetou os animais, sugerindo baixa toxicidade durante o período experimental, mas, o complexo na concentração de 30 mg/kg de peso associado à insulina, quando comparado ao tratamento com insulina isoladamente, melhorou a glicemia (382 mg/dL vs 551,35 mg/dL respectivamente; $p = 0,002$), resultando em redução adicional de, aproximadamente, 30% na glicemia, sugerindo o potencial do complexo como um candidato promissor para o tratamento adjuvante do diabetes. No segundo capítulo foi avaliada a associação dos polimorfismos rs35874116 e rs12033832 no gene TAS1R2 e do rs266729 do gene ADIPOQ com DM1 e DM2 em estudo tipo caso-controle. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da UFPR (24676613.6.0000.0102 e 01038112.0.0000.0102). Participaram da pesquisa 196 crianças (≤ 16 anos), classificadas em DM1 ($n=98$) e saudáveis (controle, $n=98$) e 265 adultos (≥ 18 anos), sendo DM2 ($n=133$) e saudáveis (controle, $n=132$), pareados por gênero e idade. Os critérios para diagnóstico do diabetes foram da SBD 2021. O polimorfismo foi genotipado pela técnica de qPCR com uso de sondas TaqMan®. Os grupos DM1 e DM2 apresentaram controle glicêmico inadequado (respectivamente, HbA1c $10\% \pm 2,1$ e $7,9\% \pm 2,4$; Glicemia em jejum $238,8 \text{ mg/dL} \pm 117,5$ e $153,1 \pm 81 \text{ mg/dL}$). Os polimorfismos estudados estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg em todos os grupos e as frequências para os alelos de menor frequência, foram similares aos descritos para populações caucasóides. As frequências genotípicas não foram diferentes no DM1 e DM2 nos polimorfismos avaliados, mas no caso do polimorfismo rs12033832, houve diferença significativa nas frequências alélicas ($p=0,036$) e genotípicas para o modelo codominante ($p=0,041$) entre o grupo DM2 e controle, sugerindo que a presença do genótipo GG, confere risco aumentado ao DM2 de 1,5 vezes (*odds ratio*), embora novos estudos com maior tempo de tratamento, diferentes populações e maior tamanho amostral devam ser realizados para substanciar os resultados encontrados.

Palavras-chave: STZ-diabetes; vanádio(IV); efeito antidiabético; SNPs; genotipagem.

ABSTRACT

Type 1 Diabetes *mellitus* (DM1) and type 2 (DM2) are chronic diseases with high morbidity and mortality and without cure. Its risk factors are explained by the combination of genetic susceptibility, environmental exposures and lifestyle and their understanding is vital for prevention, early detection and management of the disease. Polymorphisms in several genes can cause predisposition, such as variations in the sweet taste receptor gene (TAS1R2) and adiponectin. In addition to the quest to elucidate the causes of the disease, several adjuvant therapies have been studied in combination with insulin and oral hypoglycemic agents in diabetics to improve glycemic control and minimize the adverse effects of conventional treatment, including vanadium therapies. This research was divided into two chapters. In the first one, the effect of the [VO(bpy)(mal)].H₂O complex was evaluated in a human hepatocarcinoma cell line (HepG2) and in 70 streptozotocin (STZ) induced diabetic male Wistar rats divided into seven groups with different treatments. In the study in vitro, it showed low cytotoxic effects at concentrations of 2.5 to 7.5 $\mu\text{mol/L}$ (IC₅₀ 10.53 $\mu\text{mol/L}$) and increased glucose uptake (2-NBDG) by up to 93%, an effect similar to of insulin. In vivo study, the complex at doses of 10 and 30 mg/kg of body weight administered by oral gavage for 12 days did not affect the animals, suggesting low toxicity during the experimental period, but the complex at a concentration of 30 mg/kg of weight associated with insulin, when compared to treatment with insulin alone, improved blood glucose (382 mg/dL vs 551.35 mg/dL respectively; $p = 0.002$), resulting in an additional reduction of approximately 30% in blood glucose, suggesting the potential of the complex as a promising candidate for the adjuvant treatment of diabetes. In the second chapter, the association of the rs35874116 and rs12033832 polymorphisms in the TAS1R2 gene and of the rs266729 of the ADIPOQ gene with DM1 and DM2 was evaluated in a case-control study. The project was approved by the Ethics Committee for Research with Human Beings at UFPR (24676613.6.0000.0102 and 01038112.0.0000.0102). Participated in the study 196 children (≤ 16 years), classified as DM1 ($n=98$) and healthy (control, $n=98$) and 265 adults (≥ 18 years), being DM2 ($n=133$) and healthy (control, $n = 132$), matched by gender and age. The criteria for diagnosing diabetes were from SBD 2021. The polymorphism was genotyped by the qPCR technique using TaqMan® probes. The DM1 and DM2 groups showed inadequate glycemic control (HbA_{1c} $10\% \pm 2.1$ and $7.9\% \pm 2.4$, respectively; Fasting blood glucose $238.8 \text{ mg/dL} \pm 117.5$ and $153.1 \pm 81 \text{ mg/dL}$). The studied polymorphisms are in Hardy-Weinberg equilibrium in all groups and the frequencies for the lower frequency alleles were similar to those described for Caucasian populations. Genotypic frequencies were not different in DM1 and DM2 in the polymorphisms evaluated, but in the case of the rs12033832 polymorphism, there was a significant difference in allelic ($p=0.036$) and genotypic frequencies for the codominant model ($p=0.041$) between the DM2 and control groups, suggesting that the presence of the GG genotype confers a 1.5-fold increased risk to DM2 (odds ratio), although new studies with longer treatment time, different populations and larger sample size should be performed to substantiate the results found.

Key-words: STZ-diabetes; vanadium(IV); antidiabetic effect; SNPs; genotyping

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Critérios para o diagnóstico do DM	14
Figura 2. Fisiopatologia do DM1 e DM2	16
Figura 3. Mecanismo de ação da STZ nas células β pancreáticas	18
Figura 4. Número de pessoas com diabetes em todo o mundo e por região em 2021–2045 (20–79 anos)	19
Figura 5. Representação pictórica de diferentes categorias de medicamentos antidiabéticos e seu modo de ação	23
Figura 6. Resumo esquemático do projeto de pesquisa	29
Figura 7. Fluxograma de trabalho	63
Figura 8. Estrutura do composto V ($[V^{IV}O(mal)(bpy)] \cdot H_2O$)	64
Figura 9. Grupos experimentais em animais diabéticos ou saudáveis	69
Figura 10. Curva do ensaio de MTT com sua respectiva IC_{50} para V em 24 e 48 h ..	74
Figura 11. Otimização da captação de 2-NBDG em HepG2 em diferentes condições de resistência à insulina (RI)	76
Figura 12. Percentual de captação do 2-NBDG em meio normoglicêmico ou hiperglicêmico associado ou não a diferentes tratamentos em HepG2	77
Figura 13. Efeito da administração de V na atividade locomotora, exploratória e fisiológica de animais submetidos ao TCA	80
Figura 14. Glicemia (mg/dL) dos animais ratos normoglicêmicos e diabéticos antes de iniciar os tratamentos (a) e após os 12 dias de tratamento (b)	83
Figura 15. Curva glicêmica obtida após a primeira administração do tratamento	85
Figura 16. Principais causas e consequências da obesidade	93
Figura 17. Sinalização através dos T1R2/T1R3 nas células tipo II das papilas gustativas, no intestino e nas células β do pâncreas	100
Figura 17. Expressão dos receptores T1R2/T1R3 em tecidos extragustativos	101
Figura 18. Estrutura gênica do TAS1R2 e localização dos polimorfismos rs35874116 e rs12033832	104
Figura 19. Estrutura da adiponectina e principais mecanismos de ação na manutenção da homeostase metabólica	107
Figura 20. Transdução de sinal pelos receptores da adiponectina	110
Figura 21. Localização do polimorfismo rs266729 no gene <i>ADIPOQ</i>	113
Figura 22. Visão geral dos fatores associados às condições de obesidade	114
Figura 23. Diagrama das etapas do Capítulo 2	115

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Nível mínimo de risco (MRL) para inalação de vanádio e ingestão oral....	33
Tabela 2. Condições usadas no experimento <i>in vitro</i> de captação de glicose	66
Tabela 3. Grupos experimentais no TCA	68
Tabela 4. Valores de IC ₅₀ em µmol/L de diferentes compostos de vanádio em cultivo celular em HepG2	74
Tabela 5. Composto testado, linhagem celular usada e principais resultados do estudo <i>in vitro</i> de captação de glicose	78
Tabela 6. Modelo animal, tratamentos adotados e principais resultados de diferentes compostos de vanádio disponíveis na literatura.....	79
Tabela 7. Média do consumo de alimentos e água, peso corporal inicial e final, variação do peso corporal (período de 12 dias), índice de Lee inicial e final, dobras cutâneas totais e relação entre circunferência abdominal e circunferência torácica	81
Tabela 8. Parâmetros bioquímicos séricos em ratos diabéticos induzidos por STZ de todos os grupos experimentais tratados	86
Tabela 9. Caracterização dos polimorfismos estudados e da reação de qPCR.....	118
Tabela 10. Reagentes e produtos usados no ensaio TaqMan®	118
Tabela 11. Biomarcadores analisados e respectivo princípio metodológico, CVa% e intervalo de referência.....	119
Tabela 12. Dados antropométricos e clínicos dos participantes do estudo enquadrados no grupo DM1, DM2 e seus respectivos controles	121
Tabela 13. Biomarcadores de controle glicêmico nos grupos DM1 e DM2 e nos respectivos controles	123
Tabela 14. Biomarcadores lipídicos nos grupos DM1 e DM2 e nos respectivos controles	124
Tabela 15. Biomarcadores do perfil nutricional nos grupos DM1 e DM2 e nos respectivos controles	125
Tabela 16. Biomarcadores de função renal nos grupos DM1 e DM2 e nos respectivos controles	126
Tabela 17. Biomarcadores de função hepática nos grupos DM1 e DM2 e nos respectivos controles	128
Tabela 18. Frequências genotípicas e alélicas dos polimorfismos rs35874116 e rs12033832 do gene <i>TAS1R2</i> em pacientes com DM1 e controles saudáveis...	129
Tabela 19. Frequências genotípicas e alélicas dos polimorfismos rs35874116 e rs12033832 do gene <i>TAS1R2</i> em pacientes com DM2 e controles saudáveis...	130
Tabela 20. Levantamento de outros estudos do polimorfismo rs35874116	131
Tabela 21. Levantamento de outros estudos do polimorfismo rs12033832	133
Tabela 22. Frequências genotípicas e alélicas do polimorfismo rs266729 do gene <i>ADIPOQ</i> em pacientes com DM1 e controles saudáveis	134
Tabela 23. Frequências genotípicas e alélicas do polimorfismo rs266729 do gene <i>ADIPOQ</i> em pacientes com DM 2 e controles saudáveis	134
Tabela 24. Levantamento de outros estudos do polimorfismo rs266729	136

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ADA.....	American Diabetes Association; Sociedade Americana de Diabetes
AdipoR1.....	Receptor de adiponectina 1
AdipoR2.....	Receptor de adiponectina 2
AGE.....	Advanced glycation and-product; Ativação de produtos finais de glicação avançada
AGL.....	Ácidos graxos livres
Akt.....	v-akt murine thymoma viral oncogene homolog
ALT.....	Alanina aminotransferase
AMPK.....	Adenosine Monophosphate-activated Protein Kinase; proteína quinase ativada por monofosfato de adenosina
ANOVA.....	Análise de Variância
APC.....	Célula apresentadora de antígeno
APPL1.....	Adaptor Protein, Phosphotyrosine Interacting With PH Domain And Leucine Zipper 1; fosfotirosina e motivo zíper de leucina 1
ARBs.....	Bloqueadores dos receptores da angiotensina
AST.....	Aspartato amino transferase
ATD.....	AminoTerminal Domain; domínio aminoterminal
ATP.....	Adenosina trifosfato
ATSDR.....	Agency for Toxic Substances and Disease Registry; Agência de Substâncias Tóxicas e Registro de Doenças
AU.....	Ácido úrico
BEOV.....	bis(2-etil-3-hidroxi 4-pironato)oxovanadium(IV)
BMOV.....	bis(maltolato) oxovanádio(IV)
bpV.....	bis-peróxovanádio
CA.....	Circunferência abdominal
CAAE.....	Certificado de Apresentação de Apreciação Ética
CaMKK β	Calcium/calmodulin-dependent protein Kinase Kinase β ; proteína quinase quinase β dependente de Ca ²⁺ /calmodulina
CEP.....	Comitê de Ética em Pesquisa
CEUA	Comissão de Ética de Uso de Animais

CHO-HIR.....Chinese Hamster Ovary cells overexpressing Insulin Receptor; células de ovário de hamster chinês superexpressando o receptor de insulina

CJNK/SAPK....c-Jun N-terminal Kinase/Stress-Activated Protein Kinase; c-Jun N-terminal quinase/proteína quinase ativada por estresse

C-raf-1.....Cellular Rapidly Accelerated Fibrosarcoma 1

Crea.....Creatinina

CRT.....Calreticulina

CT.....Circunferência torácica

Col T..... Colesterol total

CytPTK.....Adipocytic-Cytosolic non-receptor Protein Tyrosine Kinase

DCCT.....Diabetes Control and Complications Trial

DCV.....Doença cardiovascular

DM.....Diabetes mellitus

DM1.....Diabetes mellitus tipo 1

DM2.....Diabetes mellitus tipo 2

DMG.....Diabetes mellitus gestacional

DMSO..... Dimetilsulfóxido

DMT1..... Divalent Metal Transporter-1; Transportador de metal divalente 1

DNA.....Ácido desoxirribonucleico

DP.....Desvio padrão

ECA.....Enzima de conversão da angiotensina

EDC.....Pittsburgh Epidemiology of Diabetes Complications

EPR.....Ressonância paramagnética eletrônica

ERK.....Extracellular signal-Regulated Kinases

ERN.....Espécies reativas de nitrogênio

ERO.....Espécies reativas de oxigênio

Fru-2,6-P2....Fructose-2,6-bisphosphate; frutose-2,6-bifosfato

G6Pase.....Glucose-6-Phosphatase; glicose-6-fosfatase

GCLC.....Glutamate-Cysteine Ligase Catalytic subunit; glutamato-cisteína ligase

GIP.....Glicoseptídeo trópico

GK.....Glucokinase; glucoquinase

GLP-1.....Glucagon-like peptide-1; peptídeo semelhante a glucagon 1

GLUT.....Transportador de glicose

GP 2 h.....Glicose plasmática de 2 h

GPCRs.....G Protein-Coupled Receptors; receptores acoplados à proteína G
 GPI.....Glycosyl Phosphatidylinositol; glicosilfosfatidilinositol
 GPJ.....Glicose plasmática em jejum
 GRS..... Genetic Risk Scores; escores de risco genético
 GSH..... Compostos redutores celulares naturais glutatona
 GSSG..... Compostos redutores celulares naturais glutatona oxidada
 GWAS.....Genome Wide Association study; estudo de amplo do genoma
 HbA1c.....Hemoglobina A1c
 HC – UFPR...Complexo Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná
 HDL.....Lipoproteína de alta densidade
 HepG2.....Hepatocarcinoma humano
 HG.....Ratos com diabetes induzido por STZ tratados com veículo
 HLA.....Antígenos leucocitários humanos
 HMW.....High Molecular Weight; alto peso molecular de peso
 HO-1.....Heme Oxygenase-1; heme oxygenase-1
 HPP.....Hospital Pequeno Príncipe
 IC50.....Concentração inibitória de 50% de viabilidade celular
 IDF.....Federação Internacional de Diabetes
 IGF-1.....Insulin-like Growth Factor 1; fator de crescimento tipo insulina 1
 IMC.....Índice de massa corporal
 INS.....Ratos com diabetes induzido por STZ tratados com insulina
 INS+V10.....Ratos com diabetes induzido por STZ tratados com insulina + composto
 V nas concentrações de 10 mg/Kg
 INS+V30.....Ratos com diabetes induzido por STZ tratados com insulina + composto
 V nas concentrações de 30 mg/Kg
 NPH.....Insulina isofana humana
 IRS-1.....Insulin Receptor Substrate 1; Substrato 1 do receptor de insulina
 ISPAD.....International Society for Pediatric and Adolescent Diabetes; Sociedade
 Internacional de Diabetes Pediátrica e Adolescentes
 Keap1.....Kelch-like ECH-associated protein 1
 LADA.....Latent Autoimmune Diabetes of Adulthood; Diabetes autoimune latente
 da idade adulta
 LDL.....Lipoproteína de baixa densidade
 LKB1.....Liver kinase B1; proteína quinase hepática B1

LMW.....Low Molecular Weight; baixo peso molecular

LOAEL.....Lowest-Observed-Adverse-Effect Level; Menor nível de efeito adverso observado

L-PK.....L-Pyruvate Kinase; L piruvato quinase

MAP.....Quinase ativada por mitógenos

MAPK.....Mitogen Activated Protein Kinases; proteínas quinases ativadas por mitógenos

MCT1.....Transportador de monocarboxilato

MMW.....Middle Molecular Weight; peso molecular médio

MODY.....Maturity-Onset Diabetes of the Young

MRL.....Minimal Risk Level; nível mínimo de risco

MTT.....Método metil-tiazolil-tetrazólio

NAA.....Neutron Activation Analysis; Análise de ativação de nêutrons

NG.....Ratos sem indução do diabetes

NHDL-C.....não HDL-C (Lipoproteína de alta densidade)

NOAEL.....No-Observed-Adverse-Effect Level; dosagem do nível de efeito adverso não observado

NPY.....Neuropeptídeo Y

NQO1.....NAD(P)H quinine dehydrogenase 1; NAD(P)H desidrogenase quinona 1

Nrf2.....Nuclear factor erythroid 2-related factor 2; fosforilação do fator nuclear eritróide 2 relacionado ao fator 2

OMS.....Organização Mundial da Saúde

p21ras.....21-kD proteína codificada de sarcoma vírus oncogenes de ratos; proteína de 21 kD codificada por oncogenes ras

PBS.....Tampão fosfato-salino

PEPCK.....*PhosphoEnol-Pyruvate Carboxy Kinase*; fosfoenolpiruvato carboxiquinase

PI3K.....Phospholinoside 3 Kinase; fosfatidilinositol 3-quinase

PKB.....Protein Kinase B; proteína quinase B

PKC.....Protein Kinase C; proteína quinase C

POMC.....ProOpioMelanoCortin; pró-ópio-melanocortina

PP2A.....Protein Phosphatase 2A; proteína fosfatase 2A

PPAR γPeroxisome Proliferator-Activated Receptor- γ ; Receptor γ ativado por proliferadores de peroxissoma

PRS.....Polygenic Risk Score; escore de risco poligênico

PSPases.....Protein Serine/threonine Phosphatase; proteínas fosfoserina/treonina
 PT.....Proteínas totais
 PTK.....Protein Tyrosine Kinase; proteína tirosina quinase
 PTP1B.....Protein Tyrosine Phosphatase 1B; proteína tirosina fosfatase 1B
 PTPases.....Protein Tyrosine Phosphatase; proteínas fosfotirosina
 qPCR.....PCR em tempo real
 JNK.....c-Jun N-terminal Kinase; quinase c-Jun N-terminal
 ras-MAPK.....rat sarcoma virus-Mitogen Activated Protein Kinases; sarcoma de rato-
 proteínas quinases ativadas por mitógenos
 RI.....Resistência à insulina
 S6K.....Proteína ribossomal 6 quinase
 SBD.....Sociedade Brasileira de Diabetes
 SEMPR.....Unidade de Diabetes do Serviço de Endocrinologia e Metabologia do
 CHC-UFPR
 siRNA.....RNA de pequena interferência
 SMCG.....Sistema de monitorização contínua de glicose
 SNP.....Single-Nucleotide Polymorphisms; Polimorfismos de único nucleotídeo
 STZ.....Estreptozotocina
 T1R1.....Receptor de sabor tipo 1 membro 1
 T1R2.....Receptor de sabor tipo 1 membro 2
 T1R3Receptor de sabor tipo 1 membro 3
 TCA.....Teste de campo aberto
 TCLE.....Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
 TG.....Triglicerídeos
 TNF αTumor Necrosis Factor-alpha; fator de necrose tumoral alfa
 TOTG.....Teste oral de tolerância à glicose com 75 g
 TRPMP5.....Transient Receptor Potential cation channel subfamily M member 5;
 Receptor de potencial transitório da subfamília M membro 5
 TSA.....Transition State Analog; estado de transição análogo
 UEP.....Unidade de Endócrino Pediatria
 UFPR.....Universidade Federal do Paraná
 V10.....Ratos com diabetes induzido por STZ tratados com composto V nas
 concentrações de 10 mg/Kg

V30.....Ratos com diabetes induzido por STZ tratados com composto V nas concentrações de 30 mg/Kg

VFT.....Venus FlyTrap; armadilha de Vênus

WHO.....World Health Organization; Organização Mundial da Saúde

IP3.....Receptor de inositol 1,4,5-trifosfato

ERK1/2.....Extracellular signal-Regulated Kinase $\frac{1}{2}$; fosforilação da quinase 1/2 regulada por sinal extracelular

2-NBDG.....2- [N- (7- nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-il) amino] -2-desoxi-D-glicose

1,5AG.....1,5-anidroglucitol

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	11
REVISÃO DE LITERATURA	14
1 DIABETES <i>MELLITUS</i> (DM)	14
2 NÚMEROS DO DM	19
3 CONTROLE E TRATAMENTO DO DM	21
3.1 Controle glicêmico	21
3.2 Controle de alvos não glicêmicos	25
3.2.1 Hipertensão	26
3.2.2 Lipídeos	27
JUSTIFICATIVA	28
CAPÍTULO 1. EFEITO DE OXIDOVANÁDIO ([V^{IV}O(MAL)(BPY)].H₂O) NA CAPTAÇÃO DA GLICOSE EM HEPG2 E EM PARÂMETROS METABÓLICOS E BIOQUÍMICOS DE RATOS WISTAR COM DIABETES INDUZIDA COM ESTREPTOZOTOCINA	31
1 OBJETIVOS	31
1.1 Objetivo geral	31
1.2 Objetivos específicos	31
2 ESTUDOS DE COMPOSTOS DE VANÁDIO NO TRATAMENTO DO DIABETES	32
2.1 Aspectos fisiológicos do vanádio	32
2.2 Atuação do vanádio na terapia do DM	51
2.3 Vanádio e a sinalização da insulina no DM	55
2.4 Vanádio: inflamação e equilíbrio redox no Diabetes <i>Mellitus</i>	59
3 MATERIAIS E MÉTODOS	63
3.1 Síntese do composto	63
3.2 Cultivo de células de carcinoma hepatocelular humano (HepG2)	64
3.2.1 Estudo de viabilidade celular	65
3.2.2 Determinação da captação da glicose	66
3.3 Efeito de V em modelo animal	67
3.3.1 Teste de campo aberto (TCA)	67
3.3.2 Experimento <i>in vivo</i> com animais diabéticos	69
3.3.2.1 Indução do diabetes experimental	70
3.3.2.2 Intervenções para tratamento	70
3.3.2.3 Acompanhamento do período experimental	71
3.3.2.4 Medidas murinométricas	71
3.3.2.5 Eutanásia e obtenção de amostras	72
3.4 Análises estatísticas	72
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	73
4.1 Estudos <i>in vitro</i> em linhagem celular HepG2	73
4.1.1 Viabilidade celular	73
4.1.2 Estudo de captação da glicose	75
4.2 Estudos <i>in vivo</i> no modelo animal em ratos Wistar	79
4.2.1 Efeitos de V no teste de campo aberto (TCA)	80
4.2.2 Efeitos no controle glicêmico de V em ratos Wistar diabéticos	81
5 CONCLUSÃO	89

CAPÍTULO 2. POLIMORFISMOS NOS GENES ADIPONECTINA E RECEPTOR-1 DE SABOR MEMBRO 2 NO DIABETES TIPO 1 PRECOCE E TIPO 2	90
1 OBJETIVOS	90
1.1 Objetivo geral	90
1.2 Objetivos específicos	90
2 OBESIDADE NO DIABETES	91
2.1 Causas da obesidade	92
2.2 Genômica da obesidade	95
2.3 Genética do controle da ingesta alimentar	96
2.4 Polimorfismos em genes que afetam o consumo alimentar	97
2.4.1 Receptores do sabor doce	98
2.4.1.1 Receptor T1R2	103
2.4.2 Adiponectina	106
2.4.2.1 Adiponectina e o DM	112
3 MATERIAIS E MÉTODOS	115
3.1 Amostras	115
3.2 Extração e quantificação do DNA genômico	117
3.3 Variantes genéticas estudadas	117
3.3.1 Reação de qPCR com sondas Taqman®	118
3.4 Quantificação dos biomarcadores	119
3.5 Análises estatísticas	120
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	121
4.1 Dados antropométricos e clínicos	121
4.2 Análises bioquímicas	122
4.2.1 Marcadores de controle glicêmico	123
4.2.2 Marcadores de perfil lipídico	124
4.2.3 Marcadores de perfil nutricional	125
4.2.4 Marcadores de função renal	126
4.2.5 Marcadores de função hepática	127
4.3 Análises moleculares	128
4.3.1 Polimorfismos do gene <i>TAS1R2</i>	129
4.3.2 Polimorfismos do gene <i>ADIPOQ</i>	134
5 CONCLUSÃO	137
REFERÊNCIAS	138

ANEXOS E APÊNDICES	181
ANEXO A. APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA DE USO DE ANIMAIS	181
ANEXO B. APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS PARA CRIANÇAS (SINTETIZADO)	182
ANEXO C. APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS PARA ADULTOS	183
APÊNDICE A. ANÁLISES ESTATÍSTICAS COMPLEMENTARES DOS PARÂMETROS BIOQUÍMICOS	184
APÊNDICE B. QUESTIONÁRIO UTILIZADO PARA OBTENÇÃO DOS DADOS NA ENTREVISTA	195

INTRODUÇÃO

Diabetes *mellitus* tipo 1 (DM1) e tipo 2 (DM2) são doenças crônicas com elevada morbimortalidade e sem cura. A hiperglicemia crônica é a marca do diabetes e decorre da deficiência na produção de insulina, resistência à ação da insulina ou ambos (ADA, 2020). Ao longo das últimas décadas, a prevalência do diabetes tem aumentado globalmente, similar a um processo pandêmico e respondendo como uma das principais causas morte, além de conferir elevada sobrecarga econômica aos sistemas de saúde devido aos altos custos de gerenciamento e tratamento do processo patológico e de suas complicações (IDF, 2021).

O tratamento medicamentoso convencional do diabetes, que tem foco no aumento da oferta da insulina e/ou maior sensibilização ao hormônio, produz efeitos colaterais indesejados aos pacientes, o que leva a redução da adesão do paciente, e consequente falha do tratamento. A administração de insulina (no DM1) e agentes hipoglicemiantes orais (no DM2) são as principais formas de tratamento medicamentoso no arsenal terapêutico atual. Outras formas terapêuticas, como a terapia gênica e indução da regeneração das células beta não estão aprovadas para uso clínico amplo, ficando restritas à pesquisa no diabetes (TAN *et al.*, 2019)

O controle glicêmico do DM1 requer uma atenção rigorosa e diária de injeções de insulina, testes de sangue através de picadas nos dedos e monitoramento da dieta. Diabéticos tipo 1 devem estar constantemente atentos para episódios de hiperglicemia ou hipoglicemia, os quais podem ser fatais. Recentemente, tem se ampliado o interesse na combinação de medicamentos com a insulina, para a melhora do controle glicêmico sem risco aumentado de hipoglicemia ou ganho de peso (DANNE *et al.*, 2019). Para o DM2, o tratamento inicia com mudança de estilo de vida, seguido pela adição de uma ou mais classes de agentes antihiperglicêmicos e insulina (ADA, 2020), sendo que os compostos terapêuticos utilizados no tratamento do DM2, muitas vezes, têm sua efetividade reduzida em alguns pacientes (IDF, 2019).

Várias terapias adjuvantes têm sido estudadas em combinação com a insulina e hipoglicemiantes orais em pacientes com Diabetes *mellitus* (DM) para melhorar o controle glicêmico e minimizar os efeitos adversos do tratamento convencional (ADA, 2020). A avaliação contínua de terapias adjuntas para o DM pode fornecer opções adicionais e relevantes ao tratamento medicamentoso e concorrer para suprir as deficiências das terapias atuais (HARRIS *et al.*, 2018).

Os sais de vanádio têm apresentado perspectivas positivas como adjuntos à insulina no tratamento do DM (SAKURAI, HIROMU, 2002; CLARK *et al.*, 2014; BAPTISTELLA *et al.*, 2021). Estudos extensos têm sido realizados para elucidar o mecanismo pelo qual o vanádio atua na regulação celular do metabolismo da glicose. Estes estudos são incompletos no presente, mas apresentam robustas evidências de que o vanádio diminui a necessidade de insulina em modelos animais (roedores), melhorando o controle glicêmico (MALABU *et al.*, 1994; YAO; BATTELL; MCNEILL, 1997; FUGONO; YASUI; SAKURAI, 2005). Novos estudos sobre o uso de compostos de vanádio com melhor absorção e seus efeitos sobre as concentrações plasmáticas de insulina e de peptídeo C são recomendados (SOVEID; DEH GHANI; OMRANI, 2013). Vários fatores podem influenciar na progressão do uso humano de terapias com vanádio, especialmente fatores farmacológicos, incluindo a biodisponibilidade e a baixa nefro-toxicidade (MORSY *et al.*, 2021).

Com o exposto, se ressalta a pertinência e relevância da avaliação de novos compostos de vanádio no diabetes (INGELSSON; MCCARTHY, 2018). Buscar novas moléculas, selecionadas para maior efeito antidiabético, antihipercolesterolêmico e anti-inflamatório, associados a menor toxicidade, são prioritárias no DM visando ampliar o arsenal terapêutico.

Além disso, a compreensão dos fatores de risco que contribuem para o aparecimento do DM é vital para a implementação de detecção precoce de doenças, prevenção e intervenção. Os principais componentes dos fatores de risco de doenças humanas são geralmente explicados pela combinação de suscetibilidade genética, exposições ambientais e determinantes de estilo de vida (TORKAMANI; WINEINGER; TOPOL, 2018). Diferenças nesses fatores entre os indivíduos também produzem diferenças na fisiologia da doença. A medicina de precisão pode ser definida como o cuidado médico sob medida baseado principalmente na compreensão dessas diferenças na fisiologia da doença entre os indivíduos (KONUMA; OKADA, 2021).

A classificação do DM por organizações especializadas, como a Sociedade Americana de Diabetes (*American Diabetes Association – ADA*), se expandiu nas últimas décadas para incluir formas descritivas adicionais. Estes são diabetes monogênicos, englobando as síndromes diabetes da maturidade de início precoce (*Maturity-Onset Diabetes of the Young - MODY*) e diabetes neonatal, diabetes associado a doenças exócrinas do pâncreas, diabetes secundária devido ao excesso de hormônios contrareguladores de glicose, diabetes associada a endocrinopatias,

como acromegalia ou doença de *Cushing* e diabetes induzido por esteroides ou drogas (ADA, 2020). Com exceção do diabetes monogênico, que afeta uma pequena fração dos pacientes, esses subtipos não são definidos de acordo com sua etiologia molecular, o que seria preferível para um diagnóstico preciso e para o uso de terapia direcionada (HATTERSLEY; PATEL, 2017).

Uma das abordagens importantes para a medicina de precisão é a estratificação da suscetibilidade genética individual baseada na variação do ácido desoxirribonucleico (DNA) herdado. Esta abordagem foi desenvolvida com o progresso da genética humana, e acredita-se que estes estudos possam contribuir para a identificação dos fatores genéticos para doenças humanas comuns e melhor previsão dos riscos para o desenvolvimento das doenças. Estudo de associação amplo do genoma (*Genome Wide Association Study* - GWAS), que utiliza matrizes de polimorfismos de nucleotídeo único (*Single-Nucleotide Polymorphisms* - SNPs), é um dos métodos mais eficazes para avaliar estatisticamente a associação genética de doenças (KONUMA; OKADA, 2021).

A predição de risco genético para o DM desempenha um papel importante para facilitar a intervenção precoce da doença, identificando indivíduos de alto risco. O conhecimento das características genéticas em cada grupo é fundamental para sua implementação bem-sucedida. O conhecimento do risco genético dos diferentes tipos de diabetes tem o potencial de auxiliar na identificação dos fatores de risco ambientais (não genéticos). Por exemplo, a estratificação de indivíduos em 'alto risco genético' e 'baixo risco genético' pode ser usada em um estudo de coorte longitudinal, pressupondo que esses sujeitos que desenvolvem autoimunidade às ilhotas e progridem para o DM1 apesar de ter uma baixa pontuação de risco genético seria "carregado" por fatores de risco ambientais. Quanto maior a compreensão sobre a fisiopatologia e heterogeneidade do DM, a ciência de predição, prevenção e intervenção pode auxiliar no conhecimento do DM (ROBERTSON; RICH, 2018).

Desta forma, a avaliação de variantes genéticas reportadas na literatura para predisposição do DM1 em pacientes com início precoce (infância) e tardio (após 18 anos de idade) e DM2 pode contribuir para um mapeamento genético específico para a população brasileira, permitindo preencher lacunas na fisiopatologia da doença, o que poderia auxiliar no desenvolvimento de tratamentos preventivos, bem como nova abordagem terapêutica para estes tratamentos.

REVISÃO DE LITERATURA

1 DIABETES MELLITUS (DM)

O DM é uma doença crônica, heretogênea e multifatorial, e segundo a Federação Internacional de Diabetes (IDF) é caracterizado por concentrações elevadas da glicemia devido a falta ou insuficiência na produção da insulina, ou ainda, quando esta não é efetivamente utilizada (IDF, 2021).

O diabetes pode ser diagnosticado com base em critérios de glicose plasmática, seja pelo valor da glicose plasmática em jejum (GPJ) ou o pelo valor da glicose plasmática de 2 h (GP 2 h) durante o teste oral de tolerância à glicose com 75 g (TOTG) ou critérios da hemoglobina A1c (HbA1c) (THE INTERNATIONAL EXPERT COMMITTEE, 2009) (Figura 1).

Figura 1. Critérios para o diagnóstico do DM

Teste	Diabetes Deve ser diagnosticado se UM OU MAIS dos critérios a seguir são atendidos	Observação
 Glicemia plasmática em jejum	$\geq 126 \text{ mg/dL}^*$	O jejum é definido como nenhuma ingestão calórica por pelo menos 8 horas.
ou		
 Glicemia 2 h após 75g de glicose oral (TOTG)	$\geq 200 \text{ mg/dL}^*$	O teste deve ser realizado como descrito pela OMS utilizando dose oral de glicose contendo o equivalente a 75g de glicose dissolvida em água.
ou		
 HbA1c [#]	$\geq 6,5\%^*$	O teste deve ser realizado com método padronizado e certificado pelo <i>National Glycohemoglobin Standardization Program</i> (NSGP) e padronizado pelo ensaio do <i>Diabetes Control and Complications Trial</i> (DCCT).
ou		
 Glicemia ao acaso	$\geq 200 \text{ mg/dL}$	Pacientes com sintomas clássicos, hiperglicemia ou crises hiperglicêmicas.

*Com glicemia inequívoca ausente, os resultados devem ser confirmados com repetição dos testes.

[#]Discordância marcada entre os valores de A1C e de glicose plasmática devem aumentar a possibilidade de interferência no ensaio da A1C e considerar o uso de um ensaio sem interferência ou critérios de glicose plasmática para diagnosticar o diabetes. Em condições associadas a uma relação

alterada entre A1C e a glicemia, como hemoglobinopatias, incluindo anemia falciforme, gravidez (segundo e terceiro trimestre e período pós-parto), deficiência da glicose-6-fosfato desidrogenase, HIV, hemodiálise, perda de sangue recente ou transfusão, ou terapia com eritropoietina, apenas critérios de glicose plasmática devem ser usados.

Fonte: Adaptado da Associação Americana de Diabetes (ADA, 2021).

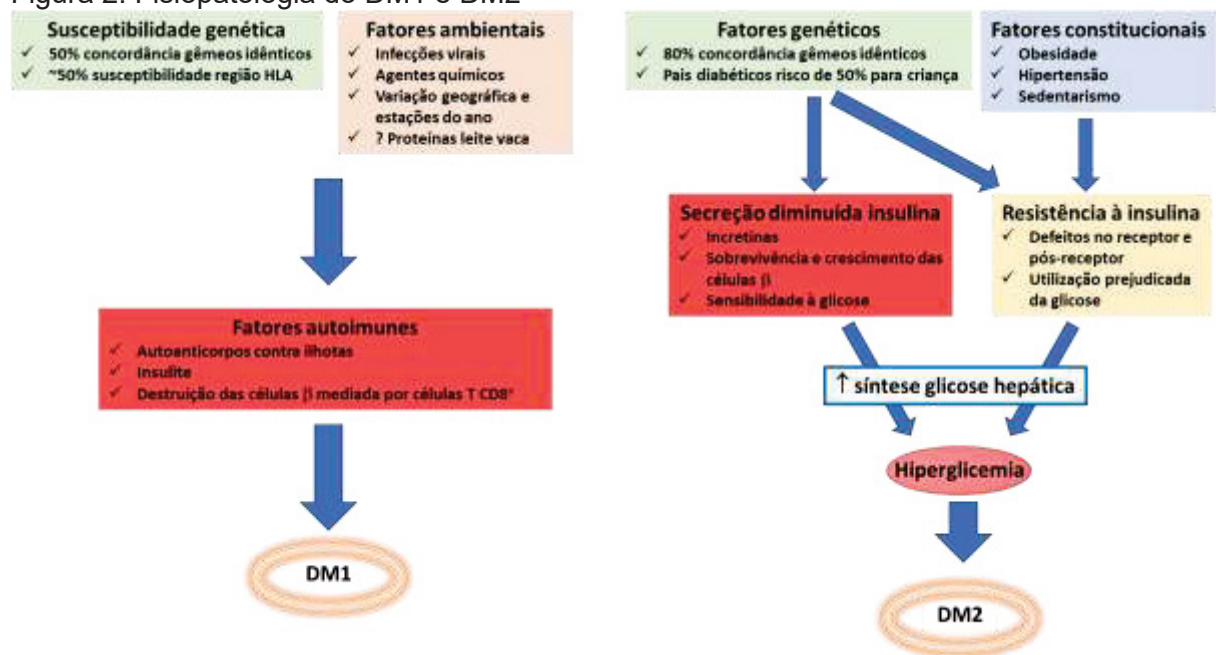
A Associação Americana de Diabetes (ADA) e a Sociedade Brasileira de Diabetes (SBD) classificam a doença em quatro grupos distintos. O primeiro tipo é conhecido como DM1, devido à destruição autoimune das células β , geralmente levando a deficiência absoluta de insulina, incluindo diabetes autoimune latente da idade adulta (*Latent Autoimmune Diabetes of Adulthood* – LADA). Algumas formas de DM1 não têm etiologias conhecidas. Esses pacientes têm insulinopenia permanente e são propensos para cetoacidose diabética, mas não há evidências de autoimunidade de células β . No entanto, apenas uma minoria dos pacientes com DM1 se enquadram nesta categoria (ADA, 2021).

Acredita-se que o desenvolvimento dos autoanticorpos contra as células β seja induzido após um indivíduo geneticamente suscetível ser exposto presumivelmente a um fator ambiental que desencadeia uma perda de regulação imunológica (ATKINSON; EISENBARTH; MICHELS, 2014). Variação genética na região do sistema de antígenos leucocitários humanos (HLA), é responsável por uma grande proporção do risco genético associado ao DM1 (NOBLE *et al.*, 2010). Como resposta a um agente ainda desconhecido, inicia-se a migração e infiltração de macrófagos e linfócitos T CD8⁺ no pâncreas, dando início à condição denominada por insulite (MANNERING; PATHIRAJA; KAY, 2016). As células T potencialmente diabetogênicas circulam nos nódulos linfáticos pancreáticos onde lhes é apresentado o autoantígeno, pelas células apresentadoras de antígenos (APC's). Após a apresentação dos autoantígenos, as células T adquirem capacidade migratória e atacam o pâncreas onde se tornam autorreativas contra as células (ALMEIDA, 2017). Estudos experimentais e epidemiológicos têm sugerido que uma série de fatores ambientais, podendo ser citados a dieta (leite de vaca e glúten), o aumento da idade maternal, a deficiência de vitamina D, a exposição a químicos, bem como infecções e microbiota intestinal, podem desempenhar um papel a favor do desenvolvimento DM1 (Figura 2) (ILONEN *et al.*, 2009; ROSE *et al.*, 2013; GULDEN; WONG; WEN, 2015; JACOBSEN; SCHATZ, 2016).

O DM2 abrange indivíduos que possuem relativa (em vez de absoluta) deficiência de insulina e tem resistência periférica à insulina. Existem várias causas

para o DM2. Embora as etiologias específicas não sejam conhecidas, a destruição autoimune das células β não ocorre, e os pacientes não têm nenhuma das outras causas conhecidas de diabetes. O DM2 é uma doença heterogênea causada pela interação entre fatores genéticos e fatores ambientais, como visto na Figura 2 (DORIA; PATTI; KAHN, 2008). O DM2 é uma doença poligênica, não obedecendo ao modo de herança Mendeliano e, portanto, classificada como uma doença complexa (COLLINS; GUYER; CHARKRAVARTI, 1997).

Figura 2. Fisiopatologia do DM1 e DM2



Fonte: Adaptado de Parveen, Roy e Prasad (2017) e Cuschieri (2019)

Contudo, indivíduos que herdaram o risco genético não necessariamente desenvolvem o fenótipo da doença, a menos que expostos a um sinal ambiental particular. Tanto fatores genéticos quanto ambientais (sozinho e em combinação) influenciam diferentes características que contribuem para o fenótipo diabético (massa de células β , ação da insulina, secreção de insulina, distribuição gordura e obesidade) (SO *et al.*, 2000; BONADONNA, 2004; STUMVOLL; GOLDSTEIN; VAN HAEFTEN, 2005). Esta susceptibilidade genética é ainda mais reforçada por fatores ambientais impulsionados por pessoas com estilos de vida sedentários e dietas pouco saudáveis (DORIA; PATTI; KAHN, 2008). Foi, ainda, relatado que a atividade física reduz a resistência à insulina (RI), enquanto alto teor de carboidratos e dietas gordurosas com baixo teor de fibra agravam a RI (RICCARDI *et al.*, 1984).

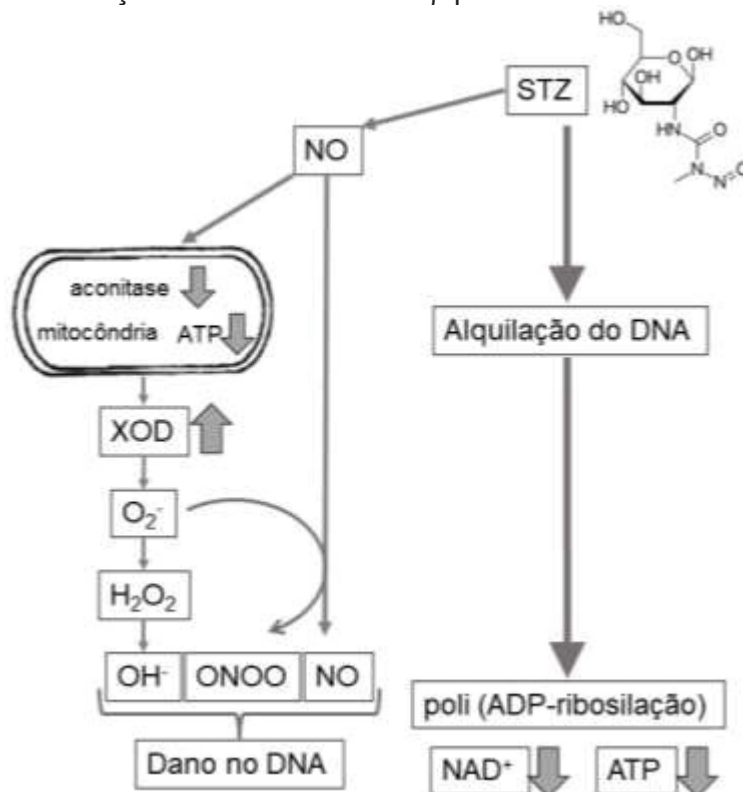
A associação entre obesidade e DM2 foi relatada há muito tempo. Foi sugerido que ambas as condições compartilham genes de suscetibilidade (CARMELLI; CARDON; FABSITZ, 1994). O sobrepeso e a obesidade são os principais contribuintes para o desenvolvimento da RI e intolerância a glicose. Quando as células β não são mais capazes de secretar insulina suficiente para superar a RI, intolerância a glicose progride para o DM2. Anormalidades em outros hormônios, como secreção reduzida do peptídeo semelhante a glucagon 1 (*Glucagon-like peptide-1* - GLP-1), hiperglucagonemia e concentrações aumentadas de outros hormônios contra-reguladores também contribuem para a RI, redução da secreção de insulina e hiperglicemia no DM2 (ZIMMET, 1992). Segundo o IDF o DM2 corresponde a 90% dos casos (IDF, 2021).

Existe, ainda, o Diabetes *mellitus* gestacional (DMG), diabetes diagnosticado no segundo ou terceiro trimestre de gravidez que não era claramente diabetes manifesto antes da gestação (ADA, 2021). DMG é, muitas vezes, um indicativo de disfunção da célula β subjacente (BUCHANAN *et al.*, 2007), que confere risco aumentado de desenvolvimento posterior de diabetes, geralmente, DM2, na mãe após o parto (KIM; NEWTON; KNOPP, 2002; NOCTOR *et al.*, 2016).

E por fim, o quarto grupo que engloba as outras formas específicas de diabetes, que inclui os defeitos genéticos nas células β e na ação da insulina, distúrbios no pâncreas exócrino, diabetes induzido por medicamentos ou agentes químicos, dentre outras formas menos comuns (SBD, 2019; ADA, 2021).

Um dos agentes químicos empregados na indução do diabetes para estudos *in vivo* em modelo animal foi descrito em 1976 (GANDA; ROSSINI; LIKE, 1976) é a estreptozotocina (STZ), 2-deoxy-2-(3-(methyl-3-nitrosoureido)-D-glucopyranose). A STZ consiste em um antibiótico natural da classe glicosamina-nitrosureia produzido pela bactéria *Streptomyces achromogens*. Este é um análogo tóxico da glicose e, em mamíferos, é capaz de entrar nas células β pancreáticas por meio do transportador de glicose (GLUT2), causando alquilação do DNA e efeitos citotóxicos, que resultam em um efeito pleotrópico capaz de ocasionar a necrose celular e, conseqüentemente, a inibição da síntese e secreção de insulina. O mecanismo de ação da STZ é apresentado na Figura 3, onde ao entrar na célula, ocorre uma ação sinérgica entre o óxido nítrico (NO) e liberação de espécies reativas de oxigênio, como radical hidroxila ($\text{OH}^\cdot$), peroxinitrato altamente tóxico (ONOO), que contribuem para o dano no DNA e outras alterações deletérias causadas por STZ a nível celular (SZKUDELSKI, 2001).

Figura 3. Mecanismo de ação da STZ nas células β pancreáticas



As potentes propriedades alquilantes da STZ são a principal razão de sua toxicidade. No entanto, a ação sinérgica do NO e de espécies reativas de oxigênio também podem contribuir para a fragmentação do DNA e outras alterações deletérias causadas pela STZ. NO e as espécies reativas de oxigênio podem agir separadamente ou formar o ONOO altamente tóxico.

Abreviações: STZ, estrepzotocina; NO, óxido nítrico; ATP, adenosina trifosfato; XOD, xantina oxidase; O_2^- , superóxido; H_2O_2 , peróxido de hidrogênio; $OH^\cdot$, radical hidroxila, $ONOO^\cdot$, peroxinitrato; ADP, adenosina difosfato; NAD^+ , nicotinamida adenina dinucleotídeo oxidado.

Fonte: Adaptado de Szkudelski (2001).

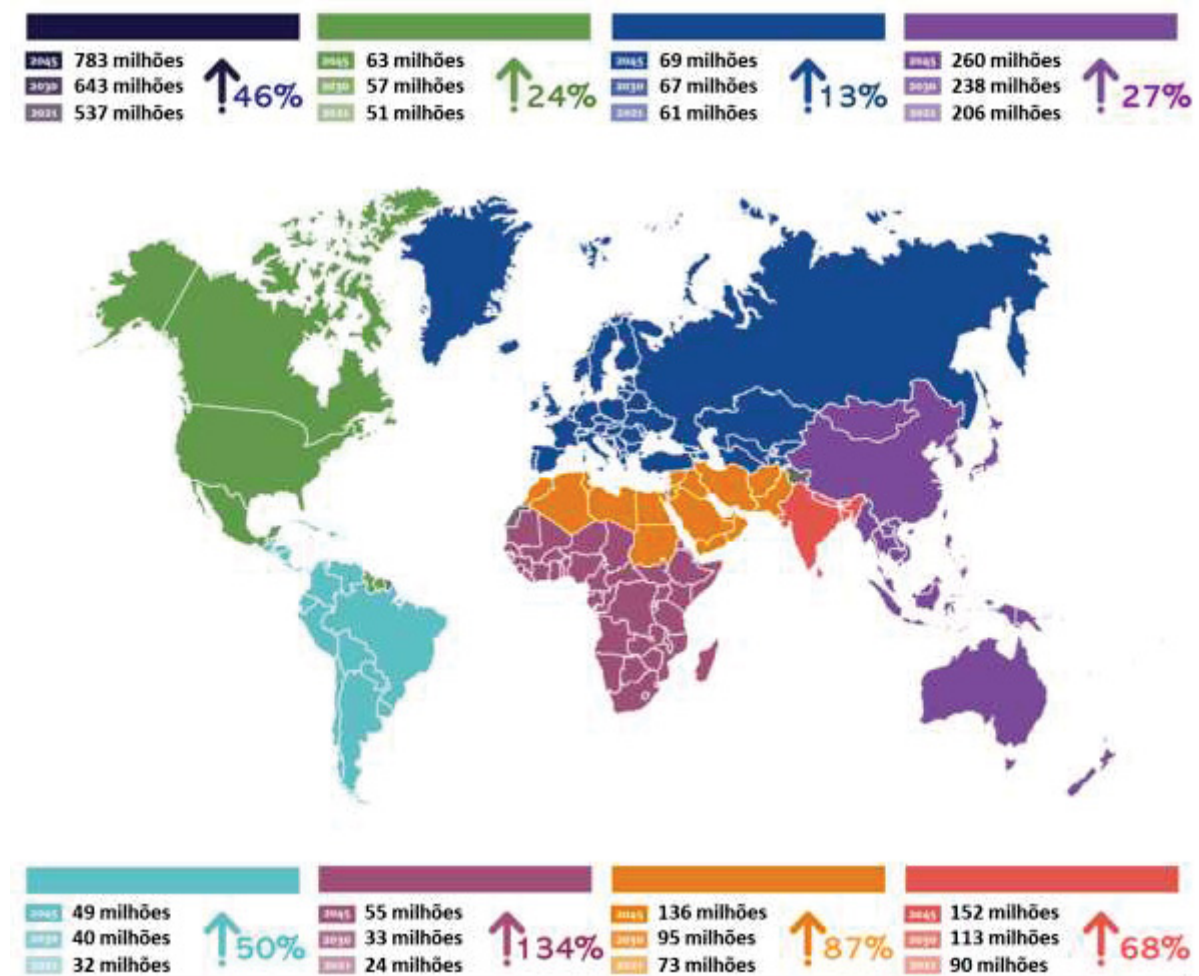
O DM induzido por agentes químicos, como a STZ, em animais de experimentação tem sido amplamente utilizado como modelo para estudo da fisiopatologia da doença quanto a seus eventos bioquímicos, hormonais e morfológicos, bem como agentes terapêuticos e preventivos. Sua utilização é considerada um método de fácil execução, padronização e baixo custo (LUIPPOLD *et al.*, 2016).

O modelo de indução de diabetes pela STZ em animais se justifica pela capacidade de mimetizar sinais e sintomas clínicos clássicos de pacientes com DM (principalmente DM1, mas ainda DM2), como a poliúria, polidipsia, polifagia e hiperglicemia (SCRIDON *et al.*, 2015) auxiliando na pesquisa por novas terapias para o DM.

2 NÚMEROS DO DM

O DM tem prevalência e significância crescentes na vida da população, com números alarmantes e projeções preocupantes (Figura 4). Estima-se que 537 milhões de adultos com idade entre 20 e 79 anos em todo o mundo (10,5% de todos os adultos nesta faixa etária) têm diabetes. Projeta-se que em 2030, 643 milhões e em 2045, 783 milhões de adultos com idade entre 20 e 79 anos terão diabetes. Assim, estima-se que embora a população mundial cresça 20% neste período, o número de diabéticos aumentará em 46% (IDF, 2021).

Figura 4. Número de pessoas com diabetes em todo o mundo e por região em 2021–2045 (20–79 anos)



Fonte: Adaptado de IDF (2021).

Números de novos e existentes casos de DM1 estão aumentando a cada ano devido ao aumento da incidência em muitos países (TUOMILEHTO *et al.*, 2020) e

reduções em mortalidade. No total, estima-se que 1.211.900 crianças e adolescentes menores de 20 anos tenham DM1 globalmente e que cerca de 108.200 crianças e adolescentes menores de 15 anos são diagnosticados cada ano. Este número sobe para 149.500 quando a idade alcance se estende a menores de 20 anos. O Brasil ocupa o terceiro lugar em número de casos prevalentes de DM1 em pessoas com menos de 20 anos (92.300) (IDF, 2021).

A incidência e prevalência do DM2 de início na juventude varia de acordo com a etnia e outros fatores. Populações com alta incidência e prevalência de DM2 em jovens também têm maior risco de DM2 entre adultos. As maiores taxas de incidência de DM2 na juventude foram relatadas no Brasil e México, bem como populações indígenas nos Estados Unidos da América (EUA) e Canadá, e entre as populações negras nas Américas (160-3.300 por 100.000) (TELO *et al.*, 2019; SIMENTAL-MENDIA *et al.*, 2020; LAWRENCE *et al.*, 2021), e o mais baixo nas populações da Europa (0,6 a 2,7 por 100.000) (KHANOLKAR *et al.*, 2016; OESTER *et al.*, 2016).

A incidência do DM2 é extremamente baixa entre crianças pré-púberes, mas aumenta gradualmente na puberdade, provavelmente devido a mudanças hormonais e RI associada à puberdade. As taxas de incidência são mais altas em meninas do que meninos, uma diferença que não se observa em adultos; isso não é bem compreendido, mas pode ser devido a efeitos diferenciais dos hormônios sexuais ou diferenças conhecidas no ganho de peso e hábitos de vida durante e após a puberdade (CANDLER *et al.*, 2018; DIVERS *et al.*, 2020).

O diabetes é um dos principais fatores de mortalidade em todo o mundo, embora seu impacto varie por região. Excluindo os riscos de mortalidades associados à pandemia COVID-19, estima-se que aproximadamente 6,7 milhões de adultos entre a idade de 20-79 morreram como resultado de diabetes ou suas complicações em 2021. Isso corresponde a 12,2% das mortes globais por todas as causas nesta faixa etária. Aproximadamente um terço (32,6%) de todas as mortes de diabetes ocorre em pessoas em idade produtiva (menores de 60 anos de idade). Isso corresponde a 11,8% do total mortes globais em pessoas com menos de 60 anos (IDF, 2021).

Diabetes impõe um fardo econômico substancial sobre os países, sistemas de saúde, pessoas com diabetes e suas famílias (YANG *et al.*, 2012; PETERS *et al.*, 2017; AMERICAN DIABETES, 2018). Em nível internacional, o maior índice relacionando o diabetes ao gasto com saúde é observado nos EUA (US\$ 379,5

bilhões), seguida pela China (US\$ 165,3 bilhões) e Brasil (US\$ 42,9 bilhões) (IDF, 2021).

3 CONTROLE E TRATAMENTO DO DM

Ambos os tipos de diabetes, DM1 e DM2, estão associados às complicações graves consequentes das flutuações agudas da glicemia (hipoglicemia, cetoacidose diabética ou síndrome hiperosmolar não cetótica) e da hiperglicemia crônica, características da doença (SBD, 2019). As complicações decorrentes do descontrole glicêmico (disglicemia) são representadas pelas doenças macrovasculares (doença cardiovascular, doença vascular periférica e acidente vascular cerebral) e microvasculares (retinopatia, nefropatia e neuropatia) e, quando presentes, contribuem para o aumento da mortalidade (MORRISH *et al.*, 2001), redução da qualidade de vida e aumento dos custos com tratamento da doença (LIYANAGE *et al.*, 2015; DA ROCHA FERNANDES *et al.*, 2016; AMERICAN DIABETES, 2018).

Embora os mecanismos precisos dos danos vasculares induzidos pela hiperglicemia sejam complexos e não totalmente compreendidos, acredita-se que as concentrações elevadas de glicose intracelular aumentem a produção de espécies reativas de oxigênio, alterando uma série de vias a jusante, incluindo o fluxo da via dos polióis, formação e ativação de produtos finais de glicação avançada (*Advanced Glycation End-product* - AGE), ativação de proteína quinase C e fluxo da via de hexosamina (BROWNLEE, 2001).

3.1 Controle glicêmico

O objetivo do tratamento do paciente com DM é a prevenção das complicações da doença, avaliado por meio da obtenção de metas métricas relacionadas ao controle glicêmico. Os parâmetros associados ao controle glicêmico eram atribuídos à tríade composta por glicemia de jejum, glicemia pós-prandial (refletindo as flutuações agudas da glicemia) e HbA1c (representando a hiperglicemia crônica) (KALRA; GUPTA, 2015; SBD, 2019). No entanto, na última década, com a crescente disponibilização de novos dados, advindos do sistema de monitorização contínua de glicose (SMCG), a avaliação dos resultados glicêmicos no tratamento do DM1 e do DM2 sofreu questionamentos, avaliações e mudanças. Como consequência

do SMCG, os relatórios clínicos apresentaram dados como perfil ambulatorial de glicose, estatísticas relacionadas às médias (glicose média, tempo no alvo), bem como marcadores relacionados à variabilidade glicêmica (como coeficiente de variação analítica e desvio-padrão). Esse avanço trouxe a necessidade de desenvolver técnicas para a certificação e análise dessas métricas, a fim de aplicar em pesquisa científica e influenciar a prática clínica considerando indivíduos com DM (BROWN; BASU; KOVATCHEV, 2019).

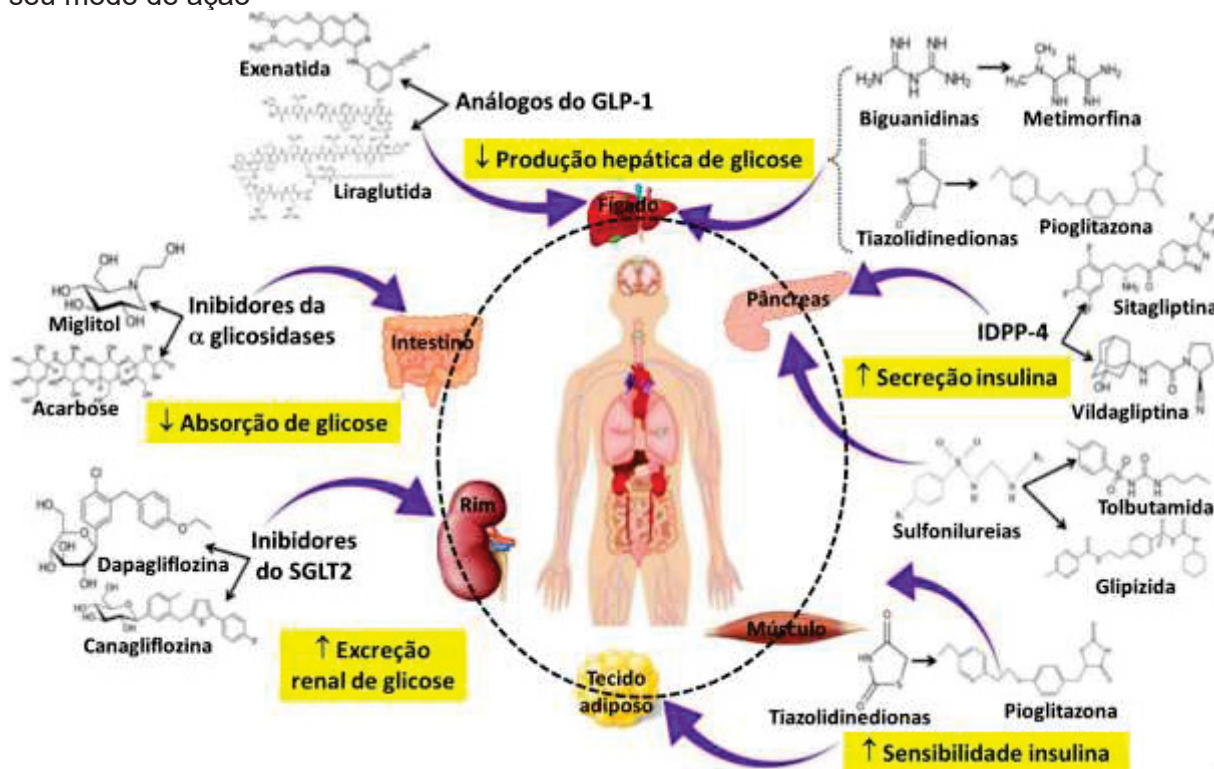
Assim, a terapia medicamentosa do DM tem como foco evitar a hiperglicemia, porém, o diabético também deve estar constantemente atento para episódios de hipoglicemia, visto que o diabetes descontrolado pode levar ao coma e, se não tratado, à morte, devido à cetoacidose diabética ou síndrome hiperosmolar não cetótica (CRAIG et al., 2014). Dessa forma, é necessário controle da doença a curto e longo prazo, o que consiste em um conjunto de cuidados diários, que envolve melhora da qualidade de vida, com a prática de atividade física, cuidados com a alimentação e tratamento medicamentoso (ADA, 2021).

O controle, o tratamento e os sintomas do DM irão depender de alguns fatores, como por exemplo, o tipo e duração do DM e hábitos de vida do indivíduo (ADA, 2021). O não cumprimento dos planos terapêuticos definidos pode resultar em complicações clínicas, estresse físico e emocional ocasionados pela necessidade de sucessivas hospitalizações, acarretando consequentemente implicações econômicas e financeiras aos sistemas de saúde (SOKOL *et al.*, 2005).

As opções terapêuticas atuais incluem hipoglicemiantes orais ou injeções de insulina. As principais classes convencionais de medicamentos para o tratamento da hiperglicemia incluem sulfonilureias (aumentam a liberação de insulina pelas Ilhotas pancreáticas); biguanidas (reduzem a produção hepática de glicose); agonistas do receptor γ ativado por proliferadores de peroxissoma (*Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- γ* - PPAR γ) (reforçam a ação da insulina); Inibidores da α -glicosidase (interferem na absorção de glicose no intestino) (CHAUDHURY *et al.*, 2017) (Figura 5), bem como incretinomiméticos e Inibidores da excreção do transportador sódio glicose. Essas classes de drogas são administradas como monoterapia ou em combinação com outro hipoglicêmico. Hipoglicemia grave, ganho de peso, redução da eficácia terapêutica devido ao regime de dosagem impróprio ou ineficaz, baixa potência e efeitos colaterais devido ao metabolismo da droga e falta de especificidade ao alvo, problemas de solubilidade e permeabilidade são as principais

desvantagens associadas ao uso das drogas convencionais acima mencionadas (FEINGOLD, 2000). Apesar do advento de agentes antihiperglicêmicos promissores, os principais desafios no tratamento eficiente do diabetes incluem a otimização das terapias existentes para garantir concentração de glicose ideal e balanceada, bem como reduzir complicações relacionadas ao diabetes em longo prazo (TAN *et al.*, 2019).

Figura 5. Representação pictórica de diferentes categorias de medicamentos antidiabéticos e seu modo de ação



Abreviações: GLP-1: peptídeo-1 semelhante ao glucagon; SGLT2: cotransportador sódio-glicose 2.
Fonte: Adaptado de Mishra e colaboradores (2021)

A utilização da insulina também apresenta desvantagens como a RI, a anorexia nervosa, a atrofia cerebral e a esteatose hepática (YARYURA-TOBIAS; PINTO; NEZIROGLU, 2001). Anormalidades no metabolismo dos macronutrientes (carboidratos, lipídeos e proteínas) também são desvantagens a serem citadas, sendo resultado do papel da insulina como hormônio anabólico (KHARROUBI; DARWISH, 2015). A hipoglicemia é o principal fator limitante da terapia intensiva com insulina (DONNELLY *et al.*, 2005; LUDDEKE *et al.*, 2007). Episódios múltiplos de hipoglicemia podem levar à disfunção autonômica e desconhecimento da hipoglicemia, iniciando um ciclo de hipoglicemia recorrente (CRYER, 2013). Além disso, a terapia intensiva

com insulina também contribui para o ganho de peso e as consequências cardiometabólicas da obesidade: hipertensão, dislipidemia e aumento da doença aterosclerótica e risco cardiovascular (PURNELL *et al.*, 2003; ORCHARD *et al.*, 2006; PAMBIANCO; COSTACOU; ORCHARD, 2007; RODRIGUES *et al.*, 2011; CHILLARON *et al.*, 2014).

No caso do DM1 geralmente o controle envolve aplicações diárias de insulina, monitoramento da glicemia capilar e acompanhamento da ingestão de carboidratos (ADA, 2021). À medida que as concentrações de HbA1c diminuem, o risco de hipoglicemia aumenta para pacientes com diabetes que dependem de terapia com insulina (DIABETES CONTROL AND COMPLICATIONS TRIAL RESEARCH GROUP *et al.*, 1993; THE DIABETES CONTROL AND COMPLICATIONS TRIAL RESEARCH GROUP, 1996).

Pramlintide, um análogo à amilina, o único agente atualmente aprovado como um adjuvante da insulina para o tratamento do DM1 nos EUA, reduz a HbA1c, mas está associado a um risco aumentado de hipoglicemia grave e efeitos colaterais gastrointestinais (RATNER *et al.*, 2004; BODE; GARG, 2016). Desta forma, há grande interesse na combinação de medicamentos com a insulina, para a melhora do controle glicêmico sem risco aumentado de hipoglicemia ou ganho de peso (DANNE *et al.*, 2019).

Já o tratamento para o DM2 se inicia com mudança de estilo de vida, seguido da utilização de uma ou mais classes de hipoglicemiantes orais, podendo ainda ser combinado com a insulina (ADA, 2021). Devido ao controle deficiente do diabetes, a maioria dos pacientes requer múltiplas terapias para alcançar um bom controle glicêmico em longo prazo. A hipoglicemia é um dos principais fatores de risco que deve ser observado quando combinações de vários agentes farmacológicos são usados concomitantemente. A escolha de quais agentes farmacológicos serão utilizados para cada paciente deve ser um processo de tomada de decisão compartilhada. O custo, potenciais efeitos colaterais, potenciais benefícios, eficácia na redução da glicose e regime de dosagem são aspectos a serem levados em consideração antes da seleção de um medicamento, que deve ser submetido frequentemente aos ajustes de dosagem (TURNER *et al.*, 1999).

3.2 Controle de alvos não glicêmicos

Além dos alvos glicêmicos, alvos específicos não glicêmicos (redução de peso, controle da pressão arterial, ação diurética, proteção renal, diminuição da rigidez arterial e redução do ácido úrico) também têm sido recomendados para conferir benefícios cardiovasculares (ADA, 2021), uma vez que constitui a principal causa de morbidade e mortalidade para indivíduos com diabetes (RAO KONDAPALLY SESHASAI *et al.*, 2011) e resulta em elevado gasto associado ao diabetes (AMERICAN DIABETES, 2018).

Condições comuns que coexistem com DM2 (por exemplo, hipertensão e dislipidemia) são fatores de risco claros para doença cardiovascular (DCV), e o próprio diabetes confere risco independente. Numerosos estudos têm mostrado eficácia do controle de fatores de risco cardiovascular individuais na prevenção ou desaceleração de DCV em pessoas com diabetes (ADA, 2021).

Embora a ação da insulina prejudicada seja chamada de RI é a base patogênica do DM2, também pode afetar pacientes com DM1 (PRIYA; KALRA, 2018). A etiologia da RI no DM1 é provavelmente multifatorial, envolvendo fatores genéticos e ambientais, bem como sua interação (PANKOW *et al.*, 2004; CLELAND *et al.*, 2013). Acredita-se que RI genética/familiar e vários fatores ambientais, como RI adquirida por estilo de vida, RI induzida por terapia com insulina exógena (superinsulinização), constituam a base do fenótipo do diabetes duplo. De acordo com Cleland e colaboradores (2013), os fatores genéticos e de estilo de vida que levam ao DM2 podem existir como RI, que é uma síndrome que inclui hiperinsulinemia, dislipidemia (definida como concentrações de triglicerídeos altas e de lipoproteína de alta densidade (HDL) baixas), hipertensão e obesidade (TREVISAN *et al.*, 1998). Tem-se por hipótese que a adiposidade constitui o principal fator subjacente que leva ao desenvolvimento da RI (PANKOW *et al.*, 2004). No entanto, estudos que exploraram a relação entre fatores de estilo de vida e a RI em detalhes são limitados. Há, ainda, uma tendência crescente de sobrepeso e obesidade entre os indivíduos com DM1 (CONWAY *et al.*, 2010).

Obesidade ou excesso de peso no DM1 resulta da inatividade física, estilo de vida sedentário e mudanças na dieta (aumento do consumo de açúcar e carboidratos de rápida absorção). Isso geralmente está associado a RI ou mudanças de estilo de vida que podem levar a RI, aumento das necessidades de dose de insulina e controle

glicêmico deficiente. Além disso, requerimento de dose de insulina aumenta e a falta do controle glicêmico, juntamente com o aumento da dose devido ao ganho peso induzido pela insulina é o que desencadeia a RI, gerando um círculo vicioso (KJAER *et al.*, 2015).

Para prevenção e gestão das DCV, os fatores de risco cardiovasculares devem ser sistematicamente avaliados pelo menos anualmente em todos os pacientes com diabetes. Esses fatores de risco incluem obesidade/sobrepeso, hipertensão, dislipidemia, tabagismo, história familiar de doença coronariana prematura, doença renal crônica e a presença de albuminúria. Grandes benefícios são vistos quando vários fatores de risco cardiovascular são tratados simultaneamente. Sob o paradigma recente de modificação agressiva do fator de risco em pacientes com diabetes, há evidências de que medidas de risco de doença cardíaca coronária em 10 anos entre adultos com diabetes nos EUA melhoraram significativamente na última década (ALI *et al.*, 2013) e que a morbidade e a mortalidade da DCV diminuíram (BUSE *et al.*, 2007; GAEDE *et al.*, 2008).

Desta forma, é imperativo ter um medicamento que também resolveria a complicação macrovascular, a causa mais significativa de mortalidade em pacientes diabéticos. Notavelmente, a maioria das evidências que suportam intervenções para a redução do risco cardiovascular no diabetes vem de ensaios com pacientes DM2. Poucos ensaios foram especificamente projetados para avaliar o impacto das estratégias de redução do risco cardiovascular em pacientes DM1.

3.2.1 Hipertensão

Para indivíduos com diabetes e hipertensão, com menor risco de DCV, a ADA recomenda o tratamento para uma meta de pressão arterial inferior a 140/90 mmHg para indivíduos com diabetes e hipertensão com menor risco de DCV. Alvos inferiores a 130/80 mmHg, devem ser considerados para indivíduos que têm maior risco cardiovascular ou DCV pré-existente. A terapia anti-hipertensiva deve ser iniciada com uma classe de medicamentos que tenha demonstrado benefício cardiovascular, como inibidores da enzima de conversão da angiotensina (ECA), bloqueadores dos receptores da angiotensina (ARBs), diuréticos do tipo tiazídico ou bloqueadores dos canais de cálcio diidropiridínicos. ECA ou ARBs são os tratamentos de primeira linha para indivíduos com albuminúria (ADA, 2021).

3.2.2 Lipídeos

A ADA recomenda que pacientes com diabetes e idade entre 40-75 anos sem doença cardiovascular aterosclerótica, usem terapia moderada a intensiva com estatinas, além de terapia de estilo de vida. Para pacientes com diabetes e idade entre 20-39 anos com fatores de risco de DCV adicionais, pode ser razoável iniciar terapia com estatinas, além de terapia de estilo de vida. Em pacientes com diabetes em maior risco, especialmente aqueles com múltiplos fatores de risco de DCV ou com idade entre 50-70 anos, é razoável usar terapia com estatina de alta intensidade. Em adultos com diabetes e risco de 20% ou mais de doença cardiovascular aterosclerótica em 10 anos, pode ser razoável adicionar ezetimibe à terapia com estatina maximamente tolerada para reduzir as concentrações de lipoproteína de baixa densidade (LDL) em 50% ou mais (ADA, 2021).

Existem dados muito limitados para o gerenciamento de lipídios em pacientes com DM1 de qualquer idade. Limitadas evidências sugerem que a prevenção primária com medicamentos hipolipemiantes diminui a incidência da DCV (SCHOFIELD; HO; SORAN, 2019). Um modelo de predição para eventos de DCV em DM1 para ajudar na tomada de decisão para prevenção primária mostra-se promissor, mas precisa de mais validação (VISTISEN *et al.*, 2016). Há novas evidências da contribuição da autoimunidade cardíaca para DCV no DM1 na coorte “*Diabetes Control and Complications Trial*” (DCCT) que alerta para mais investigação (SOUSA *et al.*, 2019).

JUSTIFICATIVA

A Organização Mundial da Saúde (OMS) recomenda que os tratamentos alternativos para manutenção da glicemia adequada sofram avaliação mais aprofundada (*World Health Organization* - WHO, 1980). A busca por terapias adjuvantes torna-se promissora, principalmente quando usada em combinação com a insulina e hipoglicemiantes orais em pacientes com DM visando melhorar o controle glicêmico e, ainda, minimizar os efeitos adversos (ADA, 2021). Dessa forma, a busca de novas terapias adjuntas em DM pode fornecer perspectivas para o futuro visando a redução das limitações das terapias atuais (HARRIS *et al.*, 2018). Acredita-se que os compostos de vanádio possam agir como um possível aliado à insulina no tratamento do DM (SAKURAI, HIROMU, 2002; CLARK *et al.*, 2014).

O tratamento do diabetes baseado em um algoritmo terapêutico homogêneo, frequentemente leva ao fracasso terapêutico com várias complicações diabéticas (IDF, 2021). Com o avanço das tecnologias de sequenciamento de alto rendimento, dados “ômicos” combinados, como genômica, transcritômica, proteômica, metabolômica, podem ser acumulados e usados no perfil global de saúde e doenças (HASIN; SELDIN; LUSIS, 2017). Análise combinada destes dados e dos dados clínicos e laboratoriais coletados rotineiramente podem ser usados em abordagens terapêuticas de forma personalizada (KARLSSON *et al.*, 2013; UECKERT *et al.*, 2014). A medicina personalizada é a estratégia mais promissora no tratamento de doenças complexas poligênicas como DM, por causa da variabilidade em fenótipos em grupos populacionais e a necessidade de determinar a medicação apropriada para cada indivíduo (MARIN-PENALVER *et al.*, 2016).

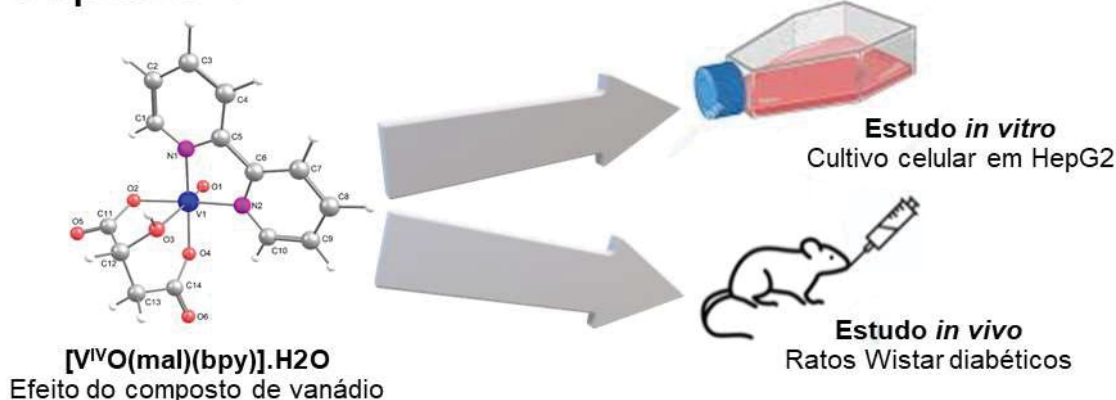
Este novo paradigma é baseado na estrutura genética e metabólica do paciente para personalizar o diagnóstico, prevenção, prognóstico e tratamento do diabetes. Compreendendo a prevalência generalizada de diabetes, o manejo personalizado do diabetes é considerado imperativo. O caminho para a medicina personalizada é interessante, mas desafiador. Numerosas tecnologias genômicas levaram à identificação de vários *loci* genéticos associados ao DM (RAM *et al.*, 2016; MAMBIYA *et al.*, 2019). No entanto, o perfil completo das variantes em genes de susceptibilidade ao DM permanece inadequadas, sendo necessários mais estudos genéticos em várias etnias. A identificação e conhecimento da variação genética individual e seu papel na predisposição e patogênese do DM constitui um passo

significativo no manejo da doença, melhorando as condições clínicas e evitando complicações. Tem sido mostrada uma importante associação entre os fatores genéticos e tratamentos farmacológicos, incluindo resposta ao tratamento (VENKATACHALAPATHY *et al.*, 2021) e efeitos adversos (BAYE *et al.*, 2021).

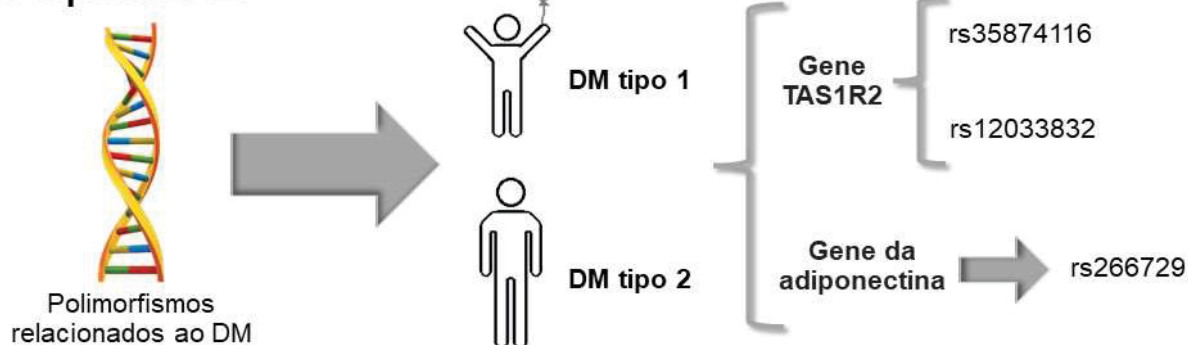
Considerando que o DM é uma doença severa, que não tem cura e possui alta prevalência e a necessidade de impulsionar o conhecimento acerca da sua etiologia, bem como, contribuir com a pesquisa por novos medicamentos para tratamento da doença que afeta cerca de 9,5% da população brasileira (MUZY *et al.*, 2021), a presente pesquisa adotou duas vertentes esquematizadas na Figura 6.

Figura 6. Resumo esquemático do projeto de pesquisa

Capítulo 1



Capítulo 2



Fonte: Autor (2022).

A primeira vertente é apresentada no Capítulo 1 e aborda o efeito de um novo composto de vanádio no diabetes, inicialmente estudado *in vitro* por meio do cultivo celular em HepG2 e posteriormente *in vivo* no modelo animal em ratos Wistar machos com diabetes induzido pela estreptozotocina.

No Capítulo 2 é apresentado o estudo dos polimorfismos relacionados ao DM1 de início precoce e tardio e DM2. Nesse estudo foram selecionados dois polimorfismos (rs35874116 e rs12033832) no gene *TAS1RS* que codifica a proteína que age como receptor do paladar doce, denominado de T1R2 (ZHAO *et al.*, 2010) e um polimorfismo (rs266729) no gene da adiponectina, um hormônio relacionado ao consumo alimentar, considerado um sinal de adiposidade e que se relaciona com RI (YAMAUCHI, TOSHIMAS.; KADOWAKI, 2013).

CAPÍTULO 1. EFEITO DE OXIDOVANÁDIO ($[V^{IV}O(MAL)(BPY)] \cdot H_2O$) NA CAPTAÇÃO DA GLICOSE EM HEPG2 E EM PARÂMETROS METABÓLICOS E BIOQUÍMICOS DE RATOS WISTAR COM DIABETES INDUZIDA COM ESTREPTOZOTOCINA

1 OBJETIVOS

1.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito de oxidovanádio ($[V^{IV}O(mal)(bpy)] \cdot H_2O$) para terapia do diabetes com análises *in vitro* e *in vivo*.

1.2 Objetivos específicos

- Avaliar o efeito do oxidovanádio quanto a captação de glicose em cultivo celular com a linhagem hepática HepG2, resistentes à insulina;
- Avaliar a citotoxicidade do oxidovanádio *in vitro* através do teste de viabilidade celular;
- Avaliar o efeito do oxidovanádio sobre o controle glicêmico e perfil lipídico em modelo animal (com indução do diabetes por estreptozotocina);
- Utilizar o teste comportamental para avaliar a influência do oxidovanádio *in vivo* através por meio do teste de campo aberto.

2 ESTUDOS DE COMPOSTOS DE VANÁDIO NO TRATAMENTO DO DIABETES

2.1 Aspectos fisiológicos do vanádio

O vanádio (V) é um elemento de transição (com número atômico 23 e peso atômico relativo de 50,94) e é capaz de formar vários compostos, funcionando como um ânion ou um cátion (IMTIAZ *et al.*, 2015). Existe nos estados de oxidação +2, +3, +4 e +5, mais comumente na forma tetravalente e pentavalente (HE *et al.*, 2021).

Nos mamíferos em geral, sua deficiência prejudica funções vitais e, por isso, representa um elemento necessário na dieta diária (MOSKALYK; ALFANTAZI, 2003). São alimentos considerados fonte de vanádio na dieta humana: pimenta do reino, endro, salsa, cogumelos, espinafre, pescados e frutos do mar como ostras e mexilhões, cereais (O'CONNELL, 2001).

O vanádio é o 22º elemento mais abundante na Terra (0,013% w/w), e é amplamente distribuído em todos os organismos. Em humanos, o teor de vanádio no plasma sanguíneo é cerca 200 nM, enquanto nos tecidos é cerca de 0,3 mg/kg e principalmente encontrado em ossos, fígado e rins. Em vertebrados, vanádio entra no organismo principalmente por meio dos tratos digestivos e respiratório por meio da ingestão de alimentos e inalação de ar (REHDER, 2020). A ingestão alimentar diária estimada nos EUA é de 10 a 60 µg/dia, onde os alimentos não processados têm quantidades variáveis de até 10 ppb, mas não superior a 1 µg/g de alimentos de origem animal ou vegetal. Da mesma forma em outros países, as concentrações dietéticas de vanádio de peso seco flutuam amplamente, por exemplo, no Brasil entre 21,6-54,2 µg/g (PAL *et al.*, 2018; TRIPATHI; MANI; PAL, 2018). Além disso, o vanádio é encontrado na água potável em concentrações em torno de 1 µg/L; assim, sua ingestão por esta fonte depende do volume diário ingerido (ATSDR, 2012). Portanto, a dose diária típica consumida por humanos corresponde a 10-30 µg de vanádio por dia; no entanto, a maior parte do vanádio proveniente da dieta é geralmente excretado nas fezes, o que significa que o acúmulo de vanádio no corpo não constitui um risco potencial (WILLSKY *et al.*, 2006; COSTA PESSOA, TOMAZ, 2010; REHDER, 2012).

2.1.1 Exposição ambiental e toxicologia do vanádio

As concentrações de vanádio no ar ambiente são naturalmente baixas (ATSDR, 2012; REHDER, 2015). O trato digestivo é outra forma de acesso ao vanádio. Estudos em humanos relataram que o vanádio é pouco absorvido (0,2% a 1,0%) e o jejum, a composição da dieta e a especiação química podem afetar a absorção (LEVINA *et al.*, 2014; MA, JIN. *et al.*, 2016). O nível mínimo de risco (*Minimal Risk Level* - MRL) que é definido pela Agência de Substâncias Tóxicas e Registro de Doenças (*Agency for Toxic Substances and Disease Registry* - ATSDR) é uma estimativa da exposição humana diária a uma substância que provavelmente não terá um risco apreciável de efeitos adversos. No caso do vanádio, a dosagem do nível de efeito adverso não observado (*No-Observed-Adverse-Effect Level* - NOAEL) e menor nível de efeito adverso observado (*Lowest-Observed-Adverse-Effect Level* - LOAEL) na inalação e ingestão em exposição aguda, intermediária e crônica é apresentado na Tabela 1.

Tabela 1. Nível mínimo de risco (MRL) para inalação de vanádio e ingestão oral

<i>MRL de inalação</i>	Duração aguda	0,0008 mg de V ₂ O ₅ /m ³ /14 dias ¹
	NOAEL	0,34-0,56 mg de vanádio/m ³ /13 dias ^{1,2}
	LOAEL	0,56 mg de vanádio/m ³ ^{1,2}
	Duração intermediária	4,4 mg de V ₂ O ₅ /m ³ por 6 h/dia, 5 dias por semana por ao menos 4 semanas ^{2,3}
	NOAEL	0,56 mg de vanádio/m ³ ^{2,3}
	LOAEL	4,5 mg de vanádio/m ³ homens ³ 2,2 mg de vanádio/m ³ mulheres ³
	Duração crônica	0,0001 mg de V ₂ O ₅ /m ³ por 6 h/dia, 5 dias por semana por ao menos 1 ano ²
	NOAEL	Não definido
	LOAEL	≥ 0,56 mg de vanádio/m ³ ²
<i>MRL de ingestão</i>	Duração aguda	0,009 mg de vanádio/Kg/dia ⁴
	NOAEL	0,2 mg de vanádio/Kg/dia ^{5,6}
	LOAEL	0,35 mg de vanádio/Kg/dia ^{5,7-9}
	Duração intermediária	0,01 mg de vanádio/Kg/dia por 15-364 dias ¹⁰⁻¹²
	NOAEL	0,12 mg de vanádio/Kg/dia por 364 dias ¹¹
	LOAEL	1,18 mg de vanádio/Kg/dia ¹⁰
	Duração crônica	Não definido
	NOAEL	Não definido
	LOAEL	Não definido

Abreviações: MLR: nível mínimo de risco; NOAEL: nível de efeito adverso não observado; LOAEL: menor nível de efeito adverso observado.

Referências: 1. (NTP., 2002); 2. (NTP., 2008); 3. (NTP., 2011); 4. (ATSDR, 2012); 5. (ZAPOROWSKA, H.; WASILEWSKI, 1989); 6. (ZAPOROWSKA; WASILEWSKI; SLOTWINSKA, 1993); 7. (FAWCETT *et al.*, 1997); 8. (SANCHEZ *et al.*, 1991); 9. (DOMINGO; GÓMEZ, 2016); 10. (DAI; VERA; MCNEILL,

1995); 11. (IMURA *et al.*, 2013); 12. (SUN *et al.*, 2017); 13. (WILK; SZYPULSKA-KOZIARSKA; WISZNIEWSKA, 2017).

Fonte: Adaptado de (TREVIÑO *et al.*, 2019; TREVIÑO; DIAZ, 2020).

Embora indivíduos que consumiram doses de 7,8-10 mg de vanádio/dia/2 semanas não mostram sintomas adversos, doses mais altas (14-42 mg de vanádio/dia/2 semanas) causam problemas gastrointestinais, incluindo desconforto abdominal, irritação, cólicas, diarreia, náuseas e vômitos (GOLDFINE *et al.*, 2000).

Um aumento significativo das concentrações de reticulócitos em sangue periférico e eritroblastos policromatofílicos na medula óssea foram observados em ratos expostos a uma dose de 27,72 mg vanádio/kg/dia por duas semanas (ZAPOROWSKA, H.; WASILEWSKI, 1989). A dose de 7,5-8,4 mg de vanádio/kg/dia durante a gestação relatou efeitos de desenvolvimento na prole de ratos e camundongos que incluíam diminuição no crescimento fetal e aumento de anomalia de reabsorção, bem como malformações grosseiras, viscerais e esqueléticas (SANCHEZ *et al.*, 1991; DOMINGO; GÓMEZ, 2016). Assim, neste caso, a dose de LOAEL identificada no animal para efeitos de desenvolvimento corresponde a 7,5 mg vanádio/ kg/dia (DOMINGO; GÓMEZ, 2016). A dose de NOAEL foi estabelecido em 0,2 mg de vanádio/kg/dia para um MRL oral de duração aguda. Foi observado que tratamentos com vanádio de longo prazo levam a diminuições significativas na contagem de eritrócitos em ratos expostos a 1,18 mg vanádio/kg/dia na forma de metavanadato de amônio na água potável durante 4 semanas e uma diminuição da hemoglobina que é compensada com aumento do reticulócito no sangue periférico (ZAPOROWSKA; WASILEWSKI; SLOTWINSKA, 1993).

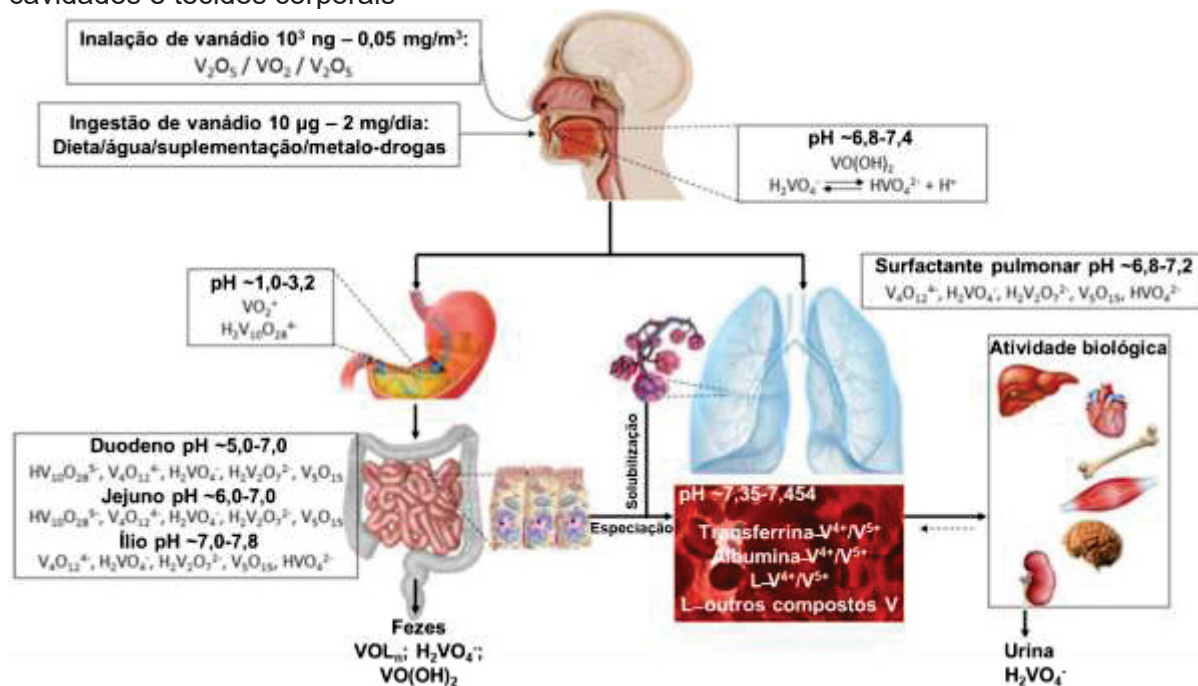
No entanto, estudos anteriores de duração intermediária não encontraram alterações em doses de até 9,7 mg vanádio/kg/dia (DAI; VERA; MCNEILL, 1995; IMURA *et al.*, 2013). Notavelmente, o consumo de 1,72 mg vanádio/kg/dia mostrou desempenho prejudicado em testes neurocomportamentais (como os testes de campo aberto e de esquiwa ativa/passiva) em ratos expostos ao metavanadato de sódio por 8 semanas (SUN *et al.*, 2017). Camundongos BALB/c (4 semanas de idade) administrados com 3 mg de vanádio/kg/dia (metavanadato de sódio), três vezes por semana por 3, 6, 9, 12, 15 e 18 meses, mostraram ativação astrocítica e microglial após 6 meses. Além disso, as células piramidais corticais mostraram alterações morfológicas, incluindo picnose, agregação celular, perda do padrão de camadas e vacuolização citoplasmática, perda de arborização dendrítica das células piramidais

da região CA1 do hipocampo dorsal e perda da camada de células de Purkinje (FOLARIN *et al.*, 2017).

2.1.2 Absorção e especiação química *in vivo* do vanádio

Os pulmões constituem o principal local de entrada para exposição ambiental de vanádio através da respiração. O tamanho das partículas contendo vanádio e a solubilidade dos compostos de vanádio são fatores importantes na determinação da taxa de absorção do vanádio no trato respiratório. Ingestão oral de vanádio envolve principalmente duas espécies: vanadatos (HVO_4^{2-} , estado de oxidação +5; V^{5+}) presente na água potável e vanadil (VO^{2+} , estado de oxidação +4; V^{4+}). Compostos V^{5+} são parcialmente reduzidos no estômago e, posteriormente, precipitam no meio ligeiramente alcalino dos intestinos para formar o $\text{VO}(\text{OH})_2$ que é moderadamente solúvel (REHDER, 2015). Por outro lado, HVO_4^{2-} é mais facilmente absorvido no trato gastrointestinal e é absorvido de 3 a 5 vezes mais efetivamente do que o VO^{2+} . Então, a velocidade na qual os compostos de vanádio são transformados no organismo e as espécies em que ele se transforma efetivamente afetam a porcentagem de vanádio ingerido que é absorvida, sendo representado a seguir (Figura 6).

Figura 6. Especiação e solubilização do vanádio na dependência do pH em diferentes cavidades e tecidos corporais



Os íons de vanádio (V) formam compostos estáveis nos estados de oxidação +4 e +5 em meio aquoso com pH fisiológico de 7 - enquanto no corpo humano espécies coordenadas também coexistem graças

a quelantes ou ligantes (L) levando a complexos de fórmula geral VOL ou VO₂L. Além do vanadato (+5) ânions (H₂VO₄⁻), também traços nanomolares de um cátion diatômico estável existe na forma de vanadil (+4) VO²⁺ devido à sua precipitação como óxido vanádio (+4)-hidróxido. Em pH mais baixo e na presença de quelantes, no entanto, organicamente complexados, não óxido-vanádio (+4 ou +5), são favorecidos sobre as chamadas espécies “não complexadas” (ou “livres”) e substitui gradualmente o oxigênio. Nesse contexto, alguns autores referem-se aos termos “não complexo” ou “livre” quando se trata de espécies inorgânicas de vanádio óxido-coordenadas.

Fonte: Adaptado de TREVIÑO *et al.*, 2019; TREVIÑO; DIAZ, 2020.

Dependendo do solvente circundante, diferentes espécies de vanádio são favorecidas (CRANS *et al.*, 2011). Cada uma dessas espécies tem diferentes propriedades químicas e, portanto, diferentes propriedades de respostas biológicas em fluidos, tecidos ou células (CRANS; BUNCH; THEISEN, 1989; CRANS *et al.*, 2011; REHDER, 2012) e podem formar diferentes complexos. Além disso, a especiação química dos compostos e sais de vanádio também é sensível às suas condições e meio ambiente e, como resultado, seu bioprocessamento químico é essencial para compreender seu modo de ação (CRANS *et al.*, 2004; CRANS *et al.*, 2011).

O vanadil aquoso pode existir tanto a forma catiônica como na aniônica (CRANS; BUNCH; THEISEN, 1989; KISS *et al.*, 2008). As espécies catiônicas tendem a se formar em pH ácido, enquanto as espécies aniônicas tendem a se formam em pH neutro e básico (Figura 6). Pouco se sabe sobre a especiação química do vanadil aquoso em pH neutro, principalmente porque neste pH não há sinal de ressonância paramagnética eletrônica (EPR), presumivelmente por causa da dimerização/oligomerização da espécie vanadil ou oxidação para V⁵⁺ (CRANS *et al.*, 2004; SHAFER *et al.*, 2012). Os estados de oxidação do vanádio são de extrema importância no desenvolvimento de novos compostos com aplicações biológicas devido ao impacto em suas propriedades farmacológicas e farmacocinéticas. Por exemplo, considera-se que as formas V⁴⁺ tendem a formar complexos de coordenação estáveis com ligantes, e o equilíbrio destes sistemas é mais lento do que aqueles para sistemas V⁵⁺ (SHAFER *et al.*, 2012; YOSHIKAWA *et al.*, 2014). No entanto, trabalhos recentes têm demonstrado que essa percepção não é válida para todos os tipos de ligantes e que existem complexos V⁵⁺ cujas características farmacológicas tornam mais agentes antidiabéticos potentes do que complexos V⁴⁺ (THOMPSON *et al.*, 2009; WILLSKY *et al.*, 2013).

O íon vanadato HVO₄²⁻ tem uma química rica (em parte devido ao seu pKa de 12) que dá origem a uma série de espécies que podem ser formadas em pH diferente. Em pH abaixo de 12, dois íons HVO₄²⁻ podem condensar e liberar água para formar o

dímero vanadato, $V_2O_7^{4-}$, que por sua vez pode ser protonado em um meio mais ácido. Um novo aumento na acidez para condições quase neutras promove a formação de oligômeros maiores. Nessas condições, as espécies predominantes são tetrâmeros ou pentâmeros cíclicos, $V_4O_{12}^{4-}$ ou $V_5O_{15}^{5-}$. Outros oligômeros que normalmente são encontrados como componentes secundários de uma solução em equilíbrio são o hexâmero cíclico e as espécies lineares de trímero, de tetrâmero e de hexâmero. A distribuição relativa das diferentes concentrações de espécies depende da concentração do vanadato total de tal forma que os compostos de menor nuclearidade são favorecidos em baixas concentrações. Em pH de 6 ou abaixo e concentrações de 0,2 mM e acima, o decâmero de vanádio (decavanadato) é formado e é a espécie predominante; no entanto, uma mistura de decavanadato monoprotonado e decavanadato diprotonado e pequenas quantidades de tetravanadato bem como vanadato livre estão presentes. Além disso, interação com proteína na célula leva à estabilização do decavanadato, sugerindo que este interage com locais específicos dentro destes (por exemplo, fosfatase alcalina, adenilato quinase, ATPases do tipo P, ABC ATPases, F-actina, miosina ATPase e ribonuclease) protegendo as espécies decaméricas contra a conversão para oxovanadatos estrutural e funcionalmente distintos (monômero, dímero ou tetrâmero de vanádio) (AURELIANO; OHLIN, 2014; MARQUES *et al.*, 2017).

Ao contrário de outros oligômeros de vanadato, estes oligômeros sofrem sucessivas reações de protonação com o aumento da acidez, passando de uma carga de -6 a -3, sendo os ânions -4 e -5 as formas predominantes. Condições ácidas muito fortes (ou seja, abaixo de um pH = 2) farão com que o decavanadato seja substituído pelas espécies catiônicas, $[VO^2(H_2O_4)]^+$ (muitas vezes referido como VO_2^+) Por causa da sua estequiometria altamente protonada em comparação com outros derivados de vanadato, o cátion é frequentemente o único composto em uma concentração significativa em solução sob condições fortemente ácidas, mesmo na presença de ligantes de forte ligação. Como o vanádio possui uma alta capacidade de alterar os estados de oxidação ou para trocar ligantes dependendo do ambiente, as moléculas circundantes terão um grande impacto na passagem do vanádio através das membranas celulares. Há, portanto, a necessidade de desenvolver drogas à base de vanádio contendo ligantes que protegem o composto da especiação química para conservar suas propriedades farmacológicas e aumentar sua absorção. A especiação química do vanádio é uma característica relevante e é impactada pela presença de

quelantes biológicos ou sintéticos, ligantes biogênicos ou carreadores funcionais (SANNA *et al.*, 2014).

2.1.3 Transporte das especiações do vanádio no sangue

Compostos de vanádio são expostos a diversos ambientes durante a sua administração antes de atingir a corrente sanguínea. Por exemplo, estes podem ser solubilizados por surfactante pulmonar em alvéolos ou ser exposto a um ambiente altamente ácido no estômago antes de sofrer biotransformação nas formas biologicamente ativas que circulam no plasma sanguíneo. Uma vez na corrente sanguínea, as espécies de vanádio se ligam às proteínas séricas, principalmente à transferrina e à albumina. Vanadil exhibe uma forte preferência para se ligar não apenas a proteínas, mas também com a carga negativa como moléculas de baixo peso molecular no soro (citrato, oxalato, lactato, fosfato, glicina e histidina) (SANNA; MICERA; GARRIBBA, 2009).

Em concentrações biologicamente relevantes de vanadil (isto é, $V^{4+} < 5 \text{ mM}$), a maior parte do vanádio na corrente sanguínea está ligada à transferrina, onde o íon V^{4+} se liga ao mesmo local de ligação que o íon Fe^{3+} (CORREIA *et al.*, 2017). A presença de um sítio de ligação de metal na transferrina o torna um carreador de vanádio mais eficiente do que albumina; está bem estabelecido que o vanádio pode deslocar 30-70% do íon de ferro original do complexo com a transferrina (KISS *et al.*, 1998; KISS *et al.*, 2006; KISS *et al.*, 2008). Curiosamente, foi demonstrado que mesmo embora V^{4+} exiba uma alta afinidade para o local de ligação do ferro da transferrina, é o V^{5+} a espécie capaz de se ligar a esta proteína na ausência do ânion sinérgico (por exemplo, carbonato) que é necessário para a ligação de ferro (HARRIS; CARRANO, 1984; COSTA-PESSOA *et al.*, 2015). Há evidências experimentais que indicam a vinculação do íon V^{5+} para o mesmo local de ligação ocupado pelo íon Fe^{3+} (HARRIS; CARRANO, 1984; COSTA-PESSOA *et al.*, 2013; TRIPATHI; MANI; PAL, 2018). Além disso, foi mostrado que os íons V^{5+} estão ligados a transferrina em soluções contendo a proteína ligada ao ferro, sugerindo que V^{5+} poderia estar localizado em um sítio de ligação diferente ou que ele poderia atuar como um ânion sinérgico para a ligação do ferro em seu sítio de ligação (COSTA-PESSOA *et al.*, 2013).

Estudos realizados com a espécie VO^{2+} identificaram na albumina um local de ligação de alta afinidade e pelo menos cinco sítios de ligação de vanádio de afinidade

relativamente baixa (COBBINA *et al.*, 2013; NASO *et al.*, 2016; CORREIA *et al.*, 2017). Algumas espécies de vanadil com propriedades intensificadoras da insulina apresentam uma vida relativamente longa na corrente sanguínea que se correlaciona ao teor de vanádio no sangue com a sua ligação à proteína de transporte albumina (MAKINEN; SALEHITAZANGI, 2014). Os resultados obtidos para a interação de V^{5+} -albumina não são tão claros e diretos, alguns deles sugerem que os locais de ligação provavelmente envolvem grupos carboxílicos de superfície em concentração muito baixas (máximo 0,3-0,4%) (HEINEMANN *et al.*, 2002) e em uma relação V^{5+} -albumina de 1: 1 (CRANS; BUNCH; THEISEN, 1989).

Por último, em concentrações mais elevadas, foi demonstrado que na corrente sanguínea V^{4+} pode até se ligar à imunoglobulina G (SANNA; MICERA; GARRIBBA, 2011; SANNA *et al.*, 2017) e dentro dos eritrócitos, está ligado principalmente à hemoglobina (DE CREMER *et al.*, 2002; DELGADO *et al.*, 2005; SANNA *et al.*, 2014).

A constante de estabilidade (constante de ligação) para a interação entre o VO^{2+} e as proteínas plasmáticas está a transferrina >> hemoglobina $\approx$ imunoglobulina G > albumina (SMITH; AINSCOUGH; BRODIE, 1995). Porém, deve-se levar em consideração o tipo de complexos de vanádio e seu grau de decomposição, saturação, especiação química e excreção para cada ligante.

Em fluidos extracelulares, vanádio, na forma de vanadato e vanadil é reduzido ou oxidado respectivamente, dependendo da presença de diferentes agentes redox-ativos. No caso do vanadato, devido ao pKa em pH fisiológico, força iônica, baixa concentração e ligantes potenciais, o íon V^{5+} existem no plasma sanguíneo principalmente como $H_2VO_4^-$ e HVO_4^{2-} , e não se espera que forme oligovanadatos (COSTA-PESSOA *et al.*, 2015).

Embora a química inorgânica sintética tenha desenvolvido diferentes tipos de oligovanadatos, considerando as diferentes condições fisiológicas (por exemplo, ambiente de absorção, concentração, pH, força iônica) é improvável que os oligômeros de vanadato possam durar dentro do corpo por longos períodos com base em sua instabilidade termodinâmica. Em pH $\approx$ 7, o único vanadato de relevância é o composto monovanadato $H_2VO_4^-$; no entanto, em maiores concentrações de vanadato, a formação de tetravanadatos torna-se mais viável (TREVIÑO *et al.*, 2019).

O vanadato também pode interagir com fosfatos para formação fosfovanadatos, como $H_nVPO_7^{(4-n)-}$, (n pode ser 1 ou 2) em condições de pH $\approx$ 7, onde o pKa é 7,2 dos compostos em uma força iônica de 0,15 M (SELLING *et al.*, 1994). Este composto

fosfovanadato está entre uma ou duas ordens de magnitude menos estável contra a hidrólise do que divanadato, mas seis ordens de magnitude mais estável do que o composto difosfato. Dadas as concentrações relativamente altas de fosfato sérico de 2,3 mM, os fosfovanadatos provavelmente contribuem para a especiação fisiológica do vanádio (BATISTA; FILHO; SERRA, 2017).

Outros ligantes, por exemplo, lactato, podem promover a formação de complexos de coordenação com espécies de vanádio, mas este fenômeno é apenas favorecido em condições ácidas; em pH fisiológico a formação do complexo é muito desfavorável. Ainda assim, em condições ligeiramente ácidas, os complexos de lactatovanádio dominantes são os complexos di- e tri-nucleares bis (ligante) de composição geral $V_2\text{Lac}_2^{2-}$ e $V_3\text{Lac}_2^{3-}$ (YOSHIKAWA *et al.*, 2014), onde “V” significa o centro de óxido ou dióxido de vanádio. No pH fisiológico (pH=7,4), o composto VLac_2 é a única espécie existente. Curiosamente, em condições ácidas, o sistema de ligantes misto composto por vanadato, lactato e citrato, forma um complexo bi-nuclear de composição $V_2\text{CitLac}^{n-}$ ($n = 2$ ou 3). Complexos binários de vanadato-citrato na faixa fisiológica de pH estão restritos a uma espécie de composição $V_2\text{Cit}^{4-}$ (GORZSÁS; ANDERSSON; PETTERSSON, 2003; REHDER, 2015).

2.1.4 Distribuição tecidual e celular do vanádio

Uma vez na corrente sanguínea, o vanádio é distribuído e armazenado em tecidos diferentes. O conteúdo de vanádio no plasma diminui em três fases: (i) A primeira fase é um declínio rápido com uma meia-vida de cerca de 1 h, seguida por uma segunda fase intermediária em que o vanádio diminui com meia-vida de cerca de 26 h, além disso, uma terceira fase lenta em que, em média, a meia-vida é de aproximadamente 10 dias. O conteúdo de vanádio no sangue é assim, reduzido para cerca de 30% nas primeiras 24 h, e cerca de 50% é recuperado na urina após 12 dias. Embora a depuração corporal ocorra diretamente por meio da excreção urinária, enquanto o vanádio permanecer na corrente sanguínea, a distribuição ocorre em diferentes tecidos, como o coração, fígado, rim, baço, cérebro, músculos, tecido adiposo e ossos. Neste contexto, a análise de ativação de nêutrons (*Neutron Activation Analysis* - NAA) tem sido uma das técnicas mais importantes utilizadas para determinar das concentrações totais de vanádio em diferentes órgãos (HEINEMANN; FICHTL; VOGT, 2003; SANNA *et al.*, 2017).

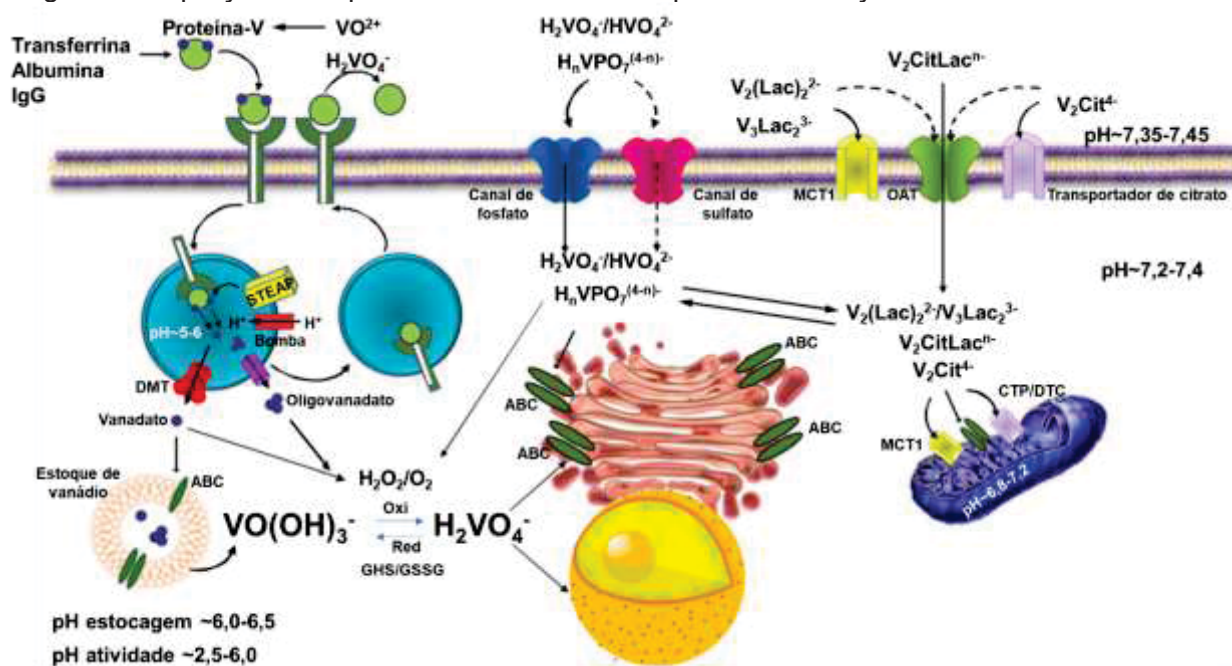
O maior tempo de residência do vanádio é nos ossos, onde substitui o fósforo no mineral hidroxiapatita, $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$, é superior a 1 mês, o que corresponde a uma meia-vida de 4-5 dias, por isso a estrutura óssea pode atuar como armazenamento para vanadato (REHDER, 2013). As análises feitas utilizando NAA encontraram as seguintes concentrações de vanádio em diferentes tecidos humanos (em ng/g de peso úmido): gordura e músculo, 0,55; coração, 1,1; rim, 3,0; fígado, 7,5; pulmão, 2,1; e tireoide, 3,1 (MA *et al.*, 2016; ŚCIBIOR *et al.*, 2018). Estudos identificaram que o colostro e o leite materno geralmente continham menos de 1,0 ng/g de vanádio de peso seco (KOSTA; BYRNE; DERMELJ, 1983). Além disso, concentrações de vanádio no couro cabeludo de adultos saudáveis foram encontradas na faixa de 433 pg/g a 90 ng/g (ALQHAZO; RASHAID, 2018; EQANI *et al.*, 2018). Em geral, as evidências demonstraram que a maioria dos tecidos contém menos de 10 ng de vanádio/g de peso úmido (TREVIÑO *et al.*, 2019).

Estudos com animais sob uma dieta de alto teor de vanádio indicam um aumento acentuado da retenção de metal em vários tecidos. Estudos em ratos mostram diferenças na distribuição de vanádio nos órgãos entre os animais alimentados com VOSO_4 e aqueles alimentados com outros compostos de vanádio, sugerindo um caráter distinto de longa ação dos diferentes complexos (TREVIÑO *et al.*, 2019). Também foi mostrado que a distribuição entre os órgãos ocorre primeiramente em tecidos que ocorre acúmulo do vanádio de curta duração e posteriormente em tecidos onde ocorre acúmulo de longo prazo (GORZSÁS; ANDERSSON; PETTERSSON, 2003). As análises de EPR em tempo real de espécies de VO^{2+} revelaram que as taxas de depuração do vanádio da corrente sanguínea são distintas para diferentes compostos. Por exemplo, quando os ratos são alimentados com o composto VOSO_4 , a taxa de depuração do vanádio é mais rápida do que quando expostos ao $\text{VO}(\text{5-ipa})_2$ ou a qualquer outro complexo de vanadil halogenado, com uma taxa de depuração de 5 min para ratos tratados com VOSO_4 e 7-30 min para os ratos tratados com outros compostos de vanádio. A diferença nas taxas de eliminação do vanádio circulante em ratos indica uma variação importante na associação entre compostos de vanádio e os componentes do sangue, como proteínas plasmáticas ou eritrócitos (TAKINO *et al.*, 2001).

O ligante transportador influencia amplamente a eficácia de um composto de vanádio por determinar seu transporte, estabilidade e biodisponibilidade para diferentes tecidos. Particularmente, a biodisponibilidade dos compostos de vanádio é

de extrema importância, uma vez que está ligada à sua eficácia terapêutica (THOMPSON *et al.*, 2009). Compostos de vanádio alcançam a compartimentalização celular após ocorrer o processo de reconhecimento do ligante transportador específico (por exemplo, transferrina, albumina, imunoglobulina G) por um receptor específico da superfície celular e endocitose subsequente (Figura 7).

Figura 7. Captação de espécies de vanádio e compartimentalização celular



Lac, lactato; Cit, citrato; IgG, imunoglobulina; MCT1 (*MonoCarboxylate Transporter-1*), transportador de monocarboxilato-1; OAT (*Organic Anion Transporter*), transportador de íon orgânico; DMT1 (*Divalent Metal Transporter 1*), transportador de metal divalente 1; CTP (*Citrate Transport Protein*), proteína de transporte de citrato mitocondrial; DTC (*Dicarboxylate Tricarboxylate Carrier*), transportador de tricarboxilato de dicarboxilato; ABC (*ATP-Binding Cassette*), transportadores de cassete de ligação de ATP; STEAP (*Six-Transmembrane Epithelial Antigen of the Prostate metaloreductase*), antígeno epitelial seis-transmembranar da próstata metaloreductase; GHS, forma reduzida da glutatona; GSSG, forma oxidada da glutatona.

Fonte: Adaptado de (TREVIÑO *et al.*, 2019; TREVIÑO; DIAZ, 2020).

Bombas de próton acidificam o ambiente intra-vesicular e eventos celulares específicos produziram mudanças conformacionais que promovem a liberação de vanádio e a mobilização citoplasmática, que provavelmente envolve o transportador de metal divalente 1 (*Divalent Metal Transporter-1* - DMT1) (GHIO *et al.*, 2005). Uma vez no citoplasma e dependendo das condições de pH e concentração de vanádio, podem ser formados oligovanadatos. Além disso, as espécies de vanádio entram na célula por difusão utilizando os canais de fosfato ou sulfato, transportador de citrato, transportador de lactato (transportador de monocarboxilato, MCT1), e o transportador

de ânions orgânicos. Depois da absorção celular, os compostos de vanádio podem ser novamente sujeitos a especiação química e modificações redox, o que afetará sua biodisponibilidade subsequente, local de interação e efeitos terapêuticos ou de toxicidade. Esses efeitos vão depender de vários fatores, como a quantidade de absorção, o tipo do tecido corporal e a natureza do ligante transportador (se estiver ainda presente ou não). Em qualquer caso, a final repartição intracelular do complexo muito provavelmente ocorre para permitir a exibição dos efeitos fisiológicos do vanádio (COSTA-PESSOA *et al.*, 2015).

2.1.5 Interconversão entre espécies de vanádio e Equilíbrio Redox Celular

A complexidade dos sistemas biológicos, acoplada à rica química do vanádio em soluções aquosas, torna os estudos dos compostos de vanádio em sistemas vivos muito desafiante. Dentro dos organismos, as células são divididas por membranas em diferentes organelas e vesículas, cada compartimento tendo pH diferente dependendo dos estados fisiológicos, fisiopatológicos ou patológicos, e diferentes ligantes naturais, portanto, diferentes habilidades para acumular vanádio. Combinando os efeitos da arquitetura celular com o pH e concentração dependente dos equilíbrios que governam a química do vanádio, provavelmente podem resultar na formação de diferentes espécies oligoméricas com estados de oxidação variados, cada um encontrado em diferentes partes da célula após administração de um único composto de vanádio. Além disso, compostos de vanádio e vanádio dentro das células podem interagir com diferentes proteínas atuando como inibidor ou ativador (análogo) e influenciando diferentes vias de sinalização. Vários estudos têm demonstrado que o vanádio pode sofrer reações de especiação em células vivas (TREVIÑO *et al.*, 2019).

O EPR e a espectroscopia de ressonância magnética nuclear (NMR: ^{51}V NMR) forneceram evidências da presença de formação de tetrâmero de vanadato e espécies de vanadil após as células terem sido expostas ao vanadato monomérico (DEGANI *et al.*, 1981). ^{51}V NMR também evidenciou a formação de decavanadato ($\text{V}_{10}\text{O}_{28}^{6-}$) em células em um pH de 6,5 na concentração de vanadato de 5 mM, mostrando que o vanádio pode ser concentrado dentro das organelas celulares ácidas (WILLSKY; GOLDFINE; KOSTYNIK, 1998). Foi demonstrado que a distribuição de vanádio dentro da célula depende do composto de vanádio que é administrado, estudo mostraram conclusivamente que estes compostos podem induzir alterações nas

atividades biológicas de várias enzimas, destacando sua importância na medicina (HAN; DING, 2013; AURELIANO; OHLIN, 2014; MARQUES *et al.*, 2017; SÁNCHEZ-LARA *et al.*, 2018).

Muitos dos efeitos fisiológicos benéficos ou prejudiciais do vanadato são, pelo menos em parte, devido às semelhanças das propriedades estruturais e químicas entre ortovanadato e fosfato, $H_xPO_4^{(3-x)-}$. No entanto, uma grande diferença entre vanádio e fósforo é a facilidade com que o vanádio forma anéis de metavanadato oligoméricos, como $[V_4O_{12}]^{4-}$, e *clusters* de polioxovanadato como $[V_{10}O_{28}]^{6-}$ (espécie decamérica, que se arranja num acervo - o chamado *cluster* - de dez átomos de vanádio com coordenação octaédrica distorcida). Outra diferença significativa é a capacidade de V^{+5} ser reduzido a V^{+4} na forma de vanadil *in vivo* por espécies contendo tiol, tais como cisteína e glutatona. De fato, várias formas de vanádio que exercem diferentes funções biológicas sofrem biotransformações (CRANS; BUNCH; THEISEN, 1989; CRANS *et al.*, 2004; AURELIANO *et al.*, 2008; CRANS *et al.*, 2011). Sem dúvida, o grau em que V^{5+} pentavalente é reduzido a V^{4+} tetravalente é um fator importante que influencia quanto de metal/composto é transportado para dentro/fora das células, a magnitude das reações envolvendo o ânion superóxido ($\cdot O^{2-}$) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2), e os principais processos celulares que são potencialmente impactados por essas mudanças (COHEN *et al.*, 2007).

Interconversão entre espécies de vanádio (principalmente V^{+4}/V^{+5} e em menor grau em V^{+3}) ocorre constantemente dentro das células. Estudos anteriores sugerem fortemente que o complexo ligante-vanádio não é estável no corpo. Assim, o vanádio administrado busca a especiação química necessária para uma distribuição equilibrada. Este comportamento prova que a complexação e especiação do vanádio é um processo dinâmico em um ambiente hidraulicamente instável (Figura 8).

NADP⁺/NADPH, FAD⁺/FADH, ou ascorbato, podem interconverter V⁵⁺ e V⁴⁺, bem como espécies V³⁺ (REHDER, 2013; BASU *et al.*, 2017).

O oxigênio reativo e a degradação hidrolítica do VO²⁺ pode ser responsável pela reoxidação a vanadato. O potencial redox para o par H₂VO₄⁻/VO⁺² em pH 7 é -0,34 V, que é comparável a -0,32 V para o NAD⁺/NADH. Vanadil também demonstrou estimular a oxidação do NADH por uma rápida fase que envolve a produção de vanadato seguida da produção de H₂O₂ e (O²⁻) (WILLSKY; GOLDFINE; KOSTYNIK, 1998; SANNA *et al.*, 2016).

O mecanismo químico da reação de oxidação do NADPH é consequência da estimulação do vanadato que gera um sistema em cadeia de radicais livres, no qual é gerado aumento de O₂⁻ (ISLAM *et al.*, 2007). O decavanadato tem mostrado uma atividade estimuladora mais potente da oxidação do NADH dependente de vanadato do que o ortovanadato (RAMASARMA; RAO, 2006). A atividade redutase do decavanadate está ligada à atividade alternativa de uma isocitrato desidrogenase específica de NADP (RAO; RAMASARMA, 2000). O papel desta interessante reação de oxidação do NADPH estimulada por vanadato e dependentes da membrana plasmática no metabolismo celular precisa ser elucidado, embora múltiplas interações com componentes do metabolismo celular sejam possíveis, incluindo interações com xantina oxidase e peroxidação lipídica (ABDELHAMID *et al.*, 2010).

Também foi mostrado que o decavanadato aumenta a redução do citocromo c (RAMASARMA; RAO, 2006) e a liberação do citocromo c da mitocôndria está associada ao início da apoptose (TRACEY; WILLSKY; TAKEUCHI, 2007). Contudo, esses autores também mostraram uma dependência da concentração, especificação celular, bem como do nível de defesa antioxidante ou mesmo de outros sistemas de proteção celular.

A química aquosa do vanádio permite que o vanádio participe de reações redox celulares envolvendo espécies reativas de oxigênio (ERO) e de nitrogênio (ERN). Em diferentes sistemas, o vanádio estimula a formação de óxido nítrico ou inibe a estimulação de óxido nítrico por efetores celulares. O efeito final do aumento de ERO e ERN nas membranas celulares que são muito sensíveis à oxidação é a lipoperoxidação (TRACEY; WILLSKY; TAKEUCHI, 2007). Reações de peroxidação lipídica correlacionam-se com uma diminuição no potencial redox V⁴⁺/V⁵⁺ e ocorre sem formação de radicais. Os compostos de vanádio podem formar um complexo vanádio-superóxido que atua como uma espécie oxidante ativa ou se decompõe para formar

radicais hidroxila, que são iniciadores conhecidos da peroxidação lipídica. A exposição aguda e crônica a compostos de vanádio causam oxidação dos ácidos graxos dos lipídios tanto em eritrócitos humanos como animais (ŚCIBIOR *et al.*, 2018). Nos leucócitos, o vanádio se correlaciona com a formação das ERO e depende da atividade dos canais de cálcio (HUANG, C. *et al.*, 2001). Neutrófilos ativados com espécies de vanádio (V^{4+}) mostraram aumento da capacidade de formação de radicais hidroxila e atenuação da atividade da mieloperoxidase, enquanto as espécies com estado de oxidação +5 não mostraram esses efeitos (FICKL *et al.*, 2006). Há evidências que suportam uma ligação entre o vanádio e a via de sinalização do óxido nítrico. Formação de radicais após a adição de sulfato de vanadil em pulmões perfundidos isolados induziu constrição das artérias pulmonares acompanhadas por aumento da quantidade de óxido nítrico via proteína quinase C (LI *et al.*, 2004).

2.1.6 Interação entre o vanádio e proteínas intracelulares

Vanádio exibe alta afinidade para proteínas contendo ferro e, portanto, uma interação direta com a proteína intracelular ferritina, que tem alta capacidade de armazenamento de ferro, tem sido sugerido. Usando espectroscopia do tipo EPR, as espécies V^{+5} e V^{4+} foram detectadas em ratos alimentados sob dietas ricas em vanádio, particularmente nas proteínas de ferritina no fígado, rim e baço (TRIPATHI; MANI; PAL, 2018).

ATPases são enzimas que catalisam a hidrólise de ligações fosfato-anidrido com muitas funções biológicas, nomeadamente no metabolismo da energia celular. Uma ampla gama de afinidades para o vanadato são observadas dependendo do tipo de ATPases (AURELIANO *et al.*, 2008; RAMOS; MOURA; AURELIANO, 2012; MARQUES *et al.*, 2017; TRIPATHI; MANI; PAL, 2018). O efeito inibitório do vanadato em algumas ATPases pode variar daqueles correspondentes para constantes de inibição para as Na^+-K^+ -ATPases, que é fortemente inibida pelo vanadato com uma constante de associação de $2,4 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ (CANTLEY *et al.*, 1977). O efeito inibitório do vanádio também foi observado em bombas de íons, como a H^+/K^+ -ATPase ou Ca^{2+} -ATPase. Curiosamente, decavanadato $[V_{10}O_{28}]^{6-}$ é um inibidor mais potente da Ca^{2+} -ATPase do que o vanadato monomérico. Aparentemente a oxidação de um resíduo de cisteína através da redução do vanadato é o mecanismo de inibição do decavanadato para a Ca^{2+} -ATPase (FRAQUEZA *et al.*, 2012).

A maior parte dos estudos até agora com vanádio e metaloproteínas foram direcionados para a explorar a semelhança entre os grupos fosfato e vanadato. A inibição e estimulação das enzimas metabolizadoras de fosfato são comumente, e de forma convincente, rastreadas até o que é denominado “o antagonismo vanadato-fosfato”, devido ao comportamento fisiológico similar dos dois ânions. Em termos gerais, os grupos vanadato e fosfato são de fato muito semelhantes entre si: com uma morfologia tetraédrica e distribuição de carga da camada externa quase esférica. A carga iônica líquida das principais espécies presentes em pH 7 é, no entanto, diferente, -2 no caso de fosfato e -1 no caso do vanadato, e isso pode resultar em interações distintas com os grupos eletrofílicos (receptores de elétrons). Existem outras diferenças importantes, que são, pelo menos em parte, responsáveis pelo efeito inibitório do vanadato das enzimas metabolizadoras de fosfato. A principal diferença está na suscetibilidade do vanadato à redução (um elétron) como consequência da presença de orbitais *d* de baixa energia no estado fundamental e números de coordenação maiores que 4, geralmente 5 e 6 (TREVIÑO *et al.*, 2019).

Isso tem como consequência gerar cinco ou seis ânions de coordenação, a fixação do vanadato por coordenação para grupos funcionais fornecidos pelas cadeias laterais dos aminoácidos das proteínas (TURNER *et al.*, 2012). Estruturalmente, o vanadato pode ser um concorrente pelos sítios comumente ocupados pelo fosfato (GOTTESMAN; MUSTAEV, 2018).

No entanto, devido aos diferentes pKa, em pH e forças iônicas fisiológicas, o vanadato está presente principalmente como H_2VO_4^- ou HVO_4^{2-} , dependendo do pH (6,8-7,4), enquanto HPO_4^{2-} e H_2PO_4^- são as formas favorecidas do fosfato, que existem em quantidades aproximadamente iguais na mesma faixa de pH. Quinases e fosfatases são enzimas que realizam a adição ou remoção de um grupo fosfato, respectivamente. Essas enzimas modulam as vias de sinalização intracelular desencadeando uma cascata de diferentes efeitos fisiológicos. Em sistemas biológicos, o nível de fosforilação nas proteínas funciona como um equilíbrio resultante da ação de quinases e fosfatases. Assim, ambos os tipos de enzimas têm papéis importantes na regulação dos processos celulares (TREVIÑO *et al.*, 2019).

As fosfatases catalisam a hidrólise de ésteres de fosfato e podem ser classificadas em dois grupos: proteínas fosfoserina/treonina (*Protein Serine/threonine Phosphatase* - PSPases) e proteínas fosfotirosina (*Protein Tyrosine Phosphatase* - PTPases), dependendo da identidade do resíduo de aminoácido no sítio catalítico.

Essas enzimas são inibidas pelo vanadato, que muitas vezes é considerado como um análogo de estado de transição (*Transition State Analog* - TSA) das reações catalisadas pelas fosfatase (PAL *et al.*, 2018).

Vanadato não é um inibidor específico de todas as fosfatases, mas pode ser um potente inibidor da atividade, porque pode mimetizar o estado de transição pentacoordenado do fosfato formado durante o ciclo catalítico fosfatase. Vanadato também pode causar oxidação da cisteína no sítio ativo, afetando assim a função de várias PTPases que requerem agentes redutores de tiol para uma atividade ideal (IRVING; STOKER, 2017). Particularmente, a proteína tirosina fosfatase 1B (*Protein Tyrosine Phosphatase 1B* - PTP1B), uma enzima chave na via de sinalização da insulina, possui dois TSA relevantes, um sítio de tirosina onde o vanadato se liga ao sítio ativo de forma semelhante que os substratos de tirosina fosforilados (DAVIES; HOL, 2004) e de cisteína (BRANDÃO *et al.*, 2009). A inibição da PTP1B pelo vanadato foi demonstrado em estudos *in vitro* e *in vivo* utilizando principalmente sulfato de vanadil ou bis(maltolato) oxovanádio(^{IV}) (BMOV). Independentemente da natureza da espécie de vanádio administrado, o mesmo composto com vanadato incorporado foi obtido, o que demonstra adequadamente que a espécie ativa é o íon vanadato, formado pela eliminação dos ligantes e a oxidação de V⁴⁺ a V⁵⁺. O local de coordenação preferida do vanádio depende do pH. Assim, a preferência local de ligação com fosfatase em um ambiente ácido é através do resíduo de histidina, enquanto em condições alcalinas, a coordenação ocorre através do resíduo de cisteína (SÁNCHEZ-LOMBARDO *et al.*, 2015).

A inibição ou ativação de algumas fosfatases ocorre pela formação de compostos análogos aos ésteres de fosfato como no caso dos ésteres de vanadato. Os ésteres de vanadato são facilmente formados em soluções aquosas. No entanto, não são espécies particularmente estáveis nestas condições, uma vez que além de não serem facilmente hidrolisados, também apresentam constantes de formação na ordem de 10⁻¹-1 M⁻¹. A posição desses equilíbrios depende das concentrações do vanadato, força iônica e pH (TREVIÑO; DIAZ, 2020).

Outro importante grupo de enzimas onde os efeitos do vanádio têm sido extensivamente investigados são as quinases, que são responsáveis pela transferência de um grupo fosfato. Estudos relataram a formação de complexo de vanadato e quinases envolvidas na regulação do ciclo celular impactando o crescimento celular, sobrevivência e metabolismo (ZHANG *et al.*, 2003; FU *et al.*,

2008; LIU *et al.*, 2012). Outros estudos mostraram que compostos de vanádio estimulam quinases nas vias de transdução de sinal utilizadas pela insulina adicionalmente as do receptor de insulina e do substrato 1 do receptor de insulina (*Insulin Receptor Substrate 1* - IRS-1), e secundariamente, as vias fosfatidilinositol 3-quinase (*Phosphoinositide 3 Kinase* - PI3K), Akt ou proteína quinase B (*v-akt murine thymoma viral oncogene homolog* – Akt ou *Protein Kinase B* – PKB), proteínas quinases ativadas por mitógenos (*Mitogen Activated Protein Kinases* - MAPK (principalmente, vias *Extracellular signal-Regulated Kinases* - ERK) juntamente com a ativação das quinases S6, desempenhando um papel antidiabético e antilipolítico, com concomitantes efeitos semelhantes à insulina (MUKHERJEE *et al.*, 2017; NIU; YANG; YANG, 2017; ZHANG *et al.*, 2017).

O vanadato também estimula a fosforilação de IRS-1, a atividade de PI3K, a via de sinalização ERK e as quinases p70s6k e p90rsk independentemente da fosforilação dos resíduos de tirosina do receptor da insulina, que por sua vez fosforilam e regulam a atividade de vários fatores de transcrição relacionados com proliferação celular e síntese de glicogênio. Além disso, a ativação das vias de sinalização de vírus do sarcoma de rato-proteínas quinases ativadas por mitógenos (*rat sarcoma virus-Mitogen Activated Protein Kinases*: ras-MAPK) pelo composto VOSO_4 parece depender da atividade de PI3K (PANDEY, S. K.; CHIASSON; SRIVASTAVA, 1995). O vanadato também pode causar alguns dos efeitos semelhantes à insulina através da ativação de uma quinase citosólica (*Adipocytic-Cytosolic non-receptor Protein Tyrosine Kinase* - CytPTK) que estimula a lipogênese e a oxidação da glicose (através da glicólise e da via das pentoses fosfato) (ZHANG *et al.*, 2017).

A oxidação de V^{4+} para V^{5+} promove a geração do composto pervanadato (os complexos de vanadato com peróxido de hidrogênio) como um intermediário que desencadeia a captação de glicose pelo aumento da autofosforilação do receptor de insulina evitando sua desfosforilação. As espécies pervanadato também atuam como potenciadores da insulina, porque têm a capacidade única de aumentar marcadamente a resposta celular máxima à estimulação do transporte de glicose alcançado em concentração saturação de insulina (CARPÉNÉ *et al.*, 2017).

2.2 Atuação do vanádio na terapia do DM

As terapias à base de metais possuem boas perspectivas para o tratamento medicamentoso do DM. Em 1899 houve o registro do uso do vanádio no DM, quando o vanadato de sódio (NaVO_3) foi administrado por via oral para melhorar a hiperglicemia causada pelo diabetes e apresentou resultados satisfatórios (LYONNET; MARTZ; MARTIN, 1899).

Inclusive, o conhecimento dos efeitos do vanádio ocorreu antes mesmo da descoberta da insulina e de seu uso clínico por Banting e Macleod, em 1921. Mas, quase 100 anos depois do primeiro estudo publicado, o interesse no vanádio ressurgiu quando um outro grupo de pesquisadores demonstraram *in vivo* o efeito redutor de glicemia dos compostos de vanádio administrados oralmente em ratos com diabetes induzida com STZ (HEYLIGER; TAHILIANI; MCNEILL, 1985).

Porém, com o desenvolvimento da pesquisa ao longo dos anos, identificou-se que a absorção de elementos em suas formas inorgânicas é baixa e, então, altas doses se fazem necessárias, podendo ocasionar o desenvolvimento de efeitos colaterais indesejáveis (BAGCHI; MUKHERJEE; RAHA, 2015). Em 1980 foi proposta a primeira modificação do núcleo de vanádio, ainda que não testada biologicamente, mas visando melhorar a distribuição biológica e sua tolerabilidade (EJELONU, 1980), assim, surge a perspectiva de utilização dos complexos de vanádio com ligantes orgânicos visando obter maior eficiência, segurança e menores efeitos colaterais no tratamento de DM (SRIVASTAVA; MEHDI, 2004).

2.2.1 Determinantes fisiológicos das ação/efeitos antidiabéticos do Vanádio no DM1

Notavelmente, elementos importantes no mecanismo do vanádio associados com a regulação da glicose são a recuperação da síntese de glicogênio, aumento da absorção e utilização da glicose. Modelos de DM1 tratados com vanádio têm mostrado aumento de glicogênio muscular e cardíaco. Fato que sugere melhora na via de sinalização da insulina associada ao restabelecimento da expressão de GLUT-4. Contudo, a dose terapêutica deve ser controlada com precisão (MOHAMMAD; SHARMA; MCNEILL, 2002; HIROMURA *et al.*, 2007).

Estudos em ratos diabéticos induzidos por STZ tratados oralmente com compostos de coordenação de vanádio (isto é, clorodipicolinato III-, IV- e V (Vdipic-

Cl)) ou sais inorgânicos de vanádio (ou seja, sulfato de vanadil ou metavanadato de sódio) através da ingestão de água durante 28 dias mostrou melhora significativa da hiperglicemia e intolerância à glicose. Os animais também mostraram aumento da síntese de glicogênio hepático e níveis de mRNA restaurado das enzimas glicolíticas no fígado, como fosfoenolpiruvato carboxiquinase (*PhosphoEnol-Pyruvate CarboxyKinase* - PEPCK), glucoquinase (*Glucokinase*: GK) e L piruvato quinase (*L-Pyruvate Kinase*: L-PK), que são frequentemente alteradas em animais diabéticos. Embora ambos os tipos de sais e compostos de vanádio tenham provocado efeitos antidiabéticos, os melhores resultados foram observados em ratos administrados com Vdipic-Cl (XIE *et al.*, 2014).

2.2.2 Determinantes fisiológicos das ação/efeitos antidiabéticos do Vanádio no DM2

Em modelos de diabetes tipo 2 (por exemplo, camundongos *db/db* - deleção no par de genes que codifica o receptor da leptina, ratos alimentados com sacarose, ratos Zucker *fa/fa* - deleção no par de genes que codifica o receptor da leptina), a administração de sais de vanádio e compostos de vanádio normaliza a atividade da enzima glicogênio sintase, enquanto nos controles não diabéticos, não foram observadas alterações nas atividades enzimáticas (PILLAI; SUBRAMANIAN; KANDASWAMY, 2013). Por outro lado, em camundongos geneticamente modificados (*ob/ob* - deleção no par de genes que codifica a leptina), a atividade do glicogênio hepático e da enzima glicogênio sintase não foi restaurada, apesar da normalização da concentração sérica de glicose, o que sugere fortemente que tratamento com vanádio neste modelo particular favorece a lipogênese de novo devido a um aumento no peso corporal (NIU *et al.*, 2007). Neste contexto, tratamento com BMOV durante 7 semanas em ratos diabéticos induzido por STZ falhou em melhorar a ativação do glicogênio sintase estimulada pela insulina no músculo esquelético na linhagem celular, bem como no tratamento em ratos Zucker *fa/fa* (SEMIZ; MCNEILL, 2002). Tratamento durante 4 e 8 semanas com o composto metformina-descavanadato em ratos diabéticos induzido por aloxana não mostraram melhora significativa na concentração de glicogênio, enquanto o tratamento semelhante em ratos diabéticos induzida por uma dieta hipercalórica mostrou melhora na concentração de glicogênio no fígado, músculo e córtex renal (mas não no coração e na medula renal) (TREVINO *et al.*, 2016).

Experimentos em cultivo celular usando diafragma de camundongo, hepatócitos de rato, diafragma de rato, adipócitos de rato, células de ovário de hamster chinês superexpressando o receptor de insulina (*Chinese Hamster Ovary cells overexpressing Insulin Receptor: CHO-HIR*) e adipócitos 3T3-L1 mostraram que a adição de sais e compostos de vanádio também aumenta a síntese de glicogênio (PANDEY; CHIASSE; SRIVASTAVA, 1995; BOSE *et al.*, 2007; KORBECKI *et al.*, 2012; GALLARDO-VERA *et al.*, 2018; JHANG *et al.*, 2018).

Em humanos, tratamento com sulfato de vanadil (150 mg/dia por 6 semanas) causou um aumento de 1,5 vezes da velocidade de reação fracional da glicogênio sintase, mas não alterou a atividade da glicogênio sintase basal e estimulada por insulina, o que sugere que o vanádio pode ativar as quinases envolvidas na síntese de glicogênio sem a necessidade de estímulo insulínico (GOLDFINE *et al.*, 2000). Em adição a ação estimulatória na captação e utilização da glicose, a supressão da produção hepática de glicose induzida por vanádio também melhora a homeostase da glicose. O tratamento com vanádio diminui a superexpressão de PEPCK e glicose-6-fosfatase (*Glucose-6-Phosphatase: G6Pase*), as principais enzimas gliconeogênicas (METELO *et al.*, 2012; OLIVERI *et al.*, 2012).

Portanto, tanto em animais diabéticos quanto em humanos, a administração de vanádio diminui a produção hepática de glicose (BÂLICI *et al.*, 2015; CONG *et al.*, 2016), embora ainda existam discrepâncias a esse respeito (GOLDFINE *et al.*, 2000; CUSI *et al.*, 2010; AHMADI-ESLAMLOO; MOOSAVI; DEHGHANI, 2017).

Tratamentos com vanádio também foram associados ao aumento da glicólise e da oxidação da glicose como observado em tecido adiposo de rato isolado e linhagem celular hepática HepG2 (KORBECKI *et al.*, 2012; LEVINA *et al.*, 2014; XIE *et al.*, 2014). Esses efeitos são atribuídos à estimulação seletiva da pentose fosfato e produção concomitante de frutose-2,6-bifosfato (*Fructose-2,6-bisphosphate: Fru-2,6-P2*), o principal metabólito regulador desta via. O efeito do vanadato nas concentrações da Fru-2,6-P2 foram tempo de dose dependentes (TREBERG; STACEY; DRIEDZIC, 2012). Da mesma forma, o vanadato não modifica as atividades das enzimas 6-fosfofruto-2-quinase e piruvato quinase e neutraliza a inativação dessas enzimas induzida pelo glucagon. Por último, o vanadato pode aumentar a produção de lactato e CO₂ em hepatócitos de ratos diabéticos induzidos por STZ; portanto, comportando-se como um efector glicolítico nessas células, esse efeito pode

estar relacionado à sua capacidade para normalizar as concentrações plasmáticas de glicose em animais diabéticos (NILSSON *et al.*, 2009).

A lipogênese de novo é uma via natural para o controle das concentrações de glicose, estimulando a biossíntese de triglicerídeos no fígado, que é dependente de uma correta sinalização da insulina no metabolismo lipogênico. No entanto, na RI, obesidade, dislipidemia e DM, a hipertrigliceridemia e a quebra do equilíbrio entre lipogênese e lipólise têm sido observada como um fator comum. A lipólise em tecido adiposo isolado foi normalizada em animais diabéticos tratados com vanadil (ESBAK *et al.*, 2009). Por outro lado, nos modelos DM2 geneticamente modificados, o vanádio demonstrou resultados inconsistentes, provavelmente ligados ao *background* genético. Alguns estudos que avaliaram as propriedades antidiabéticas e efeito antilipolítico dos compostos de vanádio mostraram que as concentrações de ácidos graxos livres (AGL) não se alteraram (RANGEL *et al.*, 2009; YOSHIKAWA *et al.*, 2014). Contudo, foi demonstrado que a administração de decavanadato melhora a regulação lipídica. Um sal conjugado de benzilamina e decavanadato ($(C_7H_{10}N)_6[V_{10}O_{28}] \cdot 2H_2O$ ou B_6V_{10}) normalizou a concentração plasmática de ácidos graxos não esterificados após uma administração crônica em ratos ou camundongos com modelos de diabetes grave (KORBECKI *et al.*, 2012).

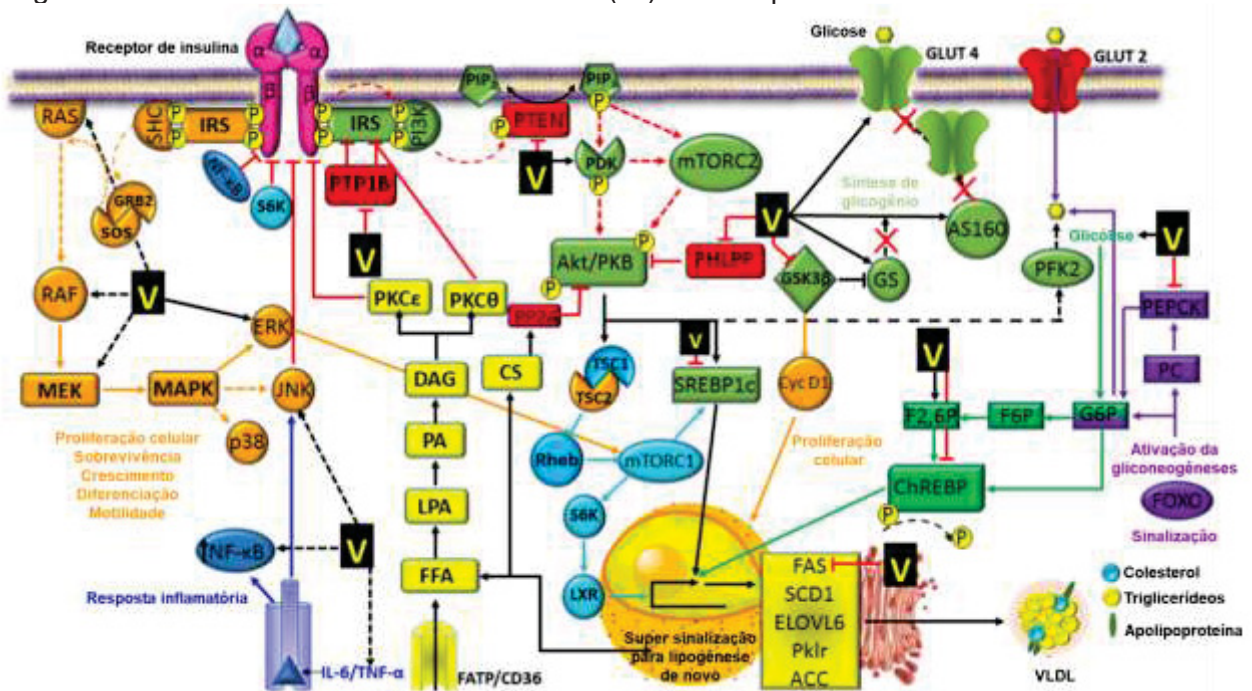
Além disso, as supostas ações antilipolíticas de B_6V_{10} em adipócitos murinos e humanos testados com doses crescentes de 0,1 a 100 $\mu\text{mol/L}$ na quebra dos triglicerídeos (lipólise liberando AGL e glicerol) demonstrou sua eficiente atividade antilipolítica. Atividade hipolipemiante e de regulação metabólica da combinação da metformina com decavanadato ($H_2\text{Metf}_3[V_{10}O_{28}] \cdot 8H_2O$ ou MetfDeca) também foi observada em modelos animais que requerem insulina e que não requerem insulina (TREVIÑO *et al.*, 2016). O comportamento do metabolismo lipídico sugeriu uma melhora nos tecidos, especificamente sobre modo de obtenção de energia porque as taxas de síntese hepática de triglicerídeos a partir da esterificação de ácidos graxos são dependentes do fluxo de substrato e independente das concentrações plasmáticas de insulina. Assim, quando os AGL séricos diminuem o fígado perde o fluxo de matéria prima para construir triglicerídeos, sugerindo fortemente que o MetfDeca induziu a queima lipídica, no modelo DM2 (VATNER *et al.*, 2015; ZAFAR *et al.*, 2018). Além disso, metavanadato de sódio e sulfato de vanadil diminuíram as concentrações plasmáticas de colesterol em humanos sem alteração das concentrações plasmáticas ácidos graxos livres ou das frações de triglicerídeos

(GOLDFINE *et al.*, 2000; CUSI *et al.*, 2010; AHMADI-ESLAMLOO; MOOSAVI; DEHGHANI, 2017). O vanadato também demonstrou reduzir as concentrações plasmáticas de colesterol total e livre em indivíduos normais, o que pode ser devido à inibição das etapas envolvidas na biossíntese do colesterol (FRANCIK *et al.*, 2017). Em hepatócitos (ZARQAMI *et al.*, 2018) e adipócitos isolados (GHIO *et al.*, 2005), o metabolismo lipídico foi modulado por metavanadato de sódio, estimulando a lipogênese e suprimindo atividade lipolítica.

2.3 Vanádio e a sinalização da insulina no DM

Uma das cascatas de sinalização mais estudadas ligadas a compostos de vanádio são as via ativadas por insulina associadas à inibição das fosfatases, principalmente PTPases. Em indivíduos saudáveis, o receptor e substratos específicos de resposta à insulina são fosforilados após a ligação à insulina, mas no DM (tipo 1 ou tipo 2), há uma resposta insuficiente ou anômala dos receptores celulares de insulina e, portanto, às cascatas de transdução de sinal. A nível molecular, a maioria dos efeitos observados na presença de vanádio ocorre através da fosforilação do IRS-1 devido à potente propriedade inibitória das PTPases dos sais de vanádio (Figura 9) (BRANDÃO; HENGGE; JOHNSON, 2010; SKALNY *et al.*, 2017). Um dos principais alvos intracelulares do vanádio é a PTP1B, que regula o processo de fosforilação entre o receptor de insulina e seu substrato IRS. Inibição da atividade de PTP1B permite que o receptor de insulina permaneça ativado, ou seja, retenha a fosforilação da tirosina da subunidade β do receptor (PETERSEN; SHULMAN, 2018). Por isso, tem sido sugerido que ao prevenir a desfosforilação da subunidade β do receptor de insulina o vanádio pode melhorar a atividade da proteína tirosina quinase (*Protein Tyrosine Kinase*: PTK) do receptor de insulina.

Figura 9. Mecanismo de resistência à insulina (RI) e locais potenciais da atividade do vanádio



Modelo esquemático das vias de sinalização da insulina. A fosforilação do receptor de insulina produz uma cascata de sinalização a jusante que gera a síntese de glicogênio com inibição da glicogenólise e da gliconeogênese, que melhora a glicólise e regula a lipogênese e a lipólise. Da mesma forma, a sinalização da insulina inibe a apoptose e coordena o ciclo celular, proliferação, sobrevivência, crescimento, diferenciação e motilidade. A ação da insulina envolve uma série de cascatas de sinalização iniciadas por ligação da insulina ao seu receptor, induzindo a autofosforilação do receptor e ativação da tirosina quinase do receptor, resultando na fosforilação do substrato do receptor de insulina. A fosforilação de IRS leva à ativação da fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K) (lado direito) e à ativação da via de sinalização MAPK (Ras-Raf-MEK/MAPK) (lado esquerdo). **Lado direito:** A via PI3K é responsável pela maioria dos efeitos metabólicos da insulina e está conectada exclusivamente pelo IRS. Por outro lado, a via MAPK emanada tanto da IRS e como da proteína homóloga ao colágeno com domínio SH2 (SHC) e está envolvida na regulação da expressão gênica e, em cooperação com a via PI3K, no controle do crescimento ("mitogênese") e diferenciação celular. A ativação da via PI3K leva à ativação das isoformas de Akt/PKB pela proteína quinase dependente de fosfoinosítídeo (PDK) que é ativada ao se ligar ao fosfatidilinositol trifosfato (*Phosphatidylinositol 3,4,5-Trisphosphate* - PIP₃). Os substratos críticos a jusante de Akt são o alvo da rapamicina em mamíferos (*mammalian Target Of Rapamycin* - mTOR), que participa da regulação da síntese de proteínas. A síntese de glicogênio é regulada pela enzima glicogênio sintase quinase 3 (*Glycogen Synthase Kinase 3* - GSK3), que é inibida pela fosforilação de Akt/PKB, que por sua vez ativa a glicogênio sintase. A proteína contendo a caixa *forkhead*, subfamília O (*Forkhead box transcription factor class O* - FoxO) de fatores de transcrição, particularmente FoxO1 está envolvida na regulação de genes gliconeogênicos e adipogênicos. FoxO1 é um fator de transcrição que se transloca para o núcleo na ausência de um sinal de insulina e estimula a expressão de genes, como o fosfoenolpiruvato carboxiquinase (*Phosphoenolpyruvate Carboxykinase* - PEPCK), que é uma enzima chave da gliconeogênese, e ciclina G2, uma ciclina atípica que bloqueia o ciclo celular e é inibida por insulina, e parece desempenhar um papel crucial na mitogênese induzida por insulina. O substrato Akt de 160 kDa (*Akt Substrate of 160 kDa* - AS160), envolvido no transporte de glicose, promove a translocação do transportador de glicose 4 (GLUT4) das vesículas intracelulares para a membrana plasmática no músculo e tecido adiposo. Finalmente, Akt também ativa proteínas de ligação a elementos reguladores de esteróis (*Sterol Regulatory Element-Binding Proteins* - SREBPs). Estes são fatores de transcrição que se ligam ao elemento regulador de esterol na sequência de DNA; em particular, a regulação da transcrição mediada pela insulina onde SREBP-1c atua em cooperação com o receptor hepático X para induzir a lipogênese. **Lado esquerdo:** após a fosforilação de IRS é formado o complexo Shc/Grb2/SOS. Ras interage com SOS e a converte para sua conformação ativa trocando GDP por GTP. Ras ativa pode então recrutar Raf para a membrana celular e iniciar a fosforilação sequencial da cascata de sinalização Raf/MEK/ERK. ERK ativado fosforila SOS, desmonta o complexo Grb2-SOS, e desativa Ras. Essa inibição por retroalimentação pode explicar as diferentes

respostas da via MAPK. Em resposta a diferentes fatores de crescimento, a cascata MAPK de proteínas de sinalização controla diversas funções celulares, como crescimento, diferenciação, apoptose e proliferação. O tipo de resposta biológica exercida pela via MAPK depende do tipo de célula, amplitude e duração do estímulo externo. ERK 1-2 fosforilada transloca para o núcleo se o sinal for de duração suficiente, onde fosforila uma variedade de fatores de transcrição e proteínas quinases ativadas por mitógeno e por estresse. A terminação do sinal é mediada pela internalização da insulina ligada ao seu receptor; no entanto, a transdução de sinal do receptor continua até ser interrompida pelas fosfatases, e pode ser essencial para a ativação Shc da cascata Ras-ERK. Contudo, a ERK superexpressa prejudica a sinalização da insulina e induz a RI. Em altas concentrações de insulina e fator crescimento de insulina, AKT ativa fosforila RAF no resíduo de serina 259 e, portanto, suprime a atividade da via de sinalização RAF-MEK-ERK. Portanto, essas vias têm sido um alvo frequente para o tratamento de diabetes e câncer. O receptor de insulina é desfosforilado e inativado por proteína tirosina fosfatases (PTPs), como a proteína tirosina fosfatase 1B (*Protein Tyrosine Phosphatase 1B* - PTP1B), que é a fosfatase mais importante que exerce efeitos negativos na ação da insulina e no metabolismo da glicose. O nível de atividade do receptor de insulina não é determinado apenas pela presença de insulina, mas também pelo estado de fosforilação do receptor. A fosfatase, PTP-1B uma regulação negativa significativa na atividade do receptor de insulina. Alguns estudos mostram que camundongos nocauteados para PTP-1B não desenvolvem obesidade ou RI se alimentados com uma dieta rica em gordura. Além disso, a fosfatase homóloga à tensina (*Phosphatase and Tensin homolog* - PTEN), uma fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato 3-fosfatase, serve como uma importante moduladora negativo para a via de sinalização da insulina pela hidrólise do PIP₃ a PIP₂, antagonizando a via PI3K.

O vanádio está ligado à via de sinalização da insulina, em três vertentes específicas, no qual a primeira é atuação na PTP1B, que regula a fosforilação do receptor de insulina e IRS, a inibição da desfosforilação do receptor e de IRS, permite que a transdução de sinal continue; na segunda o vanádio atua principalmente na PTEN, ativando PI3K, uma fosfatase lipídica, que quando inibida impede a desfosforilação de PIP₃; por fim, a terceira está associado à ativação das MAPK regulada por ERK1 e ERK2, que regula a proliferação, sobrevivência, crescimento, diferenciação e motilidade celular, bem como a síntese de proteínas e lipídios (TREVIÑO; DIAZ, 2020).

As setas vermelhas tracejadas indicam mudanças na sequência das fosforilações na cascata da sinalização da insulina. As linhas sólidas vermelhas implicam inibição da sinalização ou ações. Cruzes vermelhas indicam perda de ação. As caixas roxas representam a ativação da gliconeogênese. Caixas amarelas representam a absorção de ácidos graxos livres. As caixas azuis indicam estimulação excessiva de SREBP1c. As caixas laranja representam o caminho MAPK. As caixas vermelhas são fosfatases críticas. As caixas azuis mostram os caminhos da inflamação. Caixas pretas com V amarelo são pontos críticos ou locais potenciais da atividade do vanádio.

Abreviações: Ras, *Rat Sarcoma vírus oncogenes*; Raf, *Rapidly Accelerated Fibrosarcoma*; MEK, quinase ativada por mitógenos (*MAP or ERK Kinase*), MAPK, proteína quinase ativada por mitógeno (*Mitogen Activated Protein Kinases*); Grb2, proteína 2 ligada ao receptor de fator de crescimento (*Growth factor Receptor Bound protein 2*); SOS, *Son Of Sevenless homolog 1*.

Fonte: Adaptado de TREVIÑO *et al.*, 2019; TREVIÑO; DIAZ, 2020.

Também foi proposto que o tratamento com vanádio modula as vias MAPK (Figura 9). Pandey e colaboradores (2019) demonstraram que o tratamento com sulfato de vanadil resultou em um aumento do nível de fosforilação da tirosina de ERK 1/2, estimulação da quinase ativada por mitógenos (*MAP ou ERK Kinase*: MEK) e atividades de proteínas quinases específicas de serina/treonina que estão relacionadas a oncogenes retrovirais (*Cellular Rapidly Accelerated Fibrosarcoma 1*: C-raf-1), e ativação da proteína de 21 kD codificada por *oncogens ras* (*21-kD proteína codificada de sarcoma vírus oncogenes de ratos*: p21ras) e proteína ribossomal 6 quinase (S6K). Além disso, wortmanina e LY294002, dois inibidores estrutural a PI3K e mecanicamente diferentes, podem bloquear o aumento mediado pelo sulfato de

vanadil na atividade da MAPK e fosforilação da quinase 1/2 regulada por sinal extracelular (*Extracellular signal-Regulated Kinase 1/2*: ERK1/2) e S6K.

Esses resultados sugerem que a estimulação das vias ras-MAPK e S6K mediadas pelo sulfato de vanadil são dependentes de PI3K (KONDOH; NISHIDA, 2007). Adipócitos isolados de rato tratados com 1 mM de vanadato de sódio exibiram uma estimulação rápida da atividade da MAPK, através de uma via dependente de PI3K e MEK. No entanto, se as células foram previamente tratadas por 5 minutos com 1 M de ácido ocadaico, um inibidor eficaz de MEK e MAPK através da inativação da proteína fosfatase 2A (*proteína fosfatase 2A*: PP2A), uma estimulação baixa da MAPK foi observada após o tratamento com vanadato. Adição simultânea de insulina e vanadato não resulta em efeito aditivo, nem em MAPK nem em MEK, sugerindo fortemente que a insulina e vanadato usam a mesma via de sinalização de PI3K para MEK e MAPK (ZHANG, Z. F. *et al.*, 2017).

Há apenas um estudo que relata possível inibição das fosfatases de tirosina específicas de MAPK por compostos de vanádio. Um complexo de glutamato de oxovanádio, $\text{Na}_2[\text{V}(\text{IV})\text{O}(\text{GLU})_2(\text{CH}_3\text{OH})]\cdot\text{H}_2\text{O}$, mostrou inibição potente contra quatro PTPs humanas (PTP1B, TCPTP, HePTP e SHP 1) com concentração inibitória de 50% das células (IC_{50}) nas faixas de 0,21–0,37 μM . No entanto, apenas PTP1B apresentou uma típica inibição competitiva. O mecanismo de inibição de vanádio para as outras fosfatases ainda não está claro (LU *et al.*, 2010). Descobriu-se que a proliferação de certas células (células de condrócitos VSa13) é estimulada por vanadato através da ativação da via MAPK, mesmo na presença de wortmanina ou PD98059. No entanto, em células pré-osteoblastos de peixes, o tratamento com vanadato não estimulou a proliferação celular através da via MAPK, mas o vanadato inibiu diferenciação celular/mineralização da matriz extracelular através do mesmo mecanismo que o fator de crescimento tipo insulina 1 (*Insulin-like Growth Factor 1*: IGF-1) (TIAGO; CANCELA; LAIZÉ, 2011).

Decavanadato exibiu menos eficiência que o vanadato, mas em tratamentos mais longos, efeitos semelhantes foram produzidos para soluções de metavanadato e decavanadato, estimulação da proliferação celular e forte comprometimento (75%) da mineralização da matriz extracelular (TIAGO, DANIEL M. *et al.*, 2008). As vias MAPK em humanos, modelos animais ou células têm sido pouco estudadas; no entanto, como foi exposto, essas vias são fortemente ligadas à RI, síndrome metabólica, doenças cardiovasculares e DM. Devido à sua atividade efetiva como

inibidor de fosfatases, é possível que o tratamento com vanadato estimule a fosforilação de MEK e MAPK (TREVIÑO; DIAZ, 2020).

2.4 Vanádio: inflamação e equilíbrio redox no Diabetes *Mellitus*

Compostos de vanádio podem se interconverter em diferentes espécies em sistemas vivos. Isso ocorrerá principalmente na presença de espécies reativas de oxigênio e equilíbrio redox (SHI; DALAL, 1993). Da mesma forma, a leve geração de ERO está ligada à via de transdução de sinal da insulina (IWAKAMI *et al.*, 2011). Portanto, os complexos de vanádio podem produzir pequenas quantidades de ERO e melhorar a sinalização da insulina. A atividade mimetizadora de insulina foi observada em alguns complexos de peroxovanádio através da geração de ERO. No entanto, se a geração de ERO for muito alta, uma diminuição na sinalização da insulina pode ocorrer e sua atividade mimetizadora de insulina pode ser perdida (SUGIYAMA *et al.*, 2012; MATSUGO *et al.*, 2014). O próprio vanádio pode desencadear estresse oxidativo a nível celular, comumente pela administração excessiva de vanádio (superior a 5,0 mg/kg) (ZHAO *et al.*, 2010; MATSUGO *et al.*, 2014; YUAN *et al.*, 2016).

Oxidovanádio (+4) e (+5) atuam como geradores de ERO, como peróxido, superóxido, radicais hidroxila e oxigênio singlete (EVANGELOU, 2002). Oxidação de NADH dependente de vanadato associada a membranas de plasma gera H_2O_2 (ABDELHAMID *et al.*, 2010). A formação de H_2O_2 induzida por vanadato demonstrou mediar a apoptose através da ativação de p53 (HUANG *et al.*, 2000). Em células defeituosas p53⁻ (células tumorais ou células não tumorais p53-nocaute), compostos de vanádio inibem o ciclo celular e induzem apoptose (ZHANG *et al.*, 2002). A ativação do fator nuclear kapa beta (NF- κ B) por ERO gerados por compostos de vanádio aumenta o efeito apoptótico (PARRONDO *et al.*, 2010). Em contraste, em células funcionais p53, a apoptose não é mostrada (MORITA *et al.*, 2010).

Além disso, quando células ou tecidos sofrem estresse oxidativo, MAPK pode mediar a fosforilação do fator nuclear eritróide 2 relacionado ao fator 2 (*Nuclear factor erythroid 2-related factor 2* - Nrf2) e causar uma interrupção da ação da proteína 1 associada a ECH semelhante a Kelch (*Kelch-like ECH-associated protein 1*: Keap1) (KANSANEN *et al.*, 2013), que aumenta a expressão de enzimas desintoxicantes, como a subunidade catalítica da glutamato-cisteína ligase (*Glutamate-Cysteine Ligase Catalytic subunit*: GCLC), heme oxigenase-1 (*Heme Oxygenase-1* - HO-1) e

NAD(P)H desidrogenase quinona 1 ((*NAD(P)H quinone dehydrogenase 1* - NQO1) (SIMMONS; FAN; RAMABHADRAN, 2009), aliviando o estresse oxidativo. Evidências acumuladas indicam que os compostos de vanádio modulam a extensão e a duração da fosforilação de algumas proteínas, como MEK-1, ERK 1/2, quinase c-Jun N-terminal (*c-Jun N-terminal Kinase* – JNK), fator de necrose tumoral alfa (*Tumor Necrosis Factor-alpha* - $TNF\alpha$) e NF- κ B (WANG *et al.*, 2017; CRANS *et al.*, 2018; SELMAN *et al.*, 2018), proteínas efetoras chave das vias de sinalização ligadas à produção de ROS e danos no DNA.

Ativação das vias de sinalização celular são mediadas através da regulação da fosforilação e desfosforilação de proteínas críticas para a transdução de sinal. Ambos, inativação de fosfatases e ativação de fosfoquinases, levam à geração de segundos mensageiros, a ativação de quinases a jusante. Sais inorgânicos de vanádio podem ativar as fosforilases fosfotirosina da ERK, c-Jun N-terminal quinase/proteína quinase ativada por estresse (*c-Jun N-terminal Kinase/Stress-Activated Protein Kinase* - JNK/SAPK) e p38, principalmente pelo aumento do estresse oxidativo, que é ativado por uma variedade de estímulos e diferentes estresses celulares, como como RI, síndrome metabólica e DM (JASPERS *et al.*, 2000; CRANS *et al.*, 2018). Tanto as ERKs como as vias de sinalização JNK/SARK também foram implicadas na ativação do NF- κ B (MOLDOGAZIEVA *et al.*, 2018).

No DM1 a atividade do NF- κ B leva à disfunção e morte das células β por apoptose. Alguns estudos revelaram que mais de 66 genes são modificados na célula β após a exposição a essas citocinas. A ativação de NF- κ B pode desencadear cascatas pró- ou antiapoptóticas (BEYFUSS; HOOD, 2018), mas em células β , a ação é predominantemente pró-apoptótica (EIZIRIK; MANDRUP-POULSEN, 2001). O NF- κ B se tornou o principal suspeito no desenvolvimento de RI e DM 2 após a descoberta marcante de que um agente anti-inflamatório, aspirina, inibe NF- κ B e previne a degradação do inibidor de NF- κ B (*Inhibitory κ B* - I κ B) (IVOVIC *et al.*, 2017). Embora o NF- κ B não esteja diretamente envolvido, sua participação é muito importante em distúrbios metabólicos, porque o NF- κ B está envolvido no aumento da inflamação crônica hepática, mimetiza dieta rica em gordura ou RI induzida pela obesidade, e aumenta a concentração de citocinas pró-inflamatórias como $TNF-\alpha$, IL-1, e IL-6, que são críticos no desenvolvimento de RI ou sinalização de sobrevivência celular (PATEL; SANTANI, 2009). Desta maneira, compostos de vanádio, como bis(maltolato)-oxovanádio(IV) induzem a translocação nuclear de NF- κ B e apoptose

em linhagens de células de linfócitos B, mas aumentam a ativação e sobrevivência das células T (GAO *et al.*, 2011). Enquanto isso, vanadato(^V), vanadil(^{VI}), bis(maltolato)oxovanádio(^{IV}) e bis(maltolato)dioxovanádio(^V), todos sendo promotores de MAPK e NF-κB, estimularam o crescimento celular em baixas concentrações, mas o inibem em altas concentrações, e induzem mudanças distintas na morfologia, após incubação durante a noite. O bis(maltolato)dioxovanádio(^V) é o menos citotóxico e o indutor mais fraco das alterações morfológicas em baixas concentrações (10 μM), exibindo um padrão de fosforilação semelhante ao da insulina (SÁLICE *et al.*, 1999). Além disso, o bis-peróxovanádio (bpV), um potente inibidor de PTPs, ativa NF-κB em linfócitos T humanos sem morte celular (OUELLET; BARBEAU; TREMBLAY, 1999). Portanto, os resultados sugerem que um equilíbrio entre tirosina quinases e tirosina fosfatases estabelece se uma célula sobreviverá ou sofrerá apoptose. Além disso, a ativação das vias de sinalização celular parece convergir principalmente na translocação nuclear do NF-κB e a transcrição de genes apoptóticos (letal) ou anti-apoptóticos.

Os pesquisadores precisam fornecer evidências substanciais para as propriedades químicas e efeitos bioquímicos de compostos de vanádio em diferentes células ou tecidos em que vanádio tem efeitos seletivos no controle metabólico, sobrevivência, proliferação ou apoptose. Até agora, nenhum composto de vanádio provou ser eficaz para uso a longo prazo em humanos, e apenas o bis(2-etil-3-hidroxi 4-pironato)oxovanadium(^{IV}) (BEOV) atingiu a fase II nos testes clínicos. Consequentemente, a dose terapêutica dos compostos de vanádio ainda não está bem definida (TREVINO *et al.*, 2019).

Há preocupações sobre a toxicidade potencial do vanádio inorgânico disponível em doses mais altas e durante terapia a longo prazo. Em modelos animais, a dose terapêutica em que o vanádio atua como mimético da insulina é alta (0,5-1 mM). É importante ressaltar que os decavanadatos mostram uma importante redução da concentração para uma faixa de μM (TREVINO *et al.*, 2019). Portanto, novos compostos de vanádio com ligantes orgânicos sugerem maior potência e menor toxicidade, se tornando uma vertente a ser pesquisada. Tornando-se ainda mais promissor quando o vanádio é apresentado em compostos de coordenação simples (REHDER, 2020).

Objetivando elaborar novos compostos de vanádio com coordenação e estrutura simples, com ligantes orgânicos, um grupo de pesquisadores chineses

propôs seis novas estruturas. Dentre elas, um oxidovanádio ($[V^{IV}O(mal)(bpy)].H_2O$) (CHEN *et al.*, 2014). Nessa estrutura, o vanádio é apresentado no estado de oxidação (IV), neutralizado por seus próprios agentes ligantes: vanadila, bipyridina e malato. Considerando que a natureza de um ligante determina as características farmacológicas no que se refere a sua toxicidade e farmacocinética, que os complexos com ligantes orgânicos exibem maior eficiência, segurança e menores efeitos colaterais e que o composto descrito não foi testado biologicamente, se torna uma perspectiva de pesquisa interessante.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Este projeto foi realizado seguindo uma sequência de etapas que basicamente contou com a síntese e caracterização do composto, seguido das análises *in vitro* e *in vivo*, em uma pesquisa de caráter experimental, ensaio não clínico. O fluxograma (Figura 7) representa de forma esquemática as etapas de trabalho.

Figura 7. Fluxograma de trabalho



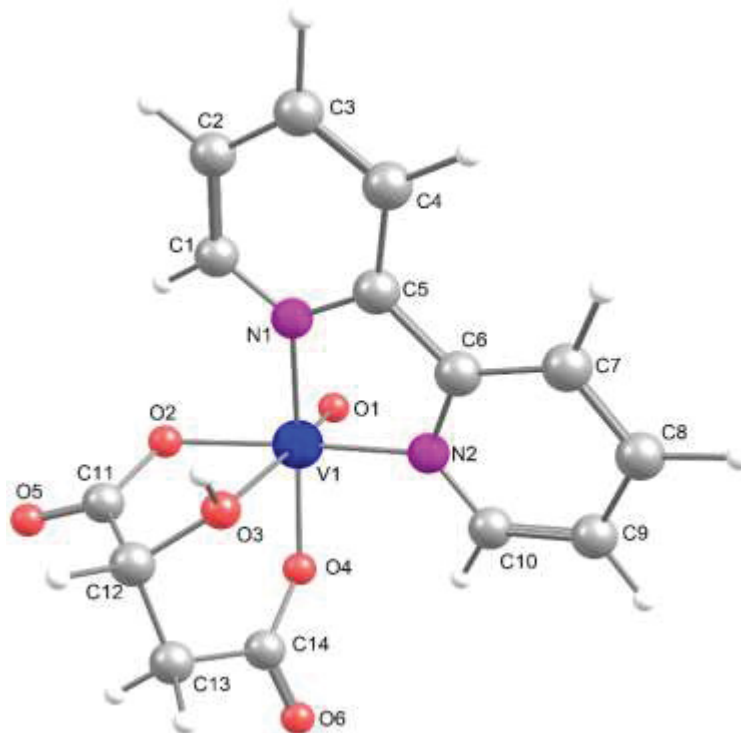
Fonte: Autor (2022).

3.1 Síntese do composto

O composto testado é um oxidovanádio ($[V^{IV}O(mal)(bpy)].H_2O$), denominado de **V**, descrito inicialmente por um grupo de pesquisadores chineses e americanos

(CHEN et al., 2014). A fórmula estrutural é $C_{14}H_{14}N_2O_7V$, com peso molecular 373,21 g/mol, sendo sua estrutura apresentada na Figura 8.

Figura 8. Estrutura do composto **V** ($[V^{IV}O(mal)(bpy)].H_2O$)



Fonte: Autor (2022).

Para o presente projeto, a síntese e as análises de caracterização de **V** foram reproduzidas pelo LabSin, Departamento de Química Inorgânica do Programa de Pós-graduação de Química da Universidade Federal do Paraná (UFPR), apresentando-se no formato de cristais, solúvel em água, solução salina e demais soluções usadas na pesquisa.

Para a definição das concentrações testadas, outros estudos com compostos similares e efeitos promissores foram usados como base, iniciando com as análises *in vitro* (ZHAO et al., 2015; KONGOT et al., 2019).

3.2 Cultivo de células de carcinoma hepatocelular humano (HepG2)

A linhagem celular de hepatocarcinoma humano HepG2 foi utilizada nos ensaios *in vitro* como modelo biológico para avaliar a citotoxicidade e inferir sobre a potencial atividade antidiabética de **V**.

A linhagem HepG2 adquirida do Banco de Células do Rio de Janeiro, Brasil foi mantida em garrafas (T50 ou T75) contendo meio de cultivo DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) de alta glicose suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS), 50 µg/mL do antibiótico gentamicina, em pH ajustado para 7,4 com bicarbonato de sódio, sendo mantidas em estufa umidificada a 37°C em 5% de gás carbônico (CO₂). Todos os experimentos celulares foram realizados em 70 a 80% da confluência celular.

As células HepG2 foram cultivadas para, posteriormente, serem divididas para uso em diferentes grupos de tratamento. Seu cultivo ocorreu em meio de cultivo contendo glicose 5,5 mM para representar a condição de glicemia normal, ou em glicose 55 mM para representar a condição de hiperglicemia que induziu a RI (NAKAJIMA *et al.*, 2014).

3.2.1 Estudo de viabilidade celular

O ensaio de viabilidade celular visa avaliar a citotoxicidade *in vitro* do composto por expor uma cultura de células a determinada substância, avaliando-se parâmetros como a lise celular (MOSMANN, 1983).

As células HepG2 cultivadas foram tripsinizadas e semeadas visando atingir a contagem de 10⁴ células por poço, em placas de 96 poços. Após 24h de adesão, o meio de cultura foi removido e o composto **V** foi adicionado na concentração 600 µM, 300 µM, 100 µM, 10 µM, 7,5 µM, 5 µM e 2,5 µM/mL, sendo diluído em meio de cultura, seguido de nova incubação em estufa umidificada a 37°C em 5% de CO₂. Após 24 e 48 horas, a viabilidade celular foi determinada usando o método metil-tiazolil-tetrazólio (MTT) (MOSMANN, 1983).

Neste ensaio, o sal amarelado de MTT é reduzido, nas mitocôndrias das células vivas a um produto roxo de formazana, que é extraído através da adição de dimetilsulfóxido (DMSO). O mecanismo dessa conversão envolve reações de redução, com moléculas como o NADH, que transferem elétrons para o MTT (PERES *et al.*, 2008).

Para isso, o MTT diluído com PBS a uma concentração final de 0,5 mg/ml foi adicionado a cada poço após os tratamentos. Após 4 horas de incubação a 37°C, o precipitado de formazana foi dissolvido em 100 µL de DMSO e a quantificação foi realizada por espectroscopia eletrônica na região do visível, sendo a absorbância

medida a 570 nm. Houve três repetições para cada tratamento e o experimento foi repetido três vezes. Os valores de IC_{50} , ou seja, concentração de **V** que promove uma inibição do crescimento de 50% para células HepG2 tratadas em 24 e 48 horas, foram calculados.

3.2.2 Determinação da captação da glicose

O 2- [N- (7- nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-il) amino] -2-desoxi-D-glicose (2-NBDG) é um análogo fluorescente da D-glicose anteriormente relatado e utilizado para monitorar a captação da glicose em células vivas, por ser incorporado ao meio intracelular pelos transportadores (YOSHIOKA *et al.*, 1996). O estudo da captação de 2-NBDG pelas células HepG2 previamente cultivadas foi determinado pela adaptação de um protocolo previamente descrito (ZOU; WANG; SHEN, 2005).

Para isso, a cultura foi cultivada até 70-80% de confluência, lavada duas vezes com solução salina tamponada com fosfato (1 X PBS, pH 7,3), ressuspensa em DMEM em condições de normoglicemia (5,5 mmol/L) ou hiperglicêmica (55 mmol/L) e encubado com três diferentes tratamentos: insulina (utilizada como referência) e presença de **V** na concentração de 2,5 e de 7,5 $\mu\text{mol/L}$ (concentrações selecionadas pela avaliação da atividade citotóxica) por 24 h. As condições usadas são representadas na Tabela 2.

Tabela 2. Condições usadas no experimento *in vitro* de captação de glicose

Denominação	Condição de cultivo	Tratamento
Normoglicemia	Normoglicemia (5,5 mmol/L)	-
Hiperglicemia	Hiperglicêmica (55 mmol/L)	-
Insulina (tratamento padrão)	Hiperglicêmica (55 mmol/L)	100 nmol/L de insulina humana recombinante (NPH)
V 2,5 $\mu\text{mol/L}$	Hiperglicêmica (55 mmol/L)	2,5 $\mu\text{mol/L}$ do composto V
V 7,5 $\mu\text{mol/L}$	Hiperglicêmica (55 mmol/L)	7,5 $\mu\text{mol/L}$ do composto V

Fonte: Autor (2022).

Após o tratamento, as células foram lavadas duas vezes e, em seguida, incubadas com 20 μ M de 2-NBDG em meio de cultura sem glicose por 20 minutos. As células cultivadas na ausência de 2-NBDG serviram como controle negativo.

A reação de captação de 2-NBDG foi interrompida removendo o meio de incubação e lavando as células duas vezes com PBS pré-resfriado. As células em cada poço foram subsequentemente ressuspensas em 300 μ L de PBS pré-resfriado e mantidas a 4°C para análise posterior de citometria de fluxo realizada em 30 min. Para cada medição, os dados de 5000 eventos de célula única foram coletados usando um filtro FACS Calibur® com 530/30 (FL1). Houve três repetições para cada tratamento e o experimento foi repetido três vezes.

3.3 Efeito de **V** em modelo animal

Após os resultados obtidos no modelo *in vitro*, prosseguiu-se com o estudo *in vivo* utilizando ratos machos (*Rattus norvegicus*) da linhagem Wistar oriundos do Biotério do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná (UFPR) como modelo animal. Por se tratar de uma pesquisa com animais, todos os critérios da Resolução Normativa número 13 do Conselho Nacional de Experimentação Animal de 20 de setembro de 2013 (BRASIL, 2013) foram respeitados e a presente pesquisa tem a aprovação da Comissão de Ética de Uso de Animais (CEUA-UFPR: 23075.0229752019-39) da Universidade Federal do Paraná (UFPR), sendo apresentada no Anexo A.

3.3.1 Teste de campo aberto (TCA)

A atividade locomotora após a administração de gavagem oral única do composto **V** foi avaliada no TCA conforme descrito anteriormente (MEOTTI *et al.*, 2006; SANTIAGO *et al.*, 2010). Para o TCA, o Biotério do Setor de Ciências Biológicas da UFPR forneceu 20 ratos machos (*Rattus norvegicus*) da linhagem Wistar com peso corporal entre 260 gramas e 305 gramas, estes foram divididos aleatoriamente em três grupos experimentais.

Os animais foram alocados em gaiolas plásticas (41 cm x 32 cm x 16,5 cm) e mantidos com ração e água disponíveis livremente, a sala estava em condições de temperatura controlada (22 ± 2 °C) e o ciclo claro/escuro era de 12 horas. A

identificação individual dos animais foi realizada por meio de marcação na cauda e nas respectivas gaiolas.

Os testes comportamentais foram conduzidos durante a fase clara do ciclo em uma sala com 40 lux de luminosidade e todos os esforços foram feitos para minimizar o sofrimento e o número de animais.

Para a realização do TCA o composto **V** foi solubilizado em tampão fosfato-salino (PBS) estéril de forma a obter uma suspensão na concentração de 10 mg/kg de peso corporal (Grupo **V₁₀**) e 30 mg/kg de peso corporal (Grupo **V₃₀**) em um volume de 1 ml, que foi administrado em cada animal. O pH da suspensão foi corrigido com hidróxido de sódio até ficar em pH=7,0. O grupo denominado de controle recebeu apenas PBS. A caracterização dos grupos é apresentada na Tabela 3.

Tabela 3. Grupos experimentais no TCA

Denominação do grupo	Intervenção
Grupo V₁₀	10 mg/kg de peso corporal de V solubilizado em 1 ml de tampão fosfato-salino (PBS) estéril
Grupo V₃₀	30 mg/kg de peso corporal de A solubilizado em 1 ml de tampão fosfato-salino (PBS) estéril
Controle	1 ml de tampão fosfato-salino (PBS) estéril

Fonte: Autor (2022).

O composto foi administrado pela via oral por meio de agulha de gavagem (sete centímetros de comprimento) no tempo classificado como inicial (denominado de t0). Após 30 minutos (ou t30) e após 60 minutos (ou t60) da administração do composto os animais foram submetidos ao teste, individualmente.

O aparato do TCA consiste em uma caixa retangular (40 cm x 50 cm x 63 cm) dividida em nove unidades quadradas (DE MORAIS *et al.*, 2018). Os animais foram posicionados no centro do aparato do campo aberto e a atividade exploratória foi registrada por cinco minutos via câmera Sony® 4K. O campo aberto foi lavado com uma solução de água-etanol 30% antes do teste comportamental para eliminar possíveis vieses devido a odores deixados por ratos anteriores.

O teste comportamental foi utilizado para avaliar a atividade locomotora e o comportamento tipo-depressivo dos animais. Para tal análise, foi contabilizado o número de cruzamentos com as quatro patas nos quadrantes durante os cinco minutos do teste e este número de cruzamentos foi utilizado como parâmetro de atividade locomotora geral e impulso exploratório. Também se contabilizou o número

de cruzamentos com as quatro patas no quadrante central, o número de bolota de fezes e poças de urina, com o objetivo de avaliar efeito ansiolítico do composto (GOULD; DAO; KOVACSICS, 2009).

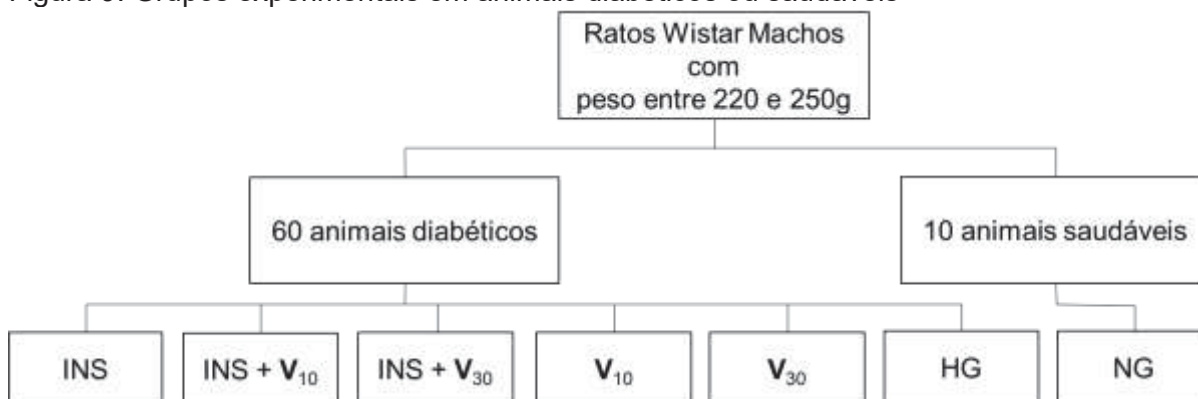
3.3.2 Experimento *in vivo* com animais diabéticos

Para o experimento *in vivo* foram utilizados 70 ratos (*Rattus norvegicus*) da linhagem Wistar, machos, com peso individual entre 220 e 250 gramas, oriundos do Biotério de criação da UFPR, mesmo local onde foram mantidos durante todo o período experimental.

Os animais foram divididos aleatoriamente em sete grupos e foram acondicionados em gaiolas plásticas (49 cm x 34 cm x 16 cm), permanecendo, no máximo, quatro animais por gaiola. Inicialmente, todos os grupos ficaram quinze dias com água disponível em garrafas plásticas com bicos em aço inoxidável, encaixadas na parte superior da grade metálica da gaiola e ração peletizada comercial normoproteica (Nuvilab® CR-1, Curitiba, Paraná, Brasil) *ad libitum* para adaptação ao biotério, respeitando o ciclo claro-escuro de 12/12 horas, com temperatura de $22 \pm 2^\circ\text{C}$ e umidade de $55\% \pm 10$.

Após o período de adaptação, os animais foram identificados dentro dos grupos experimentais. A identificação individual dos animais foi realizada por meio de marcação na cauda, assim como nas respectivas gaiolas de acondicionamento de cada grupo. Assim, cada grupo foi constituído por dez animais, sendo identificados nos grupos esquematizados a seguir (Figura 9).

Figura 9. Grupos experimentais em animais diabéticos ou saudáveis



Fonte: Autor (2022).

Conforme representado, os grupos foram identificados como Grupo INS: Insulina; Grupo INS + V_{10} : Insulina e composto **V** na concentração de 10 mg/kg de peso corporal; Grupo INS + V_{30} : Insulina e composto **V** na concentração de 30 mg/kg de peso corporal; Grupo V_{10} : composto **V** na concentração de 10 mg/kg de peso corporal; Grupo V_{30} : composto **V** na concentração de 30 mg/kg de peso corporal; Grupo HG: animais diabéticos não tratados caracterizados pela hiperglicemia; e Grupo NG: controle negativo, neste grupo não foi induzido o diabetes, mantendo a normoglicemia.

3.3.2.1 Indução do diabetes experimental

A indução do diabetes ocorreu, após jejum noturno, por uma única injeção intraperitoneal (i.p.) de STZ (Santa Cruz Biotechnology; Santa Cruz, Califórnia, EUA), conforme prescrito anteriormente (DE MORAIS *et al.*, 2018). Em 60 animais a injeção foi na dose de 60 mg/kg, recentemente diluída em tampão citrato (10 mM, pH 4,5). Os animais do grupo INS; INS + V_{10} , INS + V_{30} , V_{10} , V_{30} e HG receberam a intervenção. O grupo controle saudável, denominado de NG (10 animais; grupo normoglicêmico) recebeu uma injeção de volume equivalente de tampão citrato (10 mM, pH 4,5).

Hiperglicemia foi confirmada 72 horas após a administração de STZ. Amostras de sangue de cerca de 5 μ L, obtidas por punção na cauda, foram adicionadas em tiras de teste contendo oxidase Accu-Chek-monitor (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemanha). Apenas os animais com níveis de glicose no sangue ≥ 250 mg/dL, foram incluídos no grupo diabético e prosseguiram no estudo.

3.3.2.2 Intervenções para tratamento

As intervenções começaram a ser administradas após confirmação do diabetes, respeitando os mesmos horários da administração, sendo que cada animal recebeu a intervenção referente ao seu grupo e foram mantidas até o final do experimento, que durou 12 dias.

A solução do composto **V** foi preparada para ser administrada a cada 2 dias, estando em um estado de suspensão em NaCl 0,09 M e foi administrada pela via oral por meio de agulha de gavagem (sete centímetros de comprimento) visando à administração das doses exatas para todos os animais. Os grupos com insulina

receberam injeções subcutâneas com agulha própria de insulina isofana humana (insulina NPH), administrada duas vezes ao dia (2 U.I. às 9h00 e 4 U.I. às 17h00). O controle recebeu as mesmas intervenções, no mesmo volume e via de administração, mas apenas com NaCl 0,09 M.

3.3.2.3 Acompanhamento do período experimental

A cada dois dias durante o experimento, todos os animais foram pesados em balança analítica digital e a dose do composto foi proporcionalmente adequada. Além disso, as concentrações de glicose foram quantificadas com tiras de teste contendo glicose oxidase usando monitor *Accu-Chek* (*Roche Diagnostics GmbH*, Mannheim, Alemanha) por meio do sangue obtido com o pique na cauda. A ingestão hídrica e consumo alimentar foram medidos diariamente pela diferença entre quantidade ofertada e sobra.

Na primeira intervenção, os níveis glicêmicos foram monitorados quanto à curva glicêmica no momento da administração, 30 minutos, 60 minutos, 120 minutos e 180 minutos após.

3.3.2.4 Medidas murinométricas

A circunferência abdominal (CA - imediatamente anterior da perna traseira), a circunferência torácica (CT - imediatamente atrás da perna dianteira) e o comprimento do corpo (nariz ao ânus ou comprimento do nariz ao ânus) foram determinados com fita métrica. A CA e CT foram obtidas para avaliar a relação entre CA e CT (NOVELLI et al., 2007).

O comprimento corporal, juntamente com o peso corporal, foram usados para determinar o parâmetro antropométrico denominado de Índice de Lee, que é calculado pela relação entre a raiz cúbica do peso corporal e o comprimento nariz-ânus (em centímetros) (BERNARDIS, 1970).

Outra medida utilizada foi a espessura de dobra cutânea, neste método, as medidas foram obtidas em cinco locais com um paquímetro Lange e quatro pontos de referência foram determinados de acordo com MARSHALL *et al.* (1969): escapular direito, abdominal direito, tríceps direito e perna direita, e um local adicional foi

escolhido na crista ilíaca direita. Todos os valores obtidos foram somados para obtenção da medida de dobras cutâneas totais (TEKUS *et al.*, 2018).

Para analisar a repetibilidade e reprodutibilidade das medidas murinométricas, duas avaliações foram aplicadas nos mesmos animais. Todas as medidas foram aplicadas no início e no final do experimento.

3.3.2.5 Eutanásia e obtenção de amostras

No final do experimento, os ratos foram exsanguinados sob anestesia de tiopental intraperitoneal (100 mg/kg) antes do sacrifício para decapitação. Amostras de sangue foram coletadas (2 ml de soro e 2 ml com anticoagulante) para determinação do perfil bioquímico, importantes para avaliação glicêmica, lipídica e hepática. Foram coletadas amostras de fígado, rim e pâncreas em tubos *ependorfs*, mantidas em nitrogênio líquido e posterior congelamento a -80°C.

As determinações dos seguintes parâmetros bioquímicos dos animais foram realizadas: glicose sérica, colesterol total, HDL-colesterol, triglicerídeos, NHDL-colesterol, amilase, ureia, creatinina, ácido úrico, 1,5-anidroglicitol (1,5AG), proteína total, albumina, aspartato amino transferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT). Estas foram realizadas com um sistema automatizado usando reagentes, calibradores e controles fornecidos pelo fabricante (Labmax 400, *Labtest Diagnostics*).

3.4 Análises estatísticas

No TCA e demais experimentos *in vitro*, bem como nos experimentos *in vivo*, os resultados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão (DP) da média. O software Graph Pad Prism® versão 6.00 (Graph Pad Software Inc., San Diego, EUA), foi usado para a análise estatística. Diferenças entre os tratamentos de múltiplos grupos foram detectadas por Análise de Variância (ANOVA) de uma via corrigida pelo teste de Tukey, $p < 0,05$ foi considerado como nível de significância. *In vivo*, os grupos de tratamento foram comparados com os animais diabéticos não tratados (identificado como HG).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Estudos *in vitro* em linhagem celular HepG2

A escolha da linhagem celular HepG2 para o estudo *in vitro* foi pautada em motivos como: a linhagem é menos delicada em comparação às linhagens primárias, com menor tempo de cultivo e resultando em menor custo experimental. Além disso, a linhagem celular HepG2 expressa citocromo P450 e possui diversos transportadores de glicose (MACHADO, 1998). Por isso, foi utilizada como modelo biológico para avaliar a captação da glicose de **V**, bem como a viabilidade celular.

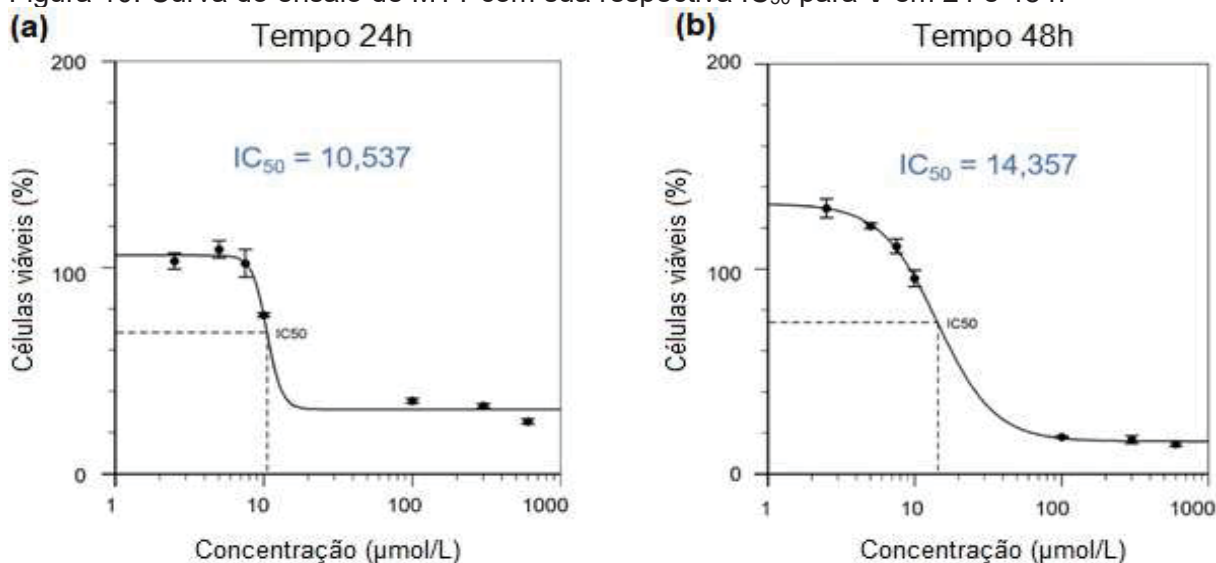
4.1.1 Viabilidade celular

A viabilidade celular e citotoxicidade de **V** na linhagem celular HepG2 foram avaliadas nos tempos de 24 h e 48 h, normalizadas em relação ao controle com células HepG2 não tratadas com **V**.

Os tratamentos foram realizados em sete concentrações (600 μ M, 300 μ M, 100 μ M, 10 μ M, 7,5 μ M, 5 μ M e 2,5 μ M/mL) e as absorbâncias da formazana foram empregadas para a determinação da porcentagem de células viáveis. O cálculo da concentração inibitória de 50% de viabilidade celular (IC_{50}) foi realizado para **V** nos dois tempos avaliados (24 e 48 horas). Os resultados expressam a média dos três experimentos independentes (Figura 10).

O composto **V** apresentou o valor de 10,5 μ mol/L de IC_{50} em 24 h, sendo que, com o decorrer do tempo, o valor de IC_{50} aumentou para 14,3 μ mol/L, ou seja, com 48 horas de tratamento nota-se uma diminuição da citotoxicidade (Figura 10).

Figura 10. Curva do ensaio de MTT com sua respectiva IC_{50} para **V** em 24 e 48 h



Resultados expressos em média e desvio padrão dos três experimentos independentes no tempo 24 (a) e 48 horas (b). IC_{50} reflete a concentração inibitória de 50% de viabilidade celular. O valor expressa a concentração de **V** em $\mu\text{mol/L}$.

Fonte: Autor (2022).

Comparativamente, dados de IC_{50} obtidos pela redução do MTT em células HepG2 de outros compostos de vanádio também com quatro centros ligantes, disponíveis na literatura, são apresentados na Tabela 4.

Tabela 4. Valores de IC_{50} em $\mu\text{mol/L}$ de diferentes compostos de vanádio em cultivo celular em HepG2

REFERÊNCIA	COMPOSTO	IC_{50} ($\mu\text{mol/L}$)	
		24 h	48 h
ESSE ESTUDO	$[\text{V}^{\text{IV}}\text{O}(\text{mal})(\text{bpy})] \cdot \text{H}_2\text{O}$	10,5	14,3
NI <i>et al.</i> (2018)	$[\text{VO}(\text{ox})(\text{phen})(\text{H}_2\text{O})]$	-	29,1
	$[\text{V}^{\text{IV}}\text{O}(\text{ida})(\text{bpy})] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	-	106,1
	$[\text{VO}(\text{ox})(\text{bpy})(\text{H}_2\text{O})]$	-	52,3
	$(\text{phen})[\text{V}^{\text{IV}}\text{O}(\text{ida})(\text{phen})] \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	-	39,63
	$(\text{phen})[\text{V}^{\text{IV}}\text{O}(\text{H}_2\text{O})(\text{nta})] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	-	101,62
ZHANG <i>et al.</i> (2013)	$[\text{V}^{\text{IV}}\text{O}(\text{satsc})(\text{phen})]$	8,25	6,80
	$[\text{V}^{\text{IV}}\text{O}(3,5\text{-dibrsatsc})(\text{phen})]$	7,35	1,68
CAO <i>et al.</i> (2017)	$[\text{VO}(\text{hnd-napha})(\text{Bphen})]$	94,9	-
	$[\text{VO}(\text{o-van-met})(\text{Bphen})]$	26,8	-
CAO <i>et al.</i> (2016)	$[\text{VO}(\text{desa-met})(\text{phen})\text{MeOH}_2\text{H}_2\text{O}]$	> 100	-
	$[\text{VO}(\text{o-van-met})(\text{phen})] \cdot \text{MeOH} \cdot \text{CH}_2\text{Cl}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$	26,8	-
	$[\text{VO}(3,5\text{-ditbsal-3-1-Naph-L-ala})(\text{phen})] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	28,4	-
	$[\text{VO}(2\text{-hyd-1-nade-3-1-Naph-L-ala})(\text{phen})] \cdot 1,5\text{H}_2\text{O}$	45,2	-
	$[\text{V}^{\text{IV}}\text{O}(\text{H}_2\text{L}^{\text{a}})]$	47,2	43,4

Abreviações: ox = oxalato; phen = 1,10-fenantrolina; ida = ácido iminodiacético; bpy = 2,2'-bipiridina; satsc = salicialdeído tiosemicarbazona; 3,5-dibrsatsc = 3,5-salicialdeído tiosemicarbazona

Nota: - refere-se a dados não avaliados

Comparando os valores de IC_{50} de **V** com os de outros compostos similares descritos na literatura, este apresenta uma concentração citotóxica inferior ao reportado para outros complexos de vanádio sintetizados e testados em condições semelhantes, conforme referências e dados apresentados (Tabela 4).

V apresentou pouco ou nenhum efeito citotóxico nas células HepG2 em concentrações de 2,5, 5,0 e 7,5 $\mu\text{mol/L}$ em 24 horas (Figura 10), desta forma as concentrações de 2,5 $\mu\text{mol/L}$ e 7,5 $\mu\text{mol/L}$ foram utilizadas para o ensaio de captação de glicose.

4.1.2 Estudo de captação da glicose

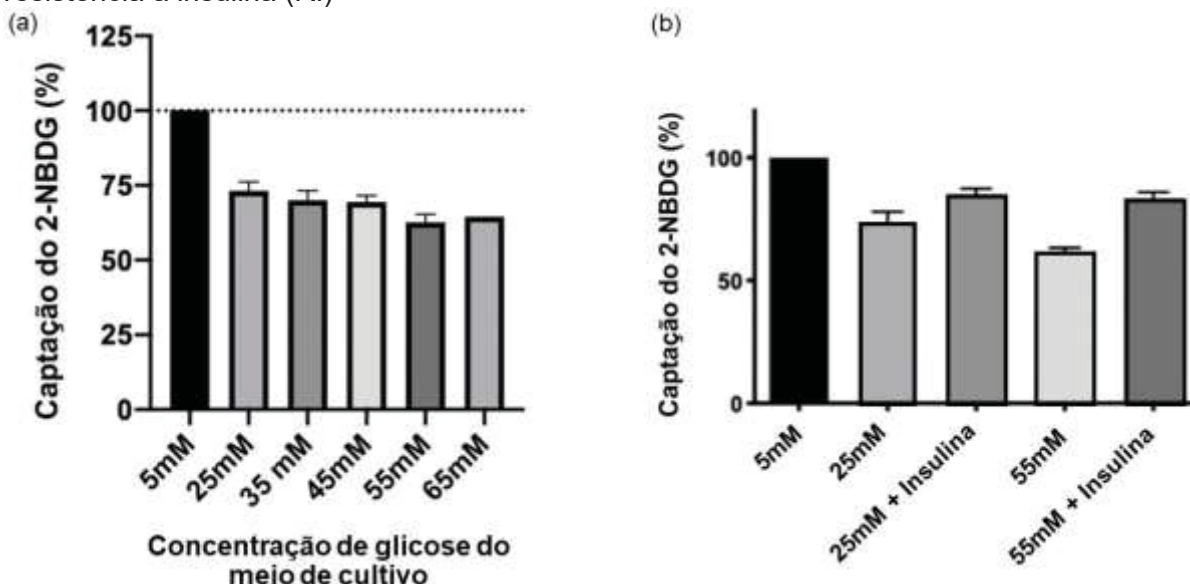
Com o objetivo de avaliar a captação do análogo fluorescente de glicose (2-NBDG) o cultivo foi realizado conforme previamente descrito na literatura (ZOU; WANG; SHEN, 2005), assim, as células foram cultivadas em 5,5 mmol/L de glicose (controle normoglicêmico) e em 55 mmol/L de glicose para mimetizar ambiente de RI (hiperglicêmico) e posteriormente submetidas aos diferentes tratamentos. No meio de cultivo normoglicêmico, a captação do 2-NBDG foi considerada como 100% e a internalização de 2-NBDG nas diferentes condições foi reportada como a porcentagem de captação em relação ao controle normoglicêmico.

A concentração de glicose em cultura em HepG2 entre 5-7 mM é considerada um ensaio de captação “normal” de glicose para 2-NBDG por vários autores (ZOU; WANG; SHEN, 2005; NAKAJIMA *et al.*, 2014; JIANG *et al.*, 2016; YAN; DAI; ZHENG, 2016; PANAHI *et al.*, 2018; KONGOT *et al.*, 2019) e outras linhagens celulares (TARDIF *et al.*, 2003; HWANG; CHANG, 2012) também.

Nakajima e colaboradores (NAKAJIMA *et al.*, 2014) demonstraram que uma alta concentração de glicose (15-33 mM) atenua seletivamente as vias de sinalização acopladas ao receptor de insulina na linhagem HepG2. Com essas informações, foi realizada uma curva com concentrações de glicose entre 25 – 65 mM (Figura 11a) e foi observado que a maior redução na captação de glicose foi obtida na concentração de 55 mM (62,5%). De fato, a 25 mM a captação de glicose é maior do que a 55 mM ($73,7 \pm 4,2$ vs $61,7 \pm 1,7$; $p=0,009$). Além disso, quando as células resistentes à insulina (25 mM e 55 mM) são tratadas com insulina, a diferença percentual de captação de 2-NBDG antes e após o tratamento com insulina é mais pronunciada em 55 mM do

que em 25 mM, tornando o resultado mais confiável e reprodutível, conforme mostrado na figura a seguir (Figura 11b).

Figura 11. Otimização da captação de 2-NBDG em HepG2 em diferentes condições de resistência à insulina (RI)



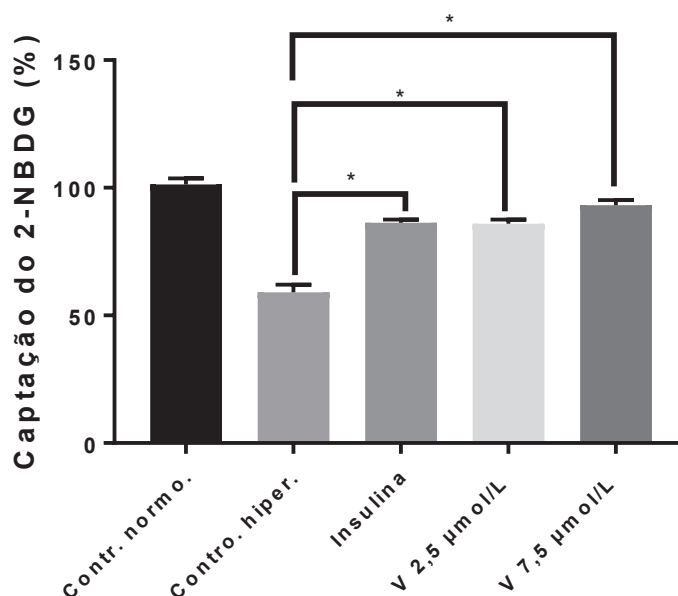
(a) Captação de 2-NBDG em células HepG2 em diferentes concentrações glicose no meio de cultivo (25, 35, 45, 55 e 65 mM de glicose). (b) Captação de 2-NBDG frente ao tratamento com insulina em diferentes condições de RI (células cultivadas em 25 mM e 55 mM de glicose). Condição normoglicêmica (5 mM ou 100%) de captação de 2-NBDG em HepG2.

Fonte: Autor (2022).

Com base neste estudo preliminar e apoiado na literatura (JIANG *et al.*, 2016), implementamos os experimentos de RI na concentração de 55 mM no meio de cultura celular (Figura 12).

A Figura 12 mostra que a captação de 2-NBDG cai para 62% nas condições de hiperglicemia (55 mmol/L de glicose), caracterizando um ambiente de RI (controle hiperglicêmico). Como esperado, o tratamento de células no meio hiperglicêmico com insulina (insulina) melhorou a captação de 2-NBDG para 86% em comparação com as células resistentes à insulina (controle hiperglicêmico) ($p < 0,05$). Quando as células do meio hiperglicêmico (controle hiperglicêmico) foram tratadas com **V** nas duas concentrações adotadas (2,5 e 7,5 $\mu\text{mol/L}$), a melhora na captação de 2-NBDG foi semelhante à observada com o tratamento com insulina (insulina), mostrando um aumento para 86% (**V** 2,5 $\mu\text{mol/L}$) e 93% (**V** 7,5 $\mu\text{mol/L}$) ($p < 0,0001$).

Figura 12. Percentual de captação do 2-NBDG em meio normoglicêmico ou hiperglicêmico associado ou não a diferentes tratamentos em HepG2



Resultados expressos em média e desvio padrão dos três experimentos independentes. Percentual calculado com base na condição normoglicêmica. Valores de p calculados pela ANOVA corrigido por Tukey, * p < 0,0001.

Fonte: Autor (2022).

Esses resultados são corroborados por estudos anteriores que demonstraram que outros complexos de vanádio também podem aumentar a captação de glicose na mesma linhagem celular usada neste estudo (ZHAO *et al.*, 2015; KONGOT *et al.*, 2019; KONGOT *et al.*, 2021) e em outros tipos de células, como cardiomiócitos (TARDIF *et al.*, 2003) e miotubos L6 (HWANG; CHANG, 2012) (Tabela 5).

Dois outros complexos de vanádio, $[V^{IV}O(hpd\text{bal-smdt})(phen)]$ e $[V^{IV}O(hpd\text{bal-smdt})(bipy)]$, resultaram em uma excelente captação de glicose de 90,7% e 90,4%, respectivamente, em células HepG2, mostrando uma efeito semelhante ao da metformina (85,7%), que é um medicamento antidiabético amplamente utilizado (KONGOT *et al.*, 2021).

Os resultados obtidos são consistentes também com outros estudos *in vitro* anteriores, no qual os resultados foram compilados e apresentados na Tabela 5.

Tabela 5. Composto testado, linhagem celular usada e principais resultados do estudo *in vitro* de captação de glicose

REFERÊNCIA	COMPOSTO	LINHAGEM CELULAR	PRINCIPAIS RESULTADOS
PRESENTE ESTUDO	$[\text{V}^{\text{IV}}\text{O}(\text{mal}) (\text{bpy})] \cdot \text{H}_2\text{O}$	HepG2	O tratamento com V restaurou a captação de 2-NBDG em 86% na concentração de 2,5 $\mu\text{mol/L}$ e 93% na concentração 7,5 $\mu\text{mol/L}$, quando comparado com o controle.
(WEI; LI; DING, 2007)	NaVO_3	Células musculares isoladas de ratos Wistar tratados	O tratamento com NaVO_3 e com insulina atingiram um nível de glicose desejável, além disso, a maioria dos transcritos de genes alterados em ratos diabéticos foram normalizados em ambos os tratamentos.
(TARDIF <i>et al.</i> , 2003)	Vanadato	Cardiomiócitos	A pré-incubação com concentrações de vanadato de 25 a 75 M induz a um aumento dose-dependente na captação de glicose.
(HWANG; CHANG, 2012)	Pentóxidos de vanádio: S1 (V^{5+} : $8,0 \pm 0,9$ lg/l), S2 (V^{5+} : $24,0 \pm 2,0$ lg/l), e S3 (V^{5+} : $26,0 \pm 2,0$ lg/l)	miotubos L6	Os compostos de vanádio analisados aumentaram a absorção de glicose, na seguinte ordem: $\text{S3} < \text{S2} < \text{S1}$.
(ZHAO <i>et al.</i> , 2015)	Sulfato de oxidovanádio(IV)	HepG2	A exposição das células ao VOSO_4 em quatro diferentes concentrações (de 5 a 50 μM) resultaram em um aumento na captação de glicose de até 100% em comparação às células não tratadas.
(KONGOT <i>et al.</i> , 2019)	Complexo reduzido de vanádio(IV) derivado de ligante de salen	HepG2	Nas células que receberam o complexo de vanádio houve uma absorção significativa de NBDG de 95,4%, que foi maior do que o induzido pela metformina, o medicamento antidiabético padrão.

O aumento da captação de glicose mediada por compostos de vanádio é consistente com a demonstração de seus efeitos na cascata de sinalização da insulina e suas propriedades miméticas da insulina (BAPTISTELLA *et al.*, 2021; TURTOI *et al.*, 2021). Em conjunto, esses estudos confirmam que os complexos de vanádio, como o **V**, possuem excelentes capacidades miméticas de insulina em diversas linhagens celulares. Portanto, o tratamento com o **V** (2,5 e 7,5 $\mu\text{mol/L}$) mostrou efeito mimético da insulina em células HepG2 (Figura 12).

Como estes resultados se mostraram promissores com relação a concentração de 10,53 $\mu\text{mol/L}$ de IC_{50} e na porcentagem de captação de glicose do composto similar ao tratamento com insulina, o composto foi avaliado em modelo animal com ratos diabéticos induzido por STZ (*in vivo*).

4.2 Estudos *in vivo* no modelo animal em ratos Wistar

Para confirmar as propriedades terapêuticas previamente demonstradas nos ensaios *in vitro*, foi realizado o ensaio *in vivo*, em ratos Wistar com diabetes induzido com STZ.

A concentração escolhida de **V** usada na experimentação animal foi definida considerando outros estudos com resultados promissores e é resumidamente apresentado na Tabela 6.

Tabela 6. Modelo animal, tratamentos adotados e principais resultados de diferentes compostos de vanádio disponíveis na literatura

ESTUDO	COMPOSTO TESTADO	MODELO ANIMAL USADO	CONCENTRAÇÃO, TEMPO E FORMA DE ADMINISTRAÇÃO DO COMPOSTO	RESULTADOS PRINCIPAIS
PRESENTE ESTUDO	[(V ^{IV} O(mal)(bpy)].H ₂ O)	Ratos Wistar machos com STZ-diabetes (60 mg/kg)	10 e 30 mg/kg de peso corporal do composto administrado via oral por gavagem por 12 dias	#
XIE. <i>et al.</i> (2010)	[N,N0 -bis(4-hydroxysalicylidene)-o-phenylenediamine] oxovanadium ^(IV)	Ratos <i>Sprague-Dawley</i> machos com STZ-diabetes (50 mg/kg)	5, 10, 20 mg/kg de peso corporal do composto administrado via oral por 14 dias	O composto melhorou significativamente a glicemia e reduziu a RI
SAKURAI <i>et al.</i> (1995)	Bis(picolinato) oxovanadium ^(IV)	Ratos Wistar com STZ-diabetes (40 mg/kg)	64,5, 32,25, 16,18 e 6,45 mg/kg de peso corporal do composto administrado via oral ou intraperitoneal por 14 dias	Nas duas vias de administração, o composto foi capaz de normalizar a glicemia
SAKURAI <i>et al.</i> (2000)	Bis(1-oxy-2-pyridinethiolato) oxovanadium ^(IV)	Ratos Wistar machos com STZ-diabetes (40 mg/kg)	10 mg/kg de peso corporal do composto administrado via oral por 21 dias e 5 ou 2,5 mg/kg do composto por 14 dias seguidos de metade da dose administrada pela via intraperitoneal por mais 7 dias	O composto foi considerado um potente complexo mimético da insulina oralmente ativo no tratamento de DM insulino-dependente em animais experimentais
SÀNCHEZ-GONZÁLEZ <i>et al.</i> (2014)	Bis(maltolato) oxovanadium ^(IV)	Ratos Wistar machos com STZ-diabetes (60 mg/kg)	1 mg de vanádio por dia (resultando em 6,2 mg do composto) ou 3 mg de vanádio por dia (resultando em 18,7 mg do composto) por 35 dias	Nos animais tratados com 3 mg de vanádio por dia, houve uma diminuição significativa na glicemia em jejum
WILLSKY <i>et al.</i> (2001)	Bis(maltolato) oxovanadium ^(IV)	Ratos Wistar machos com STZ-diabetes (60 mg/kg)	32 e 22 mg/kg de peso corporal do composto por 72 horas pela via intraperitoneal	O composto reduziu significativamente a glicemia em seis dos oito animais testados

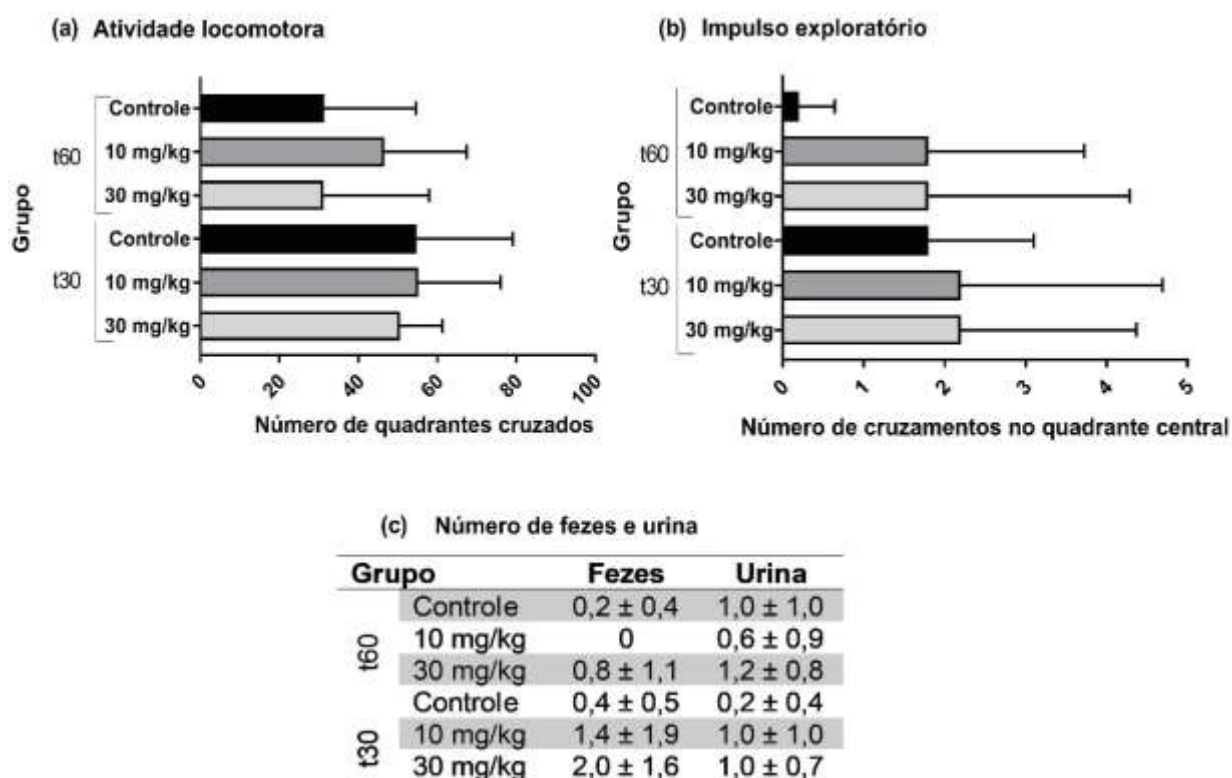
Partindo dos resultados obtidos pelos autores acima citados, as concentrações testadas de **V** foram de 10 e 30 mg/kg de peso corporal. Para avaliar o possível efeito tóxico comportamental do composto foi realizado o experimento de campo aberto.

4.2.1 Efeitos de **V** no teste de campo aberto (TCA)

Para avaliar se o composto **V** foi capaz de causar deficiência locomotora ou impulso exploratório dos animais, bem como, e para avaliar a função fisiológica dos ratos pelo número de fezes e poças de urina, os animais foram submetidos ao TCA.

Os animais saudáveis foram, então, avaliados em 30 (ou t30) e 60 minutos (ou t60) após o tratamento com veículo ou **V** na concentração de 10 ou 30 mg/kg e os resultados são expressos na Figura 13.

Figura 13. Efeito da administração de **V** na atividade locomotora, exploratória e fisiológica de animais submetidos ao TCA



Resultados expressos em média e desvio padrão do grupo (n=5). ANOVA de uma via seguida pelo teste de Tukey não demonstraram diferença mínima significativa entre os grupos.

Fonte: Autor (2022).

Os resultados dos animais tratados e não tratados não apresentaram diferença estatística (Figura 13), podendo concluir que no período avaliado, o

composto **V** não induziu a efeito sedativo, dificuldades de locomoção e efeitos fisiológicos nos parâmetros analisados.

4.2.2 Efeitos no controle glicêmico de **V** em ratos Wistar diabéticos

Para a avaliação dos possíveis efeitos do composto **V** no controle glicêmico, os ratos sem indução do diabetes (NG) e o ratos com diabetes induzido por STZ tratados com veículo (HG), insulina (INS), insulina + composto **V** nas concentrações de 10 mg/Kg (INS+**V**₁₀) e 30 mg/Kg (INS+**V**₃₀) e composto **V** nas concentrações de 10 mg/Kg (**V**₁₀) e 30 mg/Kg (**V**₃₀) foram avaliados o consumo alimentar, a ingestão hídrica e a evolução do peso corporal para cálculo do ganho de peso diário ao longo do período experimental, que durou 12 dias, e medidas murinômicas, apenas no início e no fim do período experimental. Os resultados são apresentados na Tabela 7.

Tabela 7. Média do consumo de alimentos e água, peso corporal inicial e final, variação do peso corporal (período de 12 dias), índice de Lee inicial e final, dobras cutâneas totais e relação entre circunferência abdominal e circunferência torácica

Grupo/		NG	HG	INS	INS + V ₁₀	INS + V ₃₀	V ₁₀	V ₃₀
Parâmetros avaliados								
Consumo alimentar (g/dia)		28,9± 2,2**	40,7± 1,4	35,9± 1,8**	36,8± 1,0**	34,8± 1,2**	39,2 ± 0,8	39,0 ± 0,9
Ingestão hídrica (mL/dia)		59,3± 8,8**	159,2± 7,5	65,7± 7,7**	62,3± 3,3**	69,9± 9,2**	156,3± 11,7	141,4± 4,9*
Peso corporal	Inicial (g)	224,1± 10,4	225,1± 12,5	227,9± 9,5	233,4± 10,2	231,0± 6,3	227,5± 8,7	232,2± 9,7
	Final (g)	306,2± 22,4**	241,1± 14,0	292,1± 23,3**	307,3± 13,0**	301,4± 11,7**	241,1± 5,9	236,5± 11,9
	Ganho de peso diário	5,45± 1,07**	2,54± 0,90	6,71± 1,95**	7,18± 0,87**	7,38± 0,65**	2,64± 0,73	1,79± 1,21
Índice de Lee	Inicial (g/cm ²)	0,318± 0,01	0,316± 0,01	0,325± 0,02	0,324± 0,01	0,317± 0,01	0,316± 0,01	0,326± 0,01
	Final (g/cm ²)	0,320± 0,01*	0,306± 0,01	0,314± 0,01	0,318± 0,01	0,324± 0,01**	0,304± 0,01	0,296± 0,01
Dobras cutâneas totais	Inicial (mm)	5,75± 0,92	6,1± 0,66	7,6± 0,84	7,6± 0,96	6,8± 0,9	7,1± 0,87	6,2± 0,63
	Final (mm)	7,40± 0,91**	5,37± 0,59	8,95± 1,17**	7,17± 0,87**	7,06± 0,86**	6,32± 0,44	6,20± 0,35
Relação entre CA/CT	Inicial (mm)	1,17± 0,06	1,19± 0,07	1,22± 0,17	1,21± 0,09	1,21± 0,06	1,19± 0,06	1,24± 0,08
	Final (mm)	1,14± 0,06	1,19± 0,09	1,23± 0,12	1,19± 0,09	1,23± 0,04	1,22± 0,08	1,23± 0,06

Resultados expressos em média e desvio padrão do grupo (n=10). ANOVA de uma via seguida pelo teste de Tukey. * indica p <0,05 quando comparado a ratos diabéticos tratados com veículo (HG). ** indica p <0,0001; quando comparados a ratos diabéticos tratados com veículo (HG).

Fonte: Autor (2022).

Hiperglicemia, polifagia, poliúria e polidipsia são sintomas clássicos de DM (IDF, 2021) e puderam ser observados, juntamente com a perda de peso, nos animais diabéticos durante o período de três dias iniciais (que perdurou entre a administração da STZ e o início dos tratamentos). Após o início dos tratamentos, a perda de peso corporal, o aumento da quantidade de ração consumida diariamente dos animais diabéticos e o aumento do volume de ingestão hídrica foram prevenidas pela administração de insulina com ou sem associação com **V**, sendo que a administração do INS+**V**₁₀ ou INS+**V**₃₀ não foi capaz de alterar os parâmetros avaliados quando comparado aos animais que receberam apenas INS (respectivamente, $p=0,96$ e $p=0,91$), o que foi atribuído ao efeito antidiabético da insulina.

Estudos que demonstraram efeito antidiabético de compostos de vanádio observaram prevenção da perda de peso dos animais diabéticos (CAM; BROWNSEY; MCNEILL, 2000; SARMIENTO-ORTEGA *et al.*, 2021). Inclusive, foi mostrado que a suplementação de um novo composto de vanádio foi capaz de aumentar os níveis de hormônios relacionados ao apetite (nesfatina-1 e apelina) em ratos com diabetes induzida com STZ, prevenindo a perda de peso, ao mesmo tempo em que diminuiu a glicemia (KONTAŞ AŞKAR *et al.*, 2021), sugerindo que o vanádio pode atuar no controle da ingestão alimentar e regular os níveis glicêmicos.

Contudo, o tratamento dos animais diabéticos apenas com o composto **V** na concentração 30 mg/kg (**V**₃₀) foi capaz de reduzir volume de ingestão hídrica em comparação aos animais diabéticos tratados com veículo (HG) ($p < 0,0001$). Esses dados corroboram com o estudo de Xie *et al.* (2014), que ao avaliar diferentes compostos de vanádio, observaram que todos os compostos melhoram os sintomas de polidipsia e polifagia no modelo de diabetes induzida por STZ (XIE *et al.*, 2014) e com o de Domingo *et al.* (1991) que a confirmou a eficácia do tratamento oral com metavanadato de sódio (NaVO_3), ortovanadato de sódio (Na_3VO_4) e sulfato de vanadil pentahidratado ($\text{VOSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) no alívio de alguns sinais de diabetes, como hiperglicemia, polifagia e polidipsia (DOMINGO; GÓMEZ, 2016).

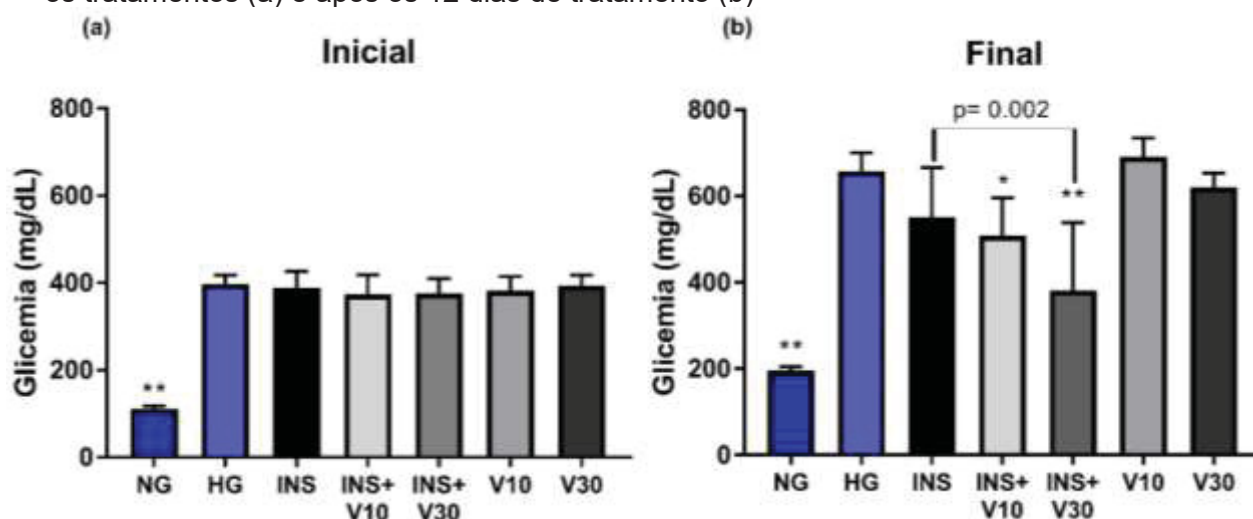
Neste estudo, os pesos corporais dos animais diabéticos tratados com veículo (HG) foram menores quando comparados aos de ratos normoglicêmicos (NG) ao longo do tempo do estudo. Ao final do período experimental, os pesos corporais dos grupos tratados com insulina (associada ou não a **V**) foram superiores aos dos animais diabéticos tratados com veículo (HG). Após a indução do diabetes e ao final dos 12 dias de tratamento, os parâmetros murinométricos indicaram que os seis grupos de

animais diabéticos permaneceram com proporções corporais semelhantes (CA/CT), mas todos os animais tratados com insulina apresentaram melhora no peso corporal final, na média de ganho de peso corporal nos 12 dias de tratamento e nas dobras cutâneas totais final.

O índice de Lee mostra que os animais diabéticos tratados com INS+V₃₀ e os animais normoglicêmicos (NG) mantiveram este parâmetro antropométrico significativamente diferente dos animais diabéticos tratados com veículo (HG), com peso corporal diferente, independentemente do tamanho do rato. O índice de Lee é um parâmetro de avaliação corporal que se assemelha ao índice de massa corporal (IMC) em humanos, oferecendo melhores interpretações quanto ao estado nutricional (BERNARDIS, 1970).

As concentrações da glicose dos animais foi outro parâmetro avaliado durante o período experimental, por meio de um pique na cauda para obtenção do sangue total e leitura por glicosímetro e ao final do período experimental com análise da glicose sérica em sistema automatizado. Os resultados são mostrados na Figura 14.

Figura 14. Glicemia (mg/dL) dos animais ratos normoglicêmicos e diabéticos antes de iniciar os tratamentos (a) e após os 12 dias de tratamento (b)



Os valores representam a média $\pm$ desvio padrão e * indica $p < 0,05$ quando comparado com ratos diabéticos tratados com veículo (HG). ** indica $p < 0,0001$; quando comparados a ratos diabéticos tratados com veículo (HG). ANOVA de uma via seguida de teste post hoc de Tukey. Fonte: Autor (2022).

Na Figura 14 é possível observar o primeiro dia de tratamento, identificado como inicial (a), demonstrando que os animais foram tratados com a STZ tornaram-se diabéticos (glicemia em média 400 mg/dL) e foram pareados em seis grupos para

os diferentes tratamentos. Ao final do período experimental de 12 dias (b) os tratamentos apenas com a insulina (INS) e insulina associada ao composto de **V** (INS+**V**₁₀ e INS+**V**₃₀ = $p < 0,005$) foram capazes de reduzir a glicemia, mas não para as concentrações na faixa de normoglicemia, corroborando com outros dados da literatura (POUCHERET *et al.*, 1995; LIMA *et al.*, 2021).

O melhor efeito obtido com relação a redução das concentrações plasmáticas de glicose foi a associação da insulina com o composto **V** na concentração de 30 mg/Kg (INS+**V**₃₀), com uma redução de 30,8% da média de glicemia obtida ao final do experimento. Os animais tratados apenas com o composto **V**, em ambas as concentrações testadas, não tiveram efeito no controle da glicemia.

Os dados dessa pesquisa são similares ao obtido por outro grupo de pesquisadores, que encontraram, ao final do experimento de animais STZ tratados, uma média de glicemia de 405,8 mg/dL em animais diabéticos tratados com solução salina, 137,2 mg/dL nos diabéticos tratados com insulina e 271,0 mg/dL nos diabéticos tratados $V^{IV}OSO_4$ (LIMA *et al.*, 2021).

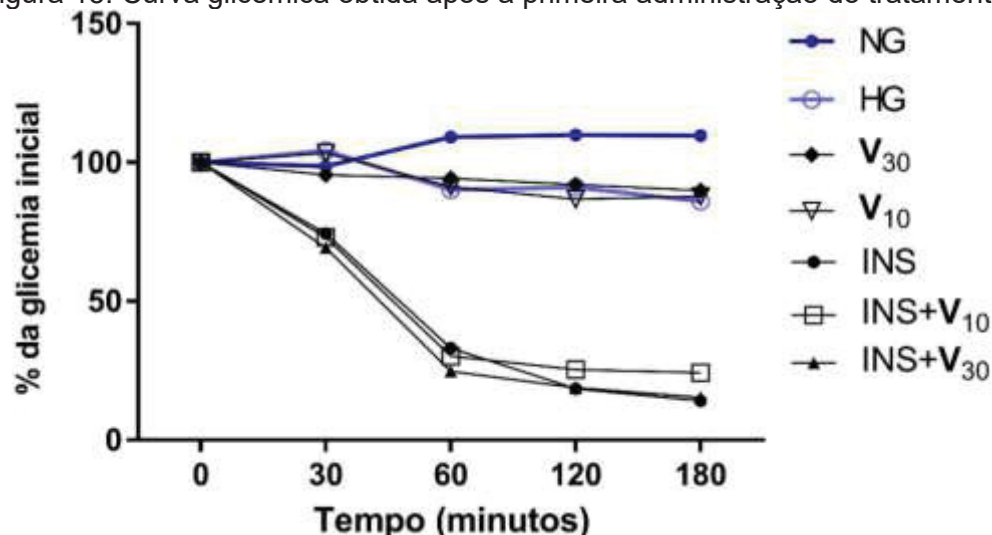
Contudo, o tratamento combinado da insulina com o composto **V** na concentração de 30 mg/kg de peso (com valor médio de glicemia de 382 mg/dL) foi mais eficiente na redução da glicemia ($p = 0,002$) quando comparado ao tratamento apenas com insulina (com valor médio de glicemia de 551,35 mg/dL). E, assim como nesse estudo, outros autores também avaliaram a insulina em associação com complexos de vanádio em ratos diabéticos induzidos por STZ e ação sinérgica na redução da glicemia (POUCHERET *et al.*, 1995; KROŚNIAK; GAWLIK; GRYBOŚ, 2009).

O reconhecimento dos compostos de vanádio como agentes intensificadores da insulina é descrito desde 1980, quando sua eficácia foi dependente da presença de insulina para terapia antidiabética em estudo *in vitro* por meio do cultivo celular em adipócitos isolados de ratos (DUBYAK; KLEINZELLER, 1980), mas também em estudo *in vivo*, no qual a gavagem oral de VO^{IV} ($C_6H_{14}N_2O_2 \cdot K^2N$, K^2O) em ratos Wistar machos com diabetes induzido por STZ demonstrou efeitos semelhantes à insulina na redução da hiperglicemia (LIMA *et al.*, 2021).

Visando avaliar o efeito de uma única dose de **V**, após a primeira administração, foi realizada uma curva glicêmica nos tempos 0, 30, 60, 90, 120 e 180 minutos após administração dos diferentes tratamentos. A Figura 15 apresenta

os resultados obtidos, sendo expressos em percentual a partir da glicemia inicial (obtida no t0 e considerado o valor de referência de 100%).

Figura 15. Curva glicêmica obtida após a primeira administração do tratamento



Os valores em representam o percentual da glicemia a partir da obtida no tempo inicial (t0).
Fonte: Autor (2022).

Observando os resultados obtidos, é possível considerar que os grupos INS, INS+V₁₀ e INS+V₃₀ apresentaram o mesmo perfil de redução das concentrações plasmáticas de glicose, já o composto **V** nas duas concentrações testadas não foi capaz de reduzir a glicemia no período. Dessa forma, observa-se o composto **V** não apresenta efeito agudo (Figura 15) sobre as concentrações plasmáticas de glicose.

Outra pesquisa também observou que a administração de vanádio-clorodipicolinato (V-dipic-Cl) na concentração de 0,1 mg/ml não exibiu efeitos de redução da glicose quando administrado na água de beber de ratos diabéticos na primeira etapa da pesquisa (que perdurou 20 dias). No entanto, a continuação do tratamento diário, com a dose de 0,3 mg/ml fez com que a glicemia reduzisse de maneira significativa (LI, M. *et al.*, 2009), reforçando a importância do composto de vanádio a ser usado, sua dose e o período de tratamento para obtenção de resultados promissores no tratamento de DM.

Esses dados corroboram com outros estudos que demonstraram que os compostos de vanádio apresentam efeitos miméticos a insulina apenas quando administrados em doses orais diárias (SAKURAI, HIROMU, 2002). Um estudo mostrou que os efeitos na redução glicêmica pelo composto de vanádio começam a aparecer em média dois dias após o início do tratamento com altas concentrações de

vanadato (0,8 mg/ml) ou quatro dias quando usadas baixas concentrações de vanadato (0,2 mg/ml) administrado pela água de beber (MEYEROVITCH *et al.*, 1987).

Esses dados reforçam a importância da administração regular dos compostos de vanádio, visto que estudos demonstram que diversos genes candidatos da via de sinalização da insulina estão envolvidos no efeito do tratamento com vanádio sobre a hiperglicemia.

Contudo, na presente pesquisa, o tratamento com o composto **V** combinado à insulina, tanto na concentração 10 e 30 mg/kg (respectivamente INS+V₁₀ e INS+V₃₀) foi capaz de reduzir a glicemia quando comparado ao grupo tratado com veículo (HG) (p <0,05). Além disso, as concentrações de glicose no sangue em ratos diabéticos do grupo INS+V₃₀ foram significativamente reduzidas em relação ao grupo que recebeu apenas insulina ao final do experimento (Figura 14).

Também tem sido reportado que compostos de vanádio, além de melhorarem o controle glicêmico, também possuem efeitos hipolipemiante (redução de triglicerídeos e colesterol total), cardioprotetor, anti-obesidade e anti-inflamatória, desta forma além dos parâmetros de controle glicêmico, foram avaliados o perfil lipídico, renal e hepático dos animais (Tabela 8).

Tabela 8. Parâmetros bioquímicos séricos em ratos diabéticos induzidos por STZ de todos os grupos experimentais tratados

PARÂMETRO/ GRUPO	NG	HG	INS	INS + V ₁₀	INS + V ₃₀	V ₁₀	V ₃₀
MARCADORES PROTEICOS							
PT (g/L)	74±2	71±4	73 ± 2	73±3	72±2	72±02	71±4
Albumina (g/L)	29±3	27±2	31±1*	30±1	31±1*	29±1	28±2
MARCADORES LIPÍDICOS							
Col T (mmol/L)	1,3±0,1**	2,2±0,3	1,5±0,2**	1,5±0,3**	1,3±0,2**	2,2±0,2	2,3±0,6
Tg (mmol/L)	1,0±0,3**	4,5±2,0	2,3±0,8*	1,8±0,5*	2,6±0,8	4,4±2,1	3,0±1,7
HDL-C (mmol/L)	0,6±0,1**	1,0±0,1	0,7±0,1**	0,7±0,1**	0,6±0,1**	1,1±0,1	1,0±0,2
NHDL (mmol/L)	0,72±0,1*	1,18±0,3	0,79±0,1*	0,78±0,2*	0,72±0,1*	1,08±0,2	1,23±0,4
MARCADORES GLICÊMICOS							
1,5AG (µg/L)	121±40,8	66,4±18,3	64,6±17,7	58,5±14	53±11	126,7±61	75±30,4
MARCADORES DA FUNÇÃO PANCREÁTICA							
Amilase (µkat/L)	9,1±1,4*	4,4±0,3	7,5±1,1	7,5±0,9	9,4±0,6*	5,1±1,2	3,7±0,7
MARCADORES DA FUNÇÃO HEPÁTICA							
AST (µkat/L)	2,7±0,6	4,0±1,1	3,8±2,9	3,3±0,3	3±0,1	3,2±0,5	3,8±0,7
ALT (µkat/L)	1,1±0,1**	2,2±0,5	1,3±0,1**	1,4±0,1**	1,5±0,1*	1,8±0,2	2,1±0,7
MARCADORES DA FUNÇÃO RENAL							
Ureia (mmol/L)	5,7±0,9**	10±1,5	5,4±0,7**	5,4±0,7**	7±1,3**	11±1,8	8,6±1,1
AU (µmol/L)	71,3±10**	42,2±9,5	70,2±8,3*	72,5±18**	68,4±19*	47,6±6	48,7±12
Crea (µmol/L)	20,3±4,4*	14,1±3,5	18,6±1,8*	18,8±1,7*	19,4±3,5*	15±2,6	15±4,4

Os valores representam a média ± desvio padrão. * indica * p <0,05 quando comparado a ratos diabéticos tratados com veículo (HG). ** indica p <0,001; quando comparados a ratos diabéticos tratados com veículo (HG). ANOVA de uma via seguida de teste *post hoc* de Tukey.

Abreviações: PT, proteínas totais; 1,5AG, 1,5-anidroglicitol; Col T, colesterol total; TG, triglicerídeos; NHDL-C, não HDL-C; AU, Ácido úrico; Crea: creatinina.
Fonte: Autor (2022).

Visando obter dados complementares acerca dos parâmetros bioquímicos para melhor inferir sobre os resultados obtidos, foram realizadas análises estatísticas complementares, que estão disponíveis no Apêndice A.

De maneira geral, a administração de **V** não foi capaz de alterar, em comparação ao grupo diabético tratado com veículo (HG) dentro do período experimental, os parâmetros bioquímicos de marcadores de função renal, hepática e pancreática, demonstrando que o composto aparentemente não afetou a função renal, hepática ou pancreática.

Um estudo que avaliou dois complexos de vanádio(^{IV}), com semelhança estrutural ao composto **V**, identificou atividade mimética da insulina, com melhora das funções renais e hepáticas, bem como diminuição das complicações diabéticas e sem quaisquer efeitos colaterais (DIAB; HASSAN; EL-MEZAYEN, 2018). Em outro estudo em que foi avaliado a administração do vanádio a longo prazo em ratos (1 ano) administrado pela via oral não foram detectadas alterações hematológicas, hepáticas ou renais (BRICHARD; HENQUIN, 1995).

Extrapolando os marcadores avaliados nesse estudo, outro grupo de pesquisadores avaliou a administração de um complexo de dioxidovanádio(^V) a ratos com diabetes induzida por STZ e este foi capaz de diminuir significativamente a glicemia, além de culminar em efeitos cardioprotetores (MBATHA et al., 2021).

Dessa forma, o presente estudo identificou que o tratamento INS+**V**₃₀ foi o mais efetivo para controlar a glicemia nos animais diabéticos, sem que efeitos tóxicos pudessem ser observados nos parâmetros bioquímicos analisados. Porém, baseado em outros estudos, cabe ressaltar que a diversidade de compostos de vanádio e metodologias de estudo pode estar ligada aos variados resultados observados. O mecanismo molecular dos efeitos do vanádio no diabetes permanece incerto, visto que a atividade da insulina no nível celular é complexa e vários locais de ação do vanádio foram propostos para o potencial efeito semelhante (e/ou potencializador) à insulina.

A relação entre a insulina e compostos de vanádio pode ser útil no tratamento de DM, visto que tal mecanismo sinérgico é possível. Inclusive, um experimento conduzido por um grupo de pesquisadores em humanos demonstrou que a

administração de vanádio permitiu que pacientes diabéticos diminuíssem sua dosagem diária de insulina (GOLDFINE *et al.*, 1995) reforçando a perspectiva obtida na presente pesquisa, no qual o composto **V** foi promissor no tratamento dos animais diabéticos quando combinado à insulina.

Além disso, a ação do vanádio parece ir além da ação na glicemia. Uma pesquisa demonstrou que o diabetes pode alterar a expressão de 133 genes, sendo que o tratamento com sulfato de vanadil foi capaz de normalizar a expressão de 30% desses genes desregulados no diabetes (WILLSKY *et al.*, 2006).

Alguns autores afirmam que diferentes compostos de vanádio, além de serem capazes de controlar a glicemia e a homeostase da glicose em ratos com diabetes induzida por STZ, também possuem vantagens adicionais, como preservação da função secretora de células β pancreáticas e melhor armazenamento de insulina no pâncreas (IGLESIAS-GONZÁLEZ *et al.*, 2012).

5 CONCLUSÃO

Em conclusão, a administração de $([V^{IV}O(mal)(bpy)] \cdot H_2O)$ (**V**) melhorou, no estudo *in vitro*, a captação de 2-NBDG em células HepG2 em um efeito semelhante à insulina quando usada em concentrações abaixo do IC_{50} .

A administração isolada do composto **V** *in vivo*, nos ratos Wistar com diabetes induzido por STZ não foi capaz de alterar drasticamente a glicemia dos animais, independentemente da concentração utilizada. Entretanto, o efeito foi aumentado quando 30 mg/kg de peso corporal de **V** foi associado à insulina.

O papel protetor ou corretivo de $([V^{IV}O(mal)(bpy)] \cdot H_2O)$ nas alterações relacionadas ao DM, bem como o potencial da associação de INS+**V**₃₀, deve ser mais estudado tendo em vista a possível utilização de compostos de vanádio no tratamento de DM.

CAPÍTULO 2. POLIMORFISMOS NOS GENES ADIPONECTINA E RECEPTOR-1 DE SABOR MEMBRO 2 NO DIABETES TIPO 1 PRECOCE E TIPO 2

1 OBJETIVOS

1.1 Objetivo geral

Avaliar variações genéticas nos genes *ADIPOQ* e *TAS1R2* no Diabetes *mellitus* tipo 1 (DM1) de início precoce e Diabetes *mellitus* tipo 2 (DM2).

1.2 Objetivos específicos

- Determinar as frequências genotípicas e alélicas dos polimorfismos nos genes *ADIPOQ* (rs266729) e *TAS1R2* (rs35874116 e rs12033832) nos grupos diabéticos e respectivos controles;
- Avaliar associação entre as variantes genéticas e risco/proteção para o DM1 e DM2;
- Avaliar associação entre as variantes genéticas e os marcadores laboratoriais do perfil lipídico, controle glicêmico, e biomarcadores de processo inflamatório e estresse oxidativo.

2 OBESIDADE NO DIABETES

A prevalência de sobrepeso e obesidade infantil está aumentando globalmente. Sua prevalência mundial nas idades entre 5 e 19 anos aumentou dramaticamente de apenas 4% em 1975 para pouco mais de 18% (340 milhões de jovens) em 2016 (NOBLE *et al.*, 2010). Nos EUA, 19,3% das crianças e adolescentes sofrem de obesidade (TREVINO; DIAZ, 2020), enquanto em países da Europa a prevalência está entre 9 e 13%, com os países mediterrâneos tendo as taxas mais altas (NITTARI *et al.*, 2019). Dados atuais do Ministério da Saúde do Brasil demonstram que ao considerar todas as crianças brasileiras menores de 10 anos, estima-se que cerca de 6,4 milhões tenham excesso de peso e 3,1 milhões tenham obesidade. Entre os adolescentes brasileiros, a estimativa é ainda maior, com cerca de 11,0 milhões com excesso de peso e 4,1 milhões com obesidade (BRASIL, 2022).

Um aumento da prevalência de obesidade infantil tem impulsionado um aumento de problemas médicos como o DM2 em adolescentes (FAGOT-CAMPAGNA, 2000). Uma tendência semelhante foi observada em jovens com DM1 (LIPMAN *et al.*, 2013) e é provavelmente secundária a fatores como diminuição atividade física e sono e aumento do consumo de alimentos altamente calóricos, bem como uma ênfase excessiva na contagem de carboidratos e/ou estratégias agressivas com tratamento com insulina para atingir a euglicemia. A prevalência de sobrepeso e obesidade no início do DM1 aumentou três vezes ao longo de duas décadas (LIBMAN *et al.*, 2003). Surpreendentemente, o excesso de peso e obesidade são agora prevalentes entre os jovens com DM1, e um estudo demonstrou que jovens com DM1 são mais propensos a estar acima do peso do que seus pares sem a condição (LIU *et al.*, 2010).

A terapia intensiva com insulina, definida como múltiplas injeções diárias ou terapia com bomba de insulina juntamente com o monitoramento frequente da glicemia, tornou-se o procedimento padrão para o manejo do DM1 desde o *Diabetes Control and Complications Trial* (DCCT) (THE DIABETES CONTROL AND COMPLICATIONS TRIAL RESEARCH GROUP, 1996). Os estudos do DCCT, *Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications* (NATHAN; DIABETES CONTROL AND COMPLICATIONS TRIAL RESEARCH GROUP, 2014) e outros estudos, como o *Pittsburgh Epidemiology of Diabetes Complications* (EDC) (PAMBIANCO *et al.*, 2006), demonstraram redução da ocorrência de complicações como retinopatia proliferativa, nefropatia e doença cardiovascular em pacientes com

DM1 recebendo terapia intensiva com insulina. Apesar dos resultados benéficos no DCCT, os adultos que receberam terapia intensiva com insulina experimentaram uma taxa três vezes maior de hipoglicemia grave e ganharam em média 5 kg a mais do que os adultos recebendo terapia convencional (THE DIABETES CONTROL AND COMPLICATIONS TRIAL RESEARCH GROUP, 1996).

Ganho excessivo de peso relacionado a terapia intensiva com insulina pode potencialmente resultar em desfechos cardiovasculares adversos, evidenciado durante o acompanhamento dos pacientes no DCCT e EDIC, por sua associação com aumento da obesidade central, RI, dislipidemia, hipertensão, inflamação generalizada e aterosclerose (PURNELL *et al.*, 2013). Além disso, e talvez mais alarmante, em vários estudos de caso foram relatados que vários pacientes jovens com DM1 com sobrepeso e obesidade também desenvolveram DM2, ou “diabetes duplo”, em que estes jovens se tornaram resistentes à sua insulina exógena, sendo RI a marca registrada do DM2 (POZZILLI *et al.*, 2011). Tal cenário pode predispor os jovens a complicações cardiovasculares adicionais a longo prazo.

Considerando que o risco da DCV no DM2 tem sido associado de forma independente com obesidade, RI e características da síndrome metabólica (RAWSHANI *et al.*, 2017; BJORNSTAD *et al.*, 2018), essas associações foram menos claramente elucidadas no DM1.

Foi mostrado que um IMC mais alto prediz um perfil cardiovascular mais anormal entre adolescentes com DM1, que é semelhante, ou menos favorável, que em jovens com DM2 em várias métricas, como concentração de leptina e proteína C reativa ultra sensível (us-PCR) e hipertensão (TOMMERDAHL *et al.*, 2021).

Há muito se sabe que a obesidade contribui à fisiopatologia e complicações do DM2 (KAHN; HULL; UTZSCHNEIDER, 2006). Importante, diretrizes específicas enfatizam o manejo da obesidade em indivíduos com pré-diabetes e DM2 devido à forte evidência de que o tratamento da obesidade pode retardar o aparecimento do DM2 e melhorar o controle glicêmico (ADA, 2020).

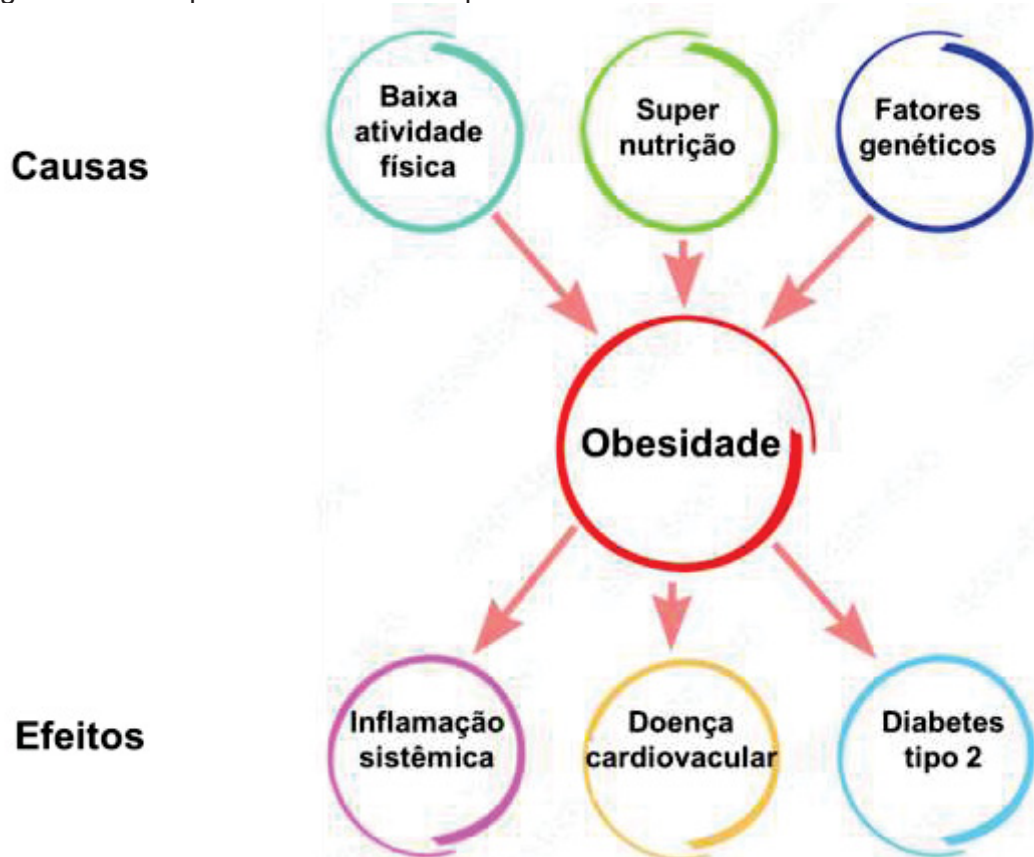
2.1 Causas da obesidade

A obesidade é designada por um aumento do IMC e por baixo grau de inflamação sistêmica (WHO, 2000). A obesidade é o agente causador de muitas

doenças como doenças cardiovasculares (principalmente doença e acidente vascular cerebral), que foram a principal causa de morte em 2012, RI e DM2 (Figura 16).

Indivíduos obesos, além das doenças mencionadas acima, estão mais propensos a desenvolver hipertensão, osteoartrite, síndrome metabólica, incontinência urinária, distúrbios musculares, doença pulmonar, síndrome do ovário policístico, infertilidade, certos tipos de câncer, apneia do sono, problemas psicológicos, preconceito e discriminação, e são mais propensos a sofrer uma morte precoce (DESAI; JELLYMAN; ROSS, 2015).

Figura 16. Principais causas e consequências da obesidade



Fonte: Adaptado de Gomez-Llorente e colaboradores (2017).

Fatores genéticos e de estilo de vida, principalmente supernutrição (excesso de ingestão de carboidratos e gorduras e baixa ingestão de vegetais, frutas e grãos integrais), e baixa atividade física são fatores importantes que contribuem para o aumento desta condição (MOZAFFARINA *et al.*, 2011).

Embora o início e a manutenção da obesidade estejam ligados a vários fatores, a predisposição genética desempenha um importante papel (CUI; LÓPEZ; RAHMOUNI, 2017). Um estudo realizado na última década sobre populações de

gêmeos descobriu que a genética contribui para o desenvolvimento da obesidade em 40%-70%, os estudos de associação de todo o genoma (GWAS) concentraram-se na identificação de variantes genéticas envolvidas no início da obesidade; no entanto, a influência que essas variantes em genes envolvidos na regulação da ingestão e metabolismo têm sobre comportamentos alimentares permanece menos explorado. Esse mecanismo poderia contribuir indiretamente para o desenvolvimento da obesidade (LLEWELLYN, 2018).

Embora fatores como genética, nutrição, estilo de vida sedentário e ambiente alimentar estejam envolvidos no desenvolvimento da obesidade, em estudos sobre avaliação do apetite e os mecanismos que o regulam destaca-se a importância dos processos fisiológicos, a expressão gênica dos hormônios envolvidos na regulação da ingestão e gasto de calorias, e sinalização de neurotransmissores no cérebro (CHAO *et al.*, 2017).

Como o peso corporal é amplamente determinado pela ingestão e gasto calórico, o prazer de consumir certos tipos de alimentos - alimentos ricos em gordura e açúcar geralmente onipresentes no ambiente - podem sobrepor os sinais homeostáticos de saciedade e promover o ganho de peso (FREITAS *et al.*, 2018). Dentre os fatores capazes de influenciar a ingestão alimentar os hábitos culturais, o acesso aos alimentos e as preferências pessoais podem ser citados. As preferências alimentares individuais decorrem dos fatores fisiológicos e nutricionais, bem como aspectos econômicos e socioculturais (GARCIA-BAILO *et al.*, 2009), além disso, já se sabe que também pode ser parcialmente determinada pela genética (PIOLTINE *et al.*, 2018).

A relação entre o consumo alimentar e o risco aumentado de desenvolvimento de DM, como DM2 e DMG, é evidenciado em pesquisas recentes, como em um estudo de coorte prospectivo com 20.060 participantes do projeto “SUN”, ou *Seguimiento Universidad de Navarra*, que encontrou que uma maior ingestão de alimentos ultraprocessados está associado a um maior risco de desenvolvimento de DM2 (LEVY *et al.*, 2021). O alto consumo de bebidas açucaradas também foi associado ao ganho de peso, risco de DM2 e, possivelmente, a desfechos de doenças cardiovasculares (NEELAKANTAN *et al.*, 2022).

No Brasil, o Ministério da Saúde recomenda por meio do Guia Alimentar para a população brasileira que seja priorizada a ingestão de alimentos *in natura* e minimamente processados, evitando o consumo de alimentos ultraprocessados, visto

que seu desbalanço no conteúdo nutricional favorece o risco de desenvolvimento de diabetes (BRASIL, 2014).

2.2 Genômica da obesidade

O desenvolvimento de sobrepeso ou obesidade é o resultado de coexistência complexa de determinantes e suas interações em diferentes níveis. Fatores genéticos que influenciam o desenvolvimento da obesidade têm sido consistentemente estudado nas últimas décadas (LOCKE *et al.*, 2015). Os progressos constantes nos estudos genéticos ampliou o número de variantes genéticas, polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs), associados ao IMC para 751 (YENGO *et al.*, 2018).

Previamente foi demonstrada a relação entre a obesidade e vias metabólicas em crianças (HUBÁČEK *et al.*, 2011) e adultos europeus (ZHOU *et al.*, 2012) com o gene *FTO*, conhecido por ser o primeiro gene da obesidade identificado pelo estudo amplo do genoma (*Genome Wide Association study* - GWAS). No entanto, esses SNPs explicam apenas 6% da variação no IMC. Recentemente, o uso de um escore de risco poligênico (*Polygenic Risk Score* - PRS) incorporando todas as informações de 2,1 milhões de SNPs, independentemente de sua significância em todo o genoma, aumentou a variação explicada pelo IMC para 23%, reforçando a ênfase de entender os mecanismos subjacentes pelos quais os SNPs relacionados à obesidade podem influenciar os parâmetros de composição corporal. O referido PRS proposto por Khera e colaboradores (2109) foi baseado no IMC adulto, mas também mostrou associações confiáveis em crianças (KHERA *et al.*, 2019).

De maneira geral, a maioria dos *loci* identificados pelos GWAS para os desfechos relacionados a obesidade foram identificados na população adulta. No entanto, a maioria destes mencionados *loci* também estão associados à obesidade em crianças e adolescentes, sugerindo que o perfil genético de obesidade permanece constante durante o curso de vida (BRADFIELD *et al.*, 2019). Curiosamente, um estudo mostrou que variantes genéticas relacionadas ao IMC em adultos foram mais significativamente associadas ao IMC de crianças durante a recuperação da adiposidade (por volta dos 5 anos), do que no pico de adiposidade (abaixo de 9 meses de idade), com variantes genéticas influenciando ligeiramente o IMC neste último grupo (ALVES *et al.*, 2019). Esses os achados reforçam a ideia do uso de PRS em adultos em crianças e adolescentes. No entanto, o uso de um PRS específico baseado

no IMC das crianças pode até aumentar o percentual de variação explicada. Assim, o desenvolvimento de PRSs e escores de risco genético (*Genetic Risk Scores* - GRS) em populações de idade precoce ajudaria a entender a expressão dos mecanismos de predisposição à obesidade durante a infância (SERAL-CORTES *et al.*, 2021).

2.3 Genética do controle da ingesta alimentar

As propriedades orossensoriais dos alimentos são percebidas através de uma combinação de sabor, textura e olfato. A hereditariedade do sabor está bem estabelecida em estudos de gêmeos e familiares, com estimativas de herdabilidade de 30% a 50% para prazer, consumo e desejos por alimentos doces (KESKITALO *et al.*, 2008). Os mecanismos centrais de detecção de nutrientes e qualidade dos alimentos apenas recentemente tornou-se objeto de estudos. A gordura fornece duas vezes mais calorias por grama quando comparado com proteína ou carboidrato. Está bem estabelecido que os alimentos palatáveis, ricos em gordura e refinados açúcares promovem porções maiores de refeição, menor saciedade pós-prandial, e maior ingestão calórica do que dietas ricas em carboidratos, mas com baixo teor de gordura (SALBE *et al.*, 2004).

Tradicionalmente, há perspectivas contrastantes sobre os mecanismos subjacentes à palatabilidade dos alimentos. A visão homeostática da palatabilidade sugere que a palatabilidade reflete a necessidade biológica subjacente dos nutrientes, enquanto a visão hedônica de palatabilidade sugere que certos alimentos envolvem o processamento de recompensas e, portanto, são palatáveis. Estudos em roedores sugeriram que vias neurais específicas, por exemplo, envolvendo o receptor de melanocortina-4 (Mc4r), desempenham um papel na preferência pela gordura da dieta e contra a sacarose da dieta (PANARO; CONE, 2013).

Até o momento, poucos estudos abordaram a preferência por nutrientes específicos em humanos, embora estudos com gêmeos tenham encontrado estimativas de herdabilidade de 53%-62% para a ingestão/preferência por alimentos com alto teor de gordura/sacarose. Há uma pesquisa considerável sendo realizada dentro indústria alimentícia com foco no desenvolvimento de alimentos que ofereçam algumas das propriedades sensoriais da gordura (miméticos da gordura), mas não possuam alto teor de gordura. O potencial de modificar os alimentos para benefícios da saúde é uma área de desenvolvimento considerável; tal trabalho vai precisar levar

em consideração uma compreensão da biologia fundamental que sustenta os aspectos do comportamento alimentar (SMITH *et al.*, 2016).

2.4 Polimorfismos em genes que afetam o consumo alimentar

Os hábitos alimentares e, conseqüentemente, o estado nutricional de um indivíduo possui relação direta com a percepção dos paladares doce, amargo, salgado, azedo e umami, pois estes desempenham um papel fundamental na determinação da preferência alimentar (GARCIA-BAILO *et al.*, 2009). As diferenças interindividuais nos limiares de detecção de sacarose são reconhecidas há muito tempo (BLAKESLEE; SALMON, 1935). Assim, entender os genes relacionados e as diferenças genéticas que possam influenciar a ingestão de alimentos pode trazer avanços no tratamento e na prevenção do DM, por isso, em 1974 Fuller deu início aos estudos sobre a genética da percepção dos sabores (FULLER, 1974).

A relação entre as alterações genéticas dos genes dos receptores de paladar e o DM é pautada no reconhecimento de que o sabor dos alimentos é um importante preditor na escolha e preferência alimentar e, conseqüentemente, para a formação dos hábitos alimentares (GALINDO *et al.*, 2012) e polimorfismos nos genes que codificam os receptores de sabor também podem explicar a variabilidade da preferência e consumo alimentar da população (RANKINEN; BOUCHARD, 2006).

A ação dos receptores de paladar na regulação hormonal é citada e além da leptina, peptídeo semelhante a glucagon 1 (GLP-1) e insulino-dependente de glicosepeptídeo trópico (GIP), o hormônio adiponectina também é importante por exercer uma infinidade de efeitos sistêmicos que incluem a promoção do gasto energético, sensibilidade à insulina e perda de apetite (KADOWAKI *et al.*, 2006).

A adiponectina desperta o interesse devido seu potencial papel como uma adipocina sensibilizadora da insulina e as robustas correlações negativas de suas concentrações circulantes com a RI e risco de DM2 e sua relação inversa com sobrepeso e obesidade. Assim, a RI associada à hipoadiponectinemia pode estar envolvida no aumento da ingestão alimentar (COOK; SEMPLE, 2010).

Estudos genéticos sobre o gene da adiponectina humana sugerem fortemente o papel da adiponectina como determinante da suscetibilidade à RI bem como seu envolvimento na patogênese do diabetes. Foram encontrados vários SNPs no gene

da adiponectina diretamente associados a diferentes tipos de diabetes, incluindo DM1, DM2 e DMG (HOWLADER *et al.*, 2021).

2.4.1 Receptores do sabor doce

O papel fisiológico do paladar é fornecer a capacidade de detectar os principais nutrientes, ainda antes da ingestão/deglutição, para evitar gosto amargo, moléculas potencialmente nocivas, como alcaloides vegetais. Entre as cinco modalidades básicas de sabor (doce, umami, amargo, salgado e azedo), o sabor doce é considerado o principal determinante da escolha alimentar. Um sabor doce indica a presença de carboidratos ricos em energia, como glicose, que aumenta o tom hedônico dos alimentos e influencia fortemente o nosso comportamento alimentar (LAFFITTE; NEIERS; BRIAND, 2014).

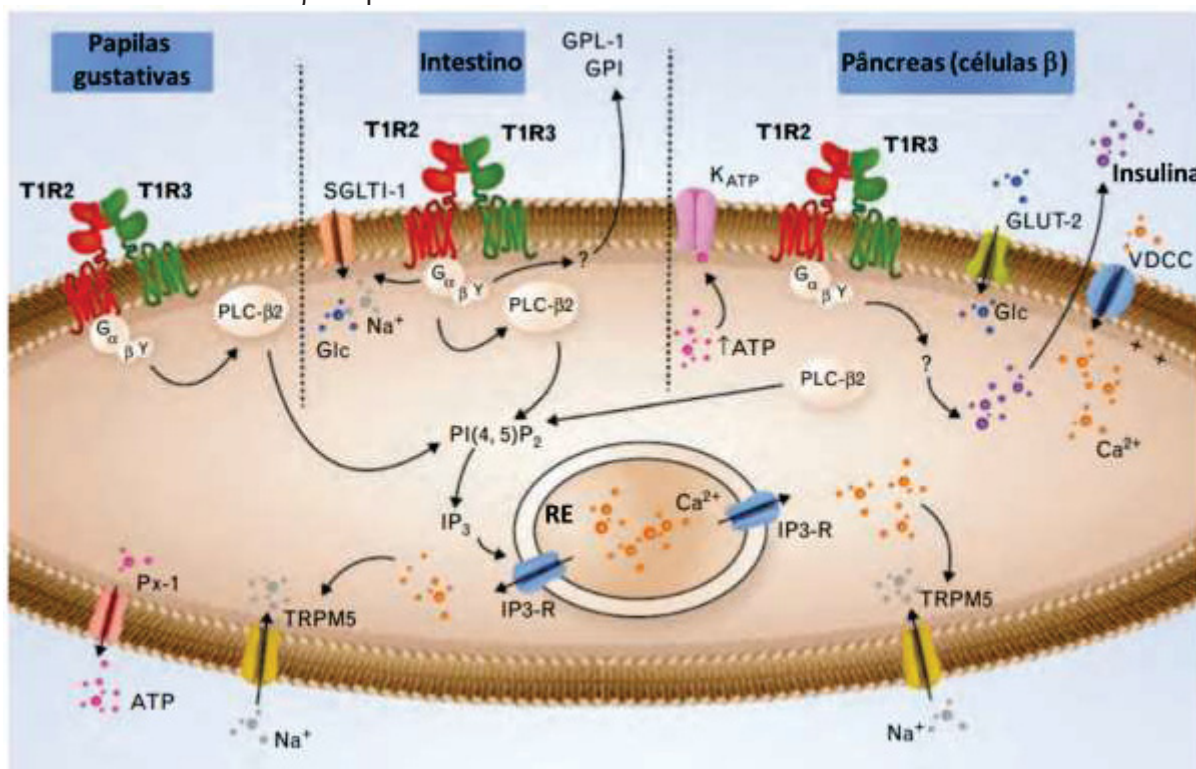
Uma grande descoberta ocorreu no início dos anos 2000, quando foi observado que a detecção do sabor doce é em grande parte mediada por um único receptor. Este receptor é composto por dois receptores acoplados à proteína G (*Protein-Coupled Receptors* - GPCRs): tipo 1, membro 2 (T1R2) e tipo 1, membro 3 (T1R3). O receptor de sabor doce T1R2/T1R3 responde a vários componentes, como açúcares naturais, adoçantes artificiais e naturais, alguns D-amino proteínas e proteínas de sabor doce (BEHRENS; MEYERHOF, 2011). Além disso, foi demonstrado que o T1R3 tem a capacidade de formar um homodímero T1R3/T1R3 que é sensível a monossacarídeos e dissacarídeos, mas apenas em altas concentrações (BEHRENS; MEYERHOF, 2011). Curiosamente, foi mostrado que a subunidade T1R3 ao complexar com receptor tipo 1, membro 1 (T1R1) forma o receptor heterodimérico umami (T1R1/T1R3), que é sensível a L-aminoácidos, como glutamato monossódico e aspartato. As subunidades T1R1, T1R2 e T1R3 são membros da pequena família de GPCRs classe C, os quais compartilham uma arquitetura comum, incluindo um grande domínio aminoterminal (*AminoTerminal Domain* - ATD). Este ATD contém um domínio armadilha de Vênus (*Venus FlyTrap* - VFT) e um curto domínio rico em cisteína, que conecta o ATD ao domínio transmembrana α -helicoidal característico das GPCRs (LAFFITTE; NEIERS; BRIAND, 2014).

Resumidamente, o receptor do paladar doce é um heterodímero de duas subunidades proteicas, a T1R2 (receptor de sabor, tipo 1, membro 2) e a T1R3

(receptor de sabor, tipo 1, membro 3), estes são codificados, respectivamente, pelos genes *TAS1R2* e *TAS1R3* localizados no cromossomo 1 humano (LIAO; SCHULTZ, 2003). Considera-se que o T1R2 é o componente específico para a percepção do paladar doce, pois o T1R3 também está envolvido na detecção de umami quando se dimeriza com T1R1 (TODA *et al.*, 2013).

Na cavidade oral, compostos doces (semelhantes a outros estímulos gustativos básicos) interagem com detectores de paladar expressos nas membranas apicais de células receptoras gustativas. Essas células gustativas são encontradas como agregados em estruturas em forma de cebola chamadas de botões gustativos. A ativação do receptor de sabor doce nas papilas gustativas por compostos doces induz uma cascata de transdução intracelular, levando à despolarização das células receptoras gustativas (Figura 17). Os principais eventos de transdução de sinal foram identificados. A ligação de compostos doces ao receptor T1R2/T1R3 resulta na dissociação da proteína G heterotrimérica (α -gustaducina, G β 3, e G γ 13), levando a um aumento da atividade da fosfolipase C- β 2 (PLC- β 2), que resulta na liberação de Ca²⁺ dos estoques intracelulares mediado pelo receptor de inositol 1,4,5-trifosfato (IP₃), o que promove a abertura de um canal iônico de potencial transitório, um canal catiônico do receptor de potencial transitório da subfamília M membro 5 (*Transient Receptor Potential cation channel subfamily M member 5* - TRPMP5) (IWATSUKI; UNEYAMA, 2012). Este mecanismo de transdução, comum à detecção de sabores doce, umami e amargo, leva à despolarização da membrana, gerando um potencial de ação e levando à liberação de adenosina trifosfato (ATP) como um transmissor para ativar fibras gustativas aferências (Figura 17).

Figura 17. Sinalização através dos T1R2/T1R3 nas células tipo II das papilas gustativas, no intestino e nas células β do pâncreas

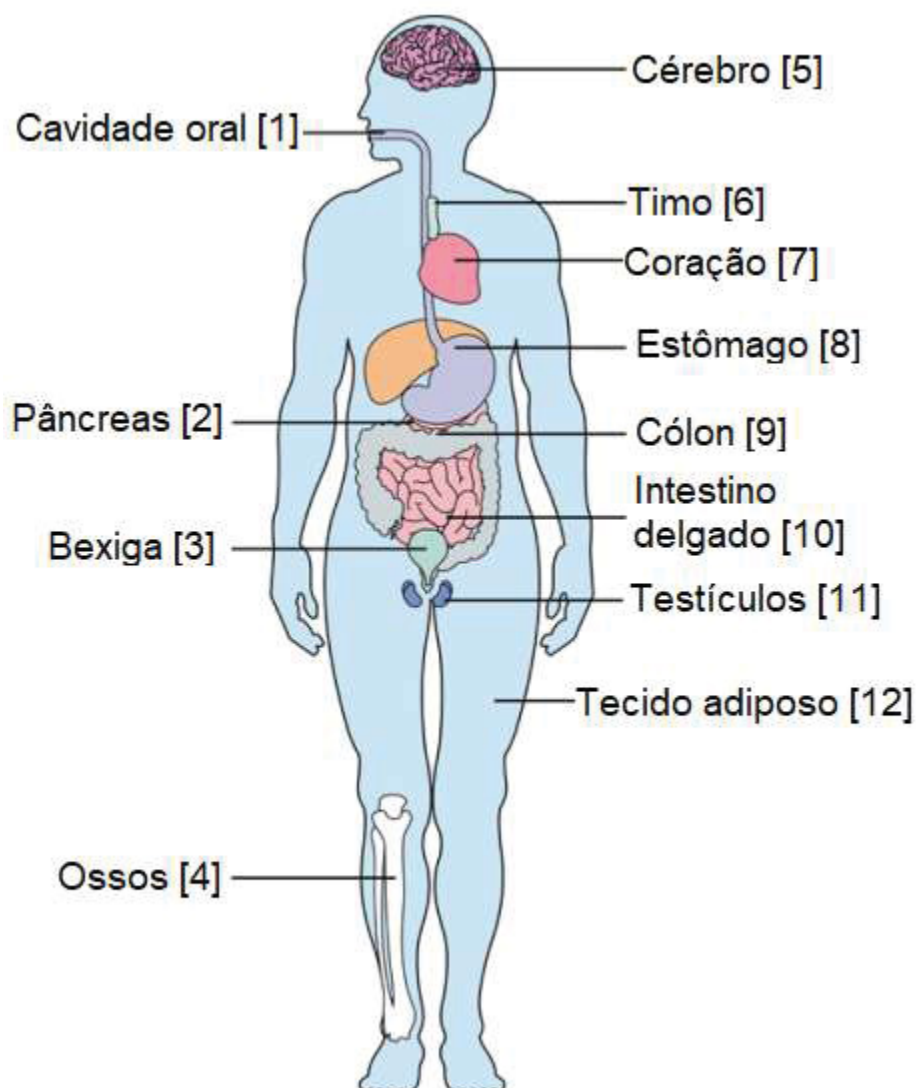


No papilas gustativas, o dímero dos receptores T1R2/T1R3 ativado interage com proteínas G heterotriméricas compreendendo α -gustaducina, $G_{\beta 3}$ e $G_{\gamma 13}$. Depois da dissociação das subunidades da proteína G, a subunidade $G_{\beta\gamma}$ interage com a fosfolipase C- $\beta 2$ ($PLC-\beta 2$), que por sua vez cliva o fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PIP_2) em inositol 1,4,5-trifosfato (IP_3), produzindo diacilglicerol (DAG). IP_3 estimula a liberação de Ca^{2+} do retículo endoplasmático (RE) via ativação do receptor IP_3 tipo III (IP_3-R). A elevação intracelular do Ca^{2+} ativa o canal $TRPM5$, levando à despolarização da membrana, que promove a abertura do canal de ATP Panexina-1 (Px-1) e liberação ATP, estimulando as fibras nervosas eferentes. No intestino, a via de transdução de sinal é semelhante ao descrito nas papilas gustativas. A estimulação da glicose (Glc) do receptor T1R2/T1R3 desencadeia a secreção de duas incretinas, $GLP-1$ e GIP , e aumenta a expressão do cotransportador sódio-glicose-1 ($SGLT-1$) para a membrana plasmática. Nas células β do pâncreas, a Glc é transportada pelo transportador de glicose-2 ($GLUT-2$). A glicólise leva a um aumento de ATP, levando ao fechamento do canal K_{ATP} , o que causa despolarização. Essa despolarização, por sua vez, ativa o canal de cálcio ($VDCC$), levando ao acúmulo de Ca^{2+} no citoplasma e à secreção de insulina. Foi proposto que o receptor T1R2/T1R3 está implicado na regulação da secreção de insulina. ATP, trifosfato de adenosina; GIP , peptídeo insulinotrópico dependente de glicose; $GLP-1$, peptídeo-1 semelhante a glucagon; $TRPM5$, canal catiônico potencial do receptor transitório da subfamília M membro 5.

Fonte: Adaptado de Laffitte, Neiers e Briand (2014).

A expressão dos receptores T1R2/T1R3 foi relatada em vários tecidos extragustativos como proposta de atuar na regulação de processos metabólicos (LAFFITTE; NEIERS; BRIAND, 2014). Os órgãos no qual a expressão foi relatada é ilustrada na Figura 18.

Figura 18. Expressão dos receptores T1R2/T1R3 em tecidos extragustativos



Referências indicadas em colchetes: [1] (BEHRENS; MEYERHOF, 2011), [2] (HENQUIN, 2012), [3] (ELLIOTT; KAPOOR; TINCCELLO, 2011) [4] (SIMON *et al.*, 2014) [5] (REN *et al.*, 2009) [6] (MAX *et al.*, 2001) [7] (FOSTER *et al.*, 2013) [8] (HASS; SCHWARZENBACHER; BREER, 2010) [9] (ROZENGURT *et al.*, 2006) [10] (DYER *et al.*, 2005) [11] (MOSINGER *et al.*, 2013) [12] (MASUBUCHI *et al.*, 2013).
 Fonte: Adaptado de: (LAFFITTE; NEIERS; BRIAND, 2014).

No estômago, por exemplo, o T1R3 é expresso nas células enteroendócrinas, que também são conhecidas por secretar hormônios, como a grelina, ou chamada popularmente como o hormônio da fome. Depois do aumento na concentração sanguínea de glicose ou aminoácidos, a liberação de grelina é suprimida. Isso ocorre pois T1R3 é expresso nas células produtoras de grelina no estômago, sendo proposto que T1R3 está envolvido no ajuste da liberação de grelina após a ingestão de glicose (HASS; SCHWARZENBACHER; BREER, 2010; JANSSEN *et al.*, 2011).

Os receptores T1R2 e T1R3 são expressos em todo o intestino delgado em células enteroendócrinas (Figura 17), que secretam dois hormônios da saciedade: GLP-1 e GIP (DYER *et al.*, 2005; JANG *et al.*, 2007). No duodeno, o nível de expressão do receptor de paladar doce é regulado pelas concentrações de glicose luminal e sistêmica, podendo estar desregulado em portadores de DM2. Todos esses dados sugerem que tanto o heterodímero do receptor de sabor doce quanto o α -gustaducina desempenham papéis-chave no intestino no processo de detecção de carboidratos (YOUNG *et al.*, 2013).

No pâncreas, as células β localizadas nas ilhotas de Langerhans estão envolvidas na regulação das concentrações plasmáticas de glicose através da secreção de insulina (Figura 17). Quando a concentração de glicose na corrente sanguínea aumenta, a quantidade de glicose transportada ativamente em células β também aumenta. A glicose é transportada por um transportador de glicose (GLUT) tipo 2; subsequentemente, a glicólise leva à produção de ATP. O aumento de ATP é então responsável pelo fechamento dos canais de K^+ sensível ao ATP, que gera um aumento intracelular de Ca^{2+} através da ativação de canais de cálcio voltagem dependente, levando à despolarização da membrana. Muitas linhas importantes de evidências suportam a existência de uma segunda via sinérgica para a regulação da liberação de insulina: todos os componentes necessários para a detecção de compostos de sabor doce, incluindo α -gustaducina, T1R2 e T1R3, estão presentes na superfície da célula β humana (HENQUIN, 2012); um aumento na liberação de insulina na presença de concentrações fisiológicas de glicose é induzido por estimulação com frutose ou adoçantes artificiais, como sacarina, ciclamato ou acesulfame de potássio (MALAISSE *et al.*, 1998); e a liberação de insulina induzida pela estimulação da frutose é rápida em comparação com a resposta esperada para a via metabólica, e nenhum efeito metabólico da frutose em células β foi relatada. O papel do receptor doce na regulação da insulina no pâncreas levanta a questão se o receptor do sabor doce tem mais extensos papéis na liberação de hormônios e regulação do metabolismo energético (LAFFITTE; NEIERS; BRIAND, 2014).

O tecido adiposo, composto principalmente de adipócitos, é importante para o armazenamento de lipídios, mas também é um importante “órgão” endócrino. T1R2 e T1R3 são funcionalmente expressos no tecido adiposo de camundongo, com expressão significativamente maior de T1R3 em comparação com T1R2; isso sugere

que uma alta porcentagem de T1R3 está presente como um homômero (MASUBUCHI *et al.*, 2013), provavelmente na forma homodimérica (MAITREPIERRE *et al.*, 2012). A estimulação de adipogênese e a supressão da lipólise é observada após a estimulação de adipócitos com sacarina e acessulfame de potássio. Interessantemente, esses efeitos ainda foram observados na ausência de T1R2 e T1R3, sugerindo a existência de um receptor adicional desconhecido para esses adoçantes (SIMON *et al.*, 2013).

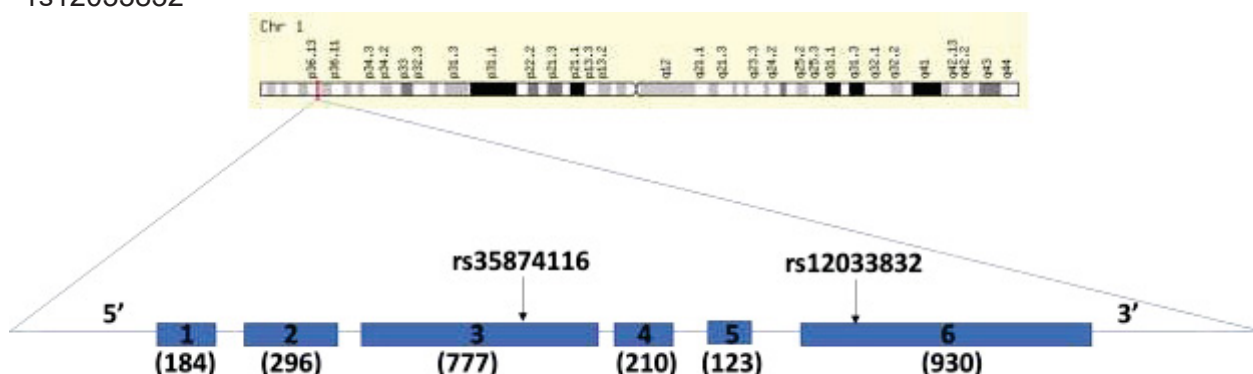
Dessa forma, considera-se que as proteínas da família envolvidas nos receptores de sabor estão associadas, tanto ao caráter hedônico, aceitação e comportamento alimentar, como também na resposta neuroendócrina no controle do balanço energético e metabolismo de nutrientes, além de alterações na glicemia e insulinemia (LAFFITTE; NEIERS; BRIAND, 2014).

2.4.1.1 Receptor T1R2

O gene *TAS1R2*, responsável pela codificação da proteína T1R2 (receptor do sabor doce), está localizado no cromossomo 1p36.13 e possui seis éxons (LI *et al.*, 2005) (Figura 17).

O gene *TAS1R2* é caracterizado por uma alta diversidade genética (KIM *et al.*, 2006; WANG *et al.*, 2020). As análises genéticas evolutivas (WOODING *et al.*, 2004) e os ensaios de atividade bioquímica (BUFE *et al.*, 2005) sugeriram que grande parte da variação da sequência de DNA resulta em funções alteradas do receptor. Acredita-se também que o *splicing* alternativo seja importante para a proteína sintetizada, afetando potencialmente quais éxons são usados no RNAm final (WAKSMONSKI; KOPPEL, 2016). Assim, a variação genética nos genes *TAS1R* pode afetar a sequência de aminoácidos das proteínas da subunidade T1R e consequentemente afetar a função do receptor (KIM *et al.*, 2006). Acredita-se que essa diversidade genética resulta de vantagem seletiva em vez de uma deriva genética neutra. Sua variação genética pode estar associada com maior sensibilidade ao determinado tipo de paladar e resultam em uma maior ingestão de alguns alimentos considerados mais palatáveis aos portadores do polimorfismo (MELO *et al.*, 2017).

Figura 17. Estrutura gênica do TAS1R2 e localização dos polimorfismos rs35874116 e rs12033832



Os éxons são representados em caixas (o tamanho em bp de cada éxon está entre parênteses) e os introns como linhas. Em destaque os polimorfismos avaliados neste estudo. Adaptado de Li e colaboradores (2005).

Portanto, por serem altamente polimórficos, e apesar da maioria dos polimorfismos desse gene não conferir mudanças funcionais às proteínas codificadas, a compreensão da relação entre as variantes não funcionais no gene e os fenótipos relacionados à alimentação é importante para identificar os marcadores de risco para doenças crônicas (CHOQUET; MEYRE, 2011), especialmente o DM, visto que outros autores, ao combinar abordagens genéticas humanas com triagem de polimorfismos relacionados ao sabor, identificaram uma ligação importante entre a função do receptor de sabor e a modulação da homeostase da glicose (DOTSON *et al.*, 2008).

A ADA afirma que a alimentação é importante na prevenção do DM, porém, as constantes demandas comportamentais na autogestão do DM relacionadas à ingestão alimentar dentro de determinados padrões estão relacionadas à progressão da doença. Além do controle diário da alimentação, diferentes comportamentos alimentares são observados, por exemplo, portadores de DM1, pela omissão da insulina que resulta em glicosúria, o comer desordenado é comumente relatado, enquanto no DM2 a compulsão alimentar é o relato mais frequente (ADA, 2020). Dessa forma, os receptores de paladar doce foram reconhecidos como um potencial novo alvo terapêutico para o tratamento da obesidade e de disfunções metabólicas relacionadas, como o DM (LAFFITTE; NEIERS; BRIAND, 2014).

Apesar de haver evidências de que variações genéticas no receptor TAS1R2 podem contribuir para diferenças interindividuais na ingestão alimentar (GARCIA-BAILO *et al.*, 2009), poucos estudos até o presente momento investigaram

especificamente a suposta associação entre os polimorfismos relacionados aos receptores gustativos e o DM.

Um estudo avaliando duas diferentes populações, relacionou a maior ingestão de açúcar ao polimorfismo rs35874116 no gene *TAS1R2* em indivíduos com sobrepeso e obesos, e ainda, ao consumo regular de açúcares em indivíduos saudáveis e diabéticos (ENY *et al.*, 2010). Dias e colaboradores relataram que outro polimorfismo nesse gene, o rs12033832, foi relacionado à ingestão de açúcar (DIAS *et al.*, 2015). Assim, os receptores gustativos podem afetar a homeostase da glicose por meio de um mecanismo gustativo, alterando as qualidades percebidas dos alimentos e impactando na preferência e ingestão alimentar (BUFE *et al.*, 2005).

O polimorfismo rs35874116 está localizado no éxon 3 (KIM *et al.*, 2006) e trata-se de um polimorfismo não sinônimo, que ocasiona a substituição de aminoácidos na posição 191, de uma isoleucina por uma valina, que se encontra em um potencial domínio de ligação ao ligante do receptor de paladar doce (ENY *et al.*, 2010). O significado funcional do polimorfismo rs35874116 ainda não é totalmente esclarecido e atualmente não há informações sobre este assunto no banco de dados PolyPhen (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph/data/>), mas sabe-se que essa variação está localizada no domínio extracelular, nas regiões de ligação do ligante do receptor de paladar doce (LIAO; SCHULTZ, 2003; KIM *et al.*, 2006). Eny e colaboradores levantaram a hipótese de que este polimorfismo pode não ser um polimorfismo causal, mas pode estar em desequilíbrio de ligação com um polimorfismo causal (ENY *et al.*, 2010).

O polimorfismo rs12033832, por sua vez, está localizado no éxon 6 do gene, decorre da substituição G>A/G>C e consiste em uma mutação sinônima, ou seja, não resulta em alterações nos aminoácidos. No entanto, já existem evidências de que essa variação silenciosa ocasiona alterações funcionais nas proteínas, que podem afetar a expressão gênica de *TAS1R2*.

No estudo realizado por Dias e colaboradores, foi observado que o rs12033832 foi capaz de afetar tanto o paladar doce quanto à ingestão alimentar de açúcar. Em indivíduos com IMC ≥ 25 kg/m², os portadores do alelo G tiveram maiores limiares de detecção de sacarose, classificações mais baixas de sensibilidade gustativa supraliminar e uma maior ingestão de açúcares totais (DIAS *et al.*, 2015). Han, Keast e Roura também identificaram que portadores do alelo G deste polimorfismo

consumiram mais carboidratos como porcentagem de energia ao se servirem em um *buffet* (HAN; KEAST; ROURA, 2017).

Essa complexa diversidade é notável ao revisar estudos que relatam resultados acerca da relação entre tais polimorfismos e o consumo alimentar. Uma associação entre o rs12033832 com maiores limiares de paladar de sacarose e ingestão de açúcar em indivíduos com excesso de peso foi documentada (DIAS *et al.*, 2015), e para o rs35874116, variações genéticas na subunidade receptora de sabor doce *TAS1R2* foram capazes de contribuir para variações interindividuais no consumo de açúcar em indivíduos canadenses (ENY *et al.*, 2010).

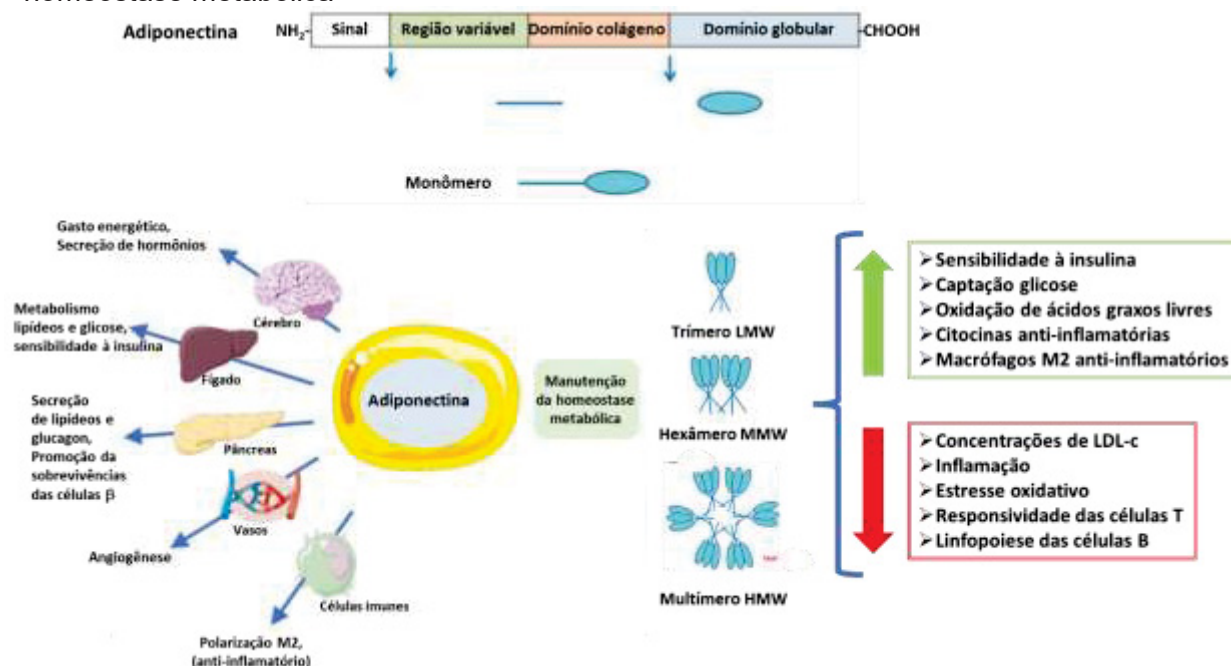
2.4.2 Adiponectina

A adiponectina, uma proteína de 30 kDa com 244 aminoácidos e é conhecida como AdipoQ (EISSA, 2016). Esta pertence à família das adipocinas, que são proteínas bioativas secretadas principalmente pelo tecido adiposo que agem localmente ou à distância para afetar todo o metabolismo corporal (LARA-CASTRO *et al.*, 2007). A proteína AdipoQ é composta por quatro domínios, incluindo peptídeo sinal N-terminal, região não homóloga (região variável), domínio colágeno e domínio globular C-terminal (SCHERER *et al.*, 1995). O domínio colágeno é composto por 22 repetições Gly-X-Pro/Gly-X-X, e o domínio esférico C-terminal é semelhante à estrutura do componente complemento 1 q (C1q) e do colágeno tipo VIII/tipo X. O monômero de adiponectina existe principalmente na forma de adiponectina de comprimento total e adiponectina globular, que foi clivada da adiponectina de comprimento total pela esterase de leucócitos (FRUEBIS *et al.*, 2001) (Figura 20).

A adiponectina circula em múltiplas formas no plasma (PAJVANI *et al.*, 2003). Dentro dos adipócitos, esses complexos são capazes de se ligar a outros para formar multímeros de peso molecular médio (*Middle Molecular Weight* – MMW) e alto peso molecular de peso (*High Molecular Weight*- HMW). A unidade básica de oligomerização é o trímero, também chamado de adiponectina de baixo peso molecular (*Low Molecular Weight* – LMW), o monômero de adiponectina forma um dímero por ligação dissulfeto com outro monômero, que polimeriza com um terceiro monômero para formar adiponectina LMW. Dois homotrímeros formam adiponectina MMW por uma ligação dissulfeto. Os hexâmeros são ligados por ligações não covalentes para formar adiponectina HMW. A formação do complexo de polimerização

da adiponectina é regulada por hidroxilação e glicosilação de resíduos de lisina no domínio colágeno (WANG *et al.*, 2008) (Figura 20). A isoforma HMW foi proposta para ter uma forte associação com a RI, síndrome metabólica e doenças cardiovasculares. Assim, foi proposto que HMW é a isoforma mais biologicamente ativa da adiponectina em relação à ação da insulina (PAJVANI *et al.*, 2004; LIU; LIU, 2009).

Figura 20. Estrutura da adiponectina e principais mecanismos de ação na manutenção da homeostase metabólica



Uma adiponectina de comprimento total (~30 kDa) consiste em um domínio globular, um domínio colágeno, um domínio específico da espécie (região variável) e um peptídeo sinal. A oligomerização facilita a formação de o trímero (LMW), hexâmetro (MMW) e adiponectina de alto peso molecular (HMW). A adiponectina completa (monômero) pode sofrer clivagem proteolítica, cujo fragmento proteolítico corresponde à adiponectina globular. A adiponectina é uma adipocina anti-inflamatória secretada principalmente pelos adipócitos para a circulação, onde afeta muitas funções biológicas, como sensibilidade à insulina e metabolismo de lipídeos e glicose.

Abreviações: LMW, baixo peso molecular; MMW, peso molecular médio; HMW, alta peso molecular; LDL-c, colesterol da lipoproteína de baixa densidade.

Adaptado de: Kim e colaboradores (2020); Polito e colaboradores (2020); Tang e colaboradores (2021).

A concentração circulante de adiponectina é afetada por vários fatores, como o gênero. De fato, está bem estabelecido que as mulheres apresentam maior concentração plasmática de adiponectina do que os homens (ANDREASSON *et al.*, 2012). Além disso, a concentração plasmática de adiponectina é inversamente correlacionada com o IMC, mas este parâmetro global não é suficiente para refletir a capacidade de os diferentes depósitos de tecido adiposo para produzir adiponectina, o qual varia enormemente dependo da sua localização anatômica: o tecido adiposo

visceral produz menos adiponectina do que o tecido adiposo subcutâneo (TURER *et al.*, 2011). Por fim, o tamanho de adipócitos no tecido adiposo também é um importante preditor da expressão da adiponectina: hipertrofia dos adipócitos levando à gênese de grandes adipócitos está associada a concentrações plasmáticas mais baixas de adiponectina (MICHAUD *et al.*, 2014). Tem sido sugerido que alguns fatores dietéticos, como proteína de soja (NAGASAWA *et al.*, 2002), óleos de peixe (FLACHS *et al.*, 2006) e ácido linoleico (NAGAO *et al.*, 2003), aumentam as concentrações plasmáticas de adiponectina. Por outro lado, uma dieta rica em carboidratos parece diminuir as concentrações plasmáticas de adiponectina (PISCHON *et al.*, 2005). Em estudos humanos, a proporção e o tipo de carboidrato ingeridos estão relacionados com a concentração de adiponectina (SONG *et al.*, 2016; ZHANG; JIAO; KONG, 2017; SHIH *et al.*, 2021). Também tem sido sugerido que o estresse oxidativo inibe a expressão de adiponectina (FURUKAWA *et al.*, 2004).

A adiponectina é conhecida por estar envolvida em diversas atividades metabólicas, incluindo o metabolismo de lipídios e oxidação de ácidos graxos (YAMAUCHI *et al.*, 2002b; YOON *et al.*, 2006; CHOI *et al.*, 2018; PANDEY *et al.*, 2019), regulação da glicemia (YAMAUCHI *et al.*, 2002a) e sensibilidade à insulina (BERG *et al.*, 2001; YAMAUCHI *et al.*, 2001; MAEDA *et al.*, 2002; AWAZAWA *et al.*, 2011), bem como atividade anti-inflamatória (VILLARREAL-MOLINA; ANTUNA-PUENTE, 2012), angiogênese (OUCHI *et al.*, 2004), imunidade (POLITO *et al.*, 2019) e na regulação da ingestão de alimentos e gasto de energia (SELKOE; HARDY, 2016) (Figura 20).

A adiponectina exerce essas várias funções biológicas através da ligação aos receptores de adiponectina (Figura 19). Vários receptores de adiponectina foram identificados, incluindo o receptor de adiponectina 1 (AdipoR1), receptor de adiponectina 2 (AdipoR2), T-caderina (caderina 13, cdh13) e Calreticulina (CRT). A estrutura dos receptores AdipoR1 e AdipoR2 contém 7 domínios transmembrana com o N terminal intracelular e o C terminal extracelular, o que contrasta com os receptores acoplados à proteína G. A estrutura cristalina de AdipoR1 e AdipoR2 possuem grandes lacunas e 7 sítios de ligação ao zinco dentro dos domínios transmembrana (YAMAUCHI, T. *et al.*, 2003). Em mamíferos, AdipoR1 é expresso principalmente no músculo, enquanto AdipoR2 é altamente expresso no fígado (WANG *et al.*, 2018). Além disso, AdipoR1 e AdipoR2 foram expressos no cérebro, como no hipotálamo, tronco cerebral e córtex cerebral, tanto em humanos como em roedores. No

hipotálamo, AdipoR1 e AdipoR2 são expressos pelos neurônios que expressam pró-ópio-melanocortina (*ProOpioMelanoCortin* - POMC) e o neuropeptídeo Y (NPY), que desempenham papéis críticos na regulação do comportamento alimentar (GUILLIOD-MAXIMIN *et al.*, 2008).

Como membro da família das caderinas, a T-caderina é uma glicoproteína da superfície celular com glicosilfosfatidilinositol (*Glycosyl Phosphatidylinositol* - GPI) ancorado e não possui os domínios de sinalização citoplasmático e transmembrana (HUG *et al.*, 2004). A T-caderina é altamente expressa principalmente em células endoteliais e células musculares lisas de mamíferos, já sendo comprovado que a T-caderina, principalmente expressa no coração, músculo e aorta de camundongos, desempenha papéis importantes no acúmulo de adiponectina nos tecidos (DENZEL *et al.*, 2010).

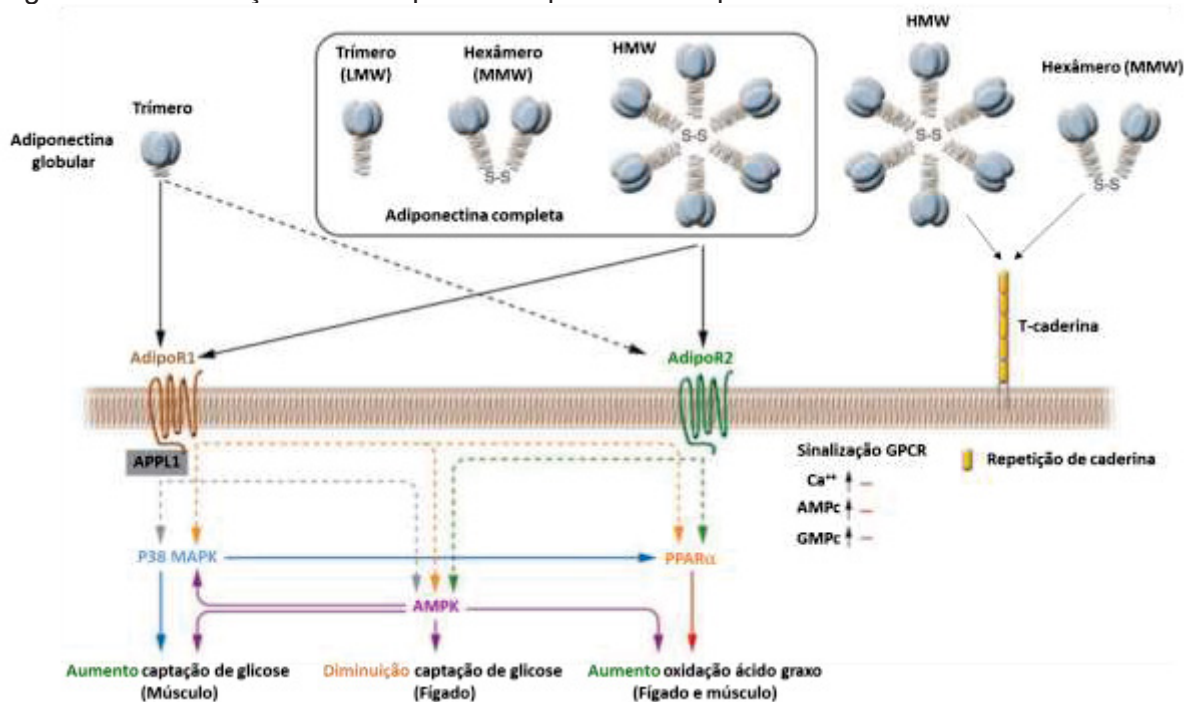
Além disso, a T-caderina é expressa por projeções de neurônios de dentro dos bulbos olfatórios principais e acessórios em camundongos (AKINS; BENSON; GREER, 2007) e no cérebro de humanos adultos, incluindo córtex cerebral, medula, tálamo e mesencéfalo. O preciso mecanismo pelo qual a T-caderina influencia a sinalização intracelular não é claro, mas foi sugerido que este receptor pode requerer interação com proteínas transmembrana para algumas ações fisiológicas (PARKER-DUFFEN *et al.*, 2014). A análise de imunofluorescência mostrou que a T-caderina foi co-localizada com a fosfolipase C $\beta 2$ em células receptoras gustativas tipo 2 em camundongos (CROSSON *et al.*, 2019). Não está clara se T-caderina medeia a função da adiponectina no sistema nervoso central.

A calreticulina é uma chaperona luminal tamponante de Ca^{2+} do retículo endoplasmático (RE) (MICHALAK *et al.*, 2009). A calreticulina é expressa principalmente tanto no fagócito quanto na superfície de célula apoptótica e está envolvida na captação de células apoptóticas mediada por adiponectina. Em macrófagos humanos e células THP-1, a administração de anticorpo anti-calreticulina ou de pequeno RNA interferência (siRNA) bloqueia significativamente a fagocitose estimulada por adiponectina, que não foi observada durante o tratamento com siRNA de AdipoR1, AdipoR2 ou T-caderina (TAKEMURA *et al.*, 2007).

A afinidade dos receptores de adiponectina para diferentes formas de adiponectina varia em diferentes tecidos. AdipoR1 tem alta afinidade por adiponectina globular, mas baixa afinidade por adiponectina de comprimento total no músculo esquelético, e AdipoR2 tem afinidade moderada por adiponectina de comprimento

total e adiponectina globular no fígado (HUG *et al.*, 2004). A T-caderina funciona como um receptor para HMW e MMW, mas não para adiponectina globular ou LMW (CLARK; TAYLOR; ZAHRAKKA, 2017) (Figura 21).

Figura 21. Transdução de sinal pelos receptores da adiponectina



A adiponectina globular existe como um trimer, enquanto a adiponectina de comprimento total existe como pelo menos 3 espécies de multímeros: um trimer (LMW), um hexâmero (MMW) e um multímero HMW. A supressão de AdipoR1 por RNAi reduz marcadamente adiponectina, enquanto a supressão de AdipoR2 por RNAi reduz amplamente a ligação específica da adiponectina de comprimento total. A linha pontilhada entre AdipoR2 e adiponectina globular reflete que AdipoR2 é um receptor de afinidade relativamente baixa para adiponectina globular. AdipoR1 e AdipoR2 não parecem estar acoplados às proteínas G, uma vez que a superexpressão de AdipoR1/R2 tem pouco efeito sobre AMPc, GMPc e níveis de Ca²⁺ intracelular, mas, em vez disso, esses receptores ativam conjuntos exclusivos de moléculas de sinalização, como PPARα, AMPK e p38 MAPK. Em miócitos C2C12 que superexpressam AdipoR1/R2, a adiponectina estimula a ativação de PPARα, AMPK e p38 MAPK, captação de glicose e oxidação de ácidos graxos. A supressão de AMPK ou PPARα reduz parcialmente a oxidação de ácidos graxos estimulada por adiponectina e a supressão de AMPK ou p38 MAPK parcialmente reduz a captação de glicose estimulada por adiponectina. Em hepatócitos que superexpressam AdipoR1/R2, a adiponectina estimula a oxidação de PPARα ou AMPK e de ácidos graxos (YAMAUCHI *et al.*, 2003). A supressão de AMPK ou PPARα nestes hepatócitos reduz parcialmente a oxidação de ácidos graxos estimulada por adiponectina. Além disso, o tratamento com adiponectina reduz a concentração de glicose no plasma e as moléculas envolvidas na gliconeogênese no fígado e AMPK dominante-negativo reduz parcialmente esses efeitos. Esses dados suportam a conclusão de que AdipoR1 e AdipoR2 servem como receptores para adiponectina globular e de comprimento total e medeiam o aumento de AMPK, atividades dos ligantes de PPARα, p38 MAPK e funções biológicas induzidas por adiponectina. A T-caderina é capaz de se ligar à adiponectina, mas acredita-se que não tenha efeito sobre a sinalização celular da adiponectina, uma vez que a T-caderina não possui um domínio intracelular (HUG *et al.*, 2004). Interação de APPL1 com AdipoR1 parece desempenhar papéis importantes na sinalização de adiponectina e eventos a jusante mediados por adiponectina, como oxidação lipídica e captação de glicose (MAO *et al.*, 2006). LMW, baixo peso molecular; MMW, peso molecular médio; HMW, peso molecular alto; RNAi, RNA de interferência; GPCRs, receptores acoplados a proteína G; APPL1, proteína adaptadora contendo domínio de homologia da plestrina, domínio de ligação de fosfotirosina

e motivo zíper de leucina 1 – do inglês *Adaptor Protein containing Pleckstrin homology domain, Phosphotyrosine-binding domain, and Leucine zipper motif 1*; S-S, ligação dissulfeto.
 Fonte: Adaptado de Kaowaki e colaboradores (2006) e Tang e colaboradores (2021)

A proteína adiponectina acumula-se em vários tecidos, como coração e músculo através da ligação com T-caderina (CLARK; TAYLOR; ZAHRAKKA, 2017). Foi relatado que a superexpressão de adiponectina aumentou a regeneração do músculo em camundongos, mas não foi observada em camundongos T-caderina nulos (TANAKA *et al.*, 2019). Em miotubos C2C12 diferenciados, o acúmulo de adiponectina foi suprimido quando a T-caderina foi eliminada. Recentemente, foi demonstrado que a proteína adiponectina nativa purificada a partir de soro de camundongo e células HEK293 se liga a células que expressam T-caderina (KITA *et al.*, 2019).

Até o momento, muitos estudos mostraram que AdipoR1 e AdipoR2 podem mediar adiponectina para desempenhar uma variedade de papéis biológicos. A adiponectina pode ativar diretamente a proteína quinase ativada por monofosfato de adenosina (*Adenosine Monophosphate-activated Protein Kinase* – AMPK) via AdipoR1. A proteína adaptadora contendo domínio de homologia da plecstrina, domínio de ligação de fosfotirosina e motivo zíper de leucina 1 (*Adaptor Protein, Phosphotyrosine Interacting With PH Domain And Leucine Zipper 1* - APPL1) se liga aos domínios intracelulares de AdipoR1 ou AdipoR2. APPL1 liga-se à proteína fosfatase 2A (*Protein Phosphatase 2A* - PP2A) e à proteína quinase C (*Protein Kinase C* - PKC), ativando a PP2A e inativando a PKC. A inativação de PKC resulta na desfosforilação da proteína quinase hepática B1 (*Liver kinase B1* - LKB1), permitindo que esta transloque do núcleo para o citoplasma e ative a AMPK. A adiponectina induz o influxo de Ca^{2+} extracelular necessário para a ativação da proteína quinase β dependente de Ca^{2+} /calmodulina (*Calcium/calmodulin-dependent protein Kinase Kinase β* - CaMKK β) via AdipoR1, ativando assim a AMPK. A adiponectina também promove a ativação do PPAR- α via AdipoR2, levando ao aumento da sensibilidade à insulina (ZHA; WU; GAO, 2017). Portanto, a adiponectina ativa AMPK e PPAR- α , via receptores AdipoR1/2, para regulação do metabolismo de glicose e lipídios, oxidação de ácidos graxos e sensibilidade à insulina (RUAN; DONG, 2016). Fisiologicamente, a adiponectina demonstrou estimular a ingestão de alimentos pela ativação da AMPK, no hipotálamo, aqueado por meio de seu receptor AdipoR1 ou ativação da via pelo receptor AdipoR2 (WAKAI *et al.*, 2013). Os estudos funcionais da T-caderina

concentram-se principalmente na aterosclerose, e outras funções biológicas da T-caderina continuam a ser exploradas (DENZEL *et al.*, 2010; FUJISHIMA *et al.*, 2017).

2.4.2.1 Adiponectina e o DM

Em geral, a concentração sérica de adiponectina se correlaciona com a sensibilidade aumentada à insulina e a função melhorada das células β das ilhotas (BERG *et al.*, 2001; YAMAUCHI *et al.*, 2001; ABBASI *et al.*, 2004; XIA *et al.*, 2015). Alguns estudos em humanos associaram hipoadiponectinemia com disfunção das células β (BACHA *et al.*, 2004; MUSSO *et al.*, 2005; RETNAKARAN *et al.*, 2005). Por outro lado, baixas concentrações de adiponectina estão associadas ao desenvolvimento da obesidade, síndrome metabólica e DM2 (GALE; CASTRACANE; MANTZOROS, 2004; MATSUZAWA *et al.*, 2004; WANG *et al.*, 2018) e elevadas no DM1 (FRYSTYK *et al.*, 2005; BJORNSTAD; CHERNEY; MAAHS, 2014).

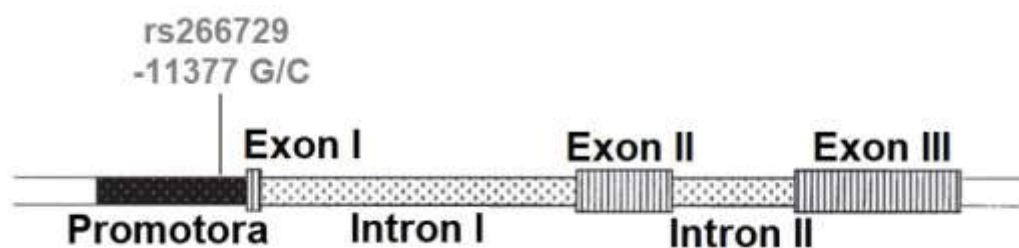
Assim como o fígado é sensível à sobrecarga lipídica, as células β pancreáticas são suscetíveis aos efeitos lipotóxicos da supernutrição (RAKATZI *et al.*, 2004; HOLLAND *et al.*, 2011; PARK *et al.*, 2011). Foi demonstrado que a adiponectina é capaz de proteger a célula β contra esta toxicidade (RAKATZI *et al.*, 2004; HOLLAND *et al.*, 2011; PARK *et al.*, 2011). De fato, a adiponectina previne a obesidade e a diminuição na massa de células β no DM1 (KIM *et al.*, 2007; HOLLAND *et al.*, 2011) e previne a atenuação da secreção de insulina em células β desafiadas com sobrecarga lipídica (RAKATZI *et al.*, 2004). Já o impacto da sinalização da adiponectina na célula α ainda não foi explorado. Dadas as ações de sensibilização da insulina da adiponectina em vários tipos de células, juntamente com sua proteção nas células β , seu papel nas células α fornece um alvo potencial para tratar a hiperglicemia associada ao DM1 e DM2 (STERN; RUTKOWSKI; SCHERER, 2016).

Polimorfismos em todo o gene ou nas proximidades foram recentemente relacionados com concentrações circulantes de adiponectina em GWASs (LING *et al.*, 2009) ou em estudos de genotipagem de polimorfismos (SIITONEN *et al.*, 2011). Vários estudos em humanos associaram um aumento da prevalência de diabetes com polimorfismos no gene que codifica adiponectina que levam à diminuição das concentrações de adiponectina (HARA *et al.*, 2002; STUMVOLL *et al.*, 2002).

Mutações e polimorfismos no gene *ADIPOQ* humano correlacionam-se fortemente com a obesidade e o desenvolvimento de DM2, mas já foi relatado também que existe uma associação inversa paradoxal entre adiponectina e risco de complicações em DM1 e DM2 (PRIOR *et al.*, 2009). Embora o diabetes seja uma doença multifatorial, polimorfismos no gene da adiponectina mostraram correlação significativa com todas as formas da doença, ou seja, DM1, DM2 e DMG (HOWLADER *et al.*, 2021). Também foi mostrado associação entre um polimorfismo localizado no íntron 1 do gene *ADIPOQ* com o aumento no consumo de produtos de confeitaria na população japonesa (WAKAI *et al.*, 2013).

O gene *ADIPOQ* abrange 17 kilobases (kb), contém três éxons e dois íntrons, e sua tradução começa no éxon 2 e termina no éxon 3 (SIITONEN *et al.*, 2011) e está localizado na região 3q27 do cromossomo (EISSA, 2016). Dentre os polimorfismos relatados no gene *ADIPOQ* está o rs266729, uma variante alélica que demonstrou estar relacionada ao DM2 quando acompanhada de obesidade, estando associada a baixas concentrações plasmáticas de adiponectina (WANG, X. *et al.*, 2009). O polimorfismo rs266729 decorre da substituição de uma citosina por uma guanina (ou seja, C > G) na região promotora proximal, mais especificamente na posição nucleotídica -11377 do gene *ADIPOQ* (HSIAO; LIN, 2016) (Figura 22).

Figura 22. Localização do polimorfismo rs266729 no gene *ADIPOQ*



A região promotora está representada em caixa preta com pontinhos branco, os éxons em caixas com linhas verticais e os íntrons em caixas brancas com pontinhos cinza. O polimorfismo rs266729 está localizado na posição -11377 na região promotora.

Fonte: Adaptado de Hsiao e Lin (2016).

Esta variante sobrepõe um dos sítios de ligação do fator de transcrição Sp1 resultando em menor atividade de transcrição na presença do alelo menos frequente G (LAUMEN *et al.*, 2008; SRINIVASAN *et al.*, 2017). Portanto, é possível que os portadores do alelo rs266729 G apresentem concentrações menores de adiponectina, afetando a produção da molécula.

O alelo G do polimorfismo rs266729 *ADIPOQ* parece ser importante nas associações com o risco de DM2 em várias populações (PRIOR *et al.*, 2009). Na China, especialmente na população obesa, foi observado que o rs266729 apresenta forte correlação com o DM2 (LI *et al.*, 2013).

Considerando todas as informações relatadas até aqui, o objetivo deste trabalho foi avaliar a relação de polimorfismos nos genes que codificam para o receptor T1R2 e adiponectina (Figura 183).

Figura 18. Visão geral dos fatores associados às condições de obesidade



Principais mecanismos de ação da adiponectina na manutenção da homeostase metabólica e interação entre obesidade, paladar e ingestão de alimentos. Indivíduos com obesidade exibem aumento da inflamação e observam um aumento na mortalidade por todas as causas e doenças associadas. Aumento da inflamação em pacientes com obesidade pode levar a uma alteração do paladar, que em por sua vez pode promover o aumento da ingestão calórica, a partir de alimentos ricos em açúcar e gordura. Hipo adiponectinemia, causada por interações de fatores genéticos como SNPs no gene *ADIPOQ* e os fatores ambientais que causam a obesidade parecem desempenhar um importante papel causal na RI, DM2 e síndrome metabólica, que estão ligadas à obesidade (KADOWAKI *et al.*, 2006). A modificação do estilo de vida incluindo perda de peso, controle da dieta e exercício físicos, pode resultar em aumento das concentrações plasmáticas de adiponectina (HAN *et al.*, 2007). A proporção e o tipo de carboidrato ingeridos estão relacionados com a concentração de adiponectina (SÁNCHEZ; MIGUEL; ALEIXANDRE, 2012; REZVANI *et al.*, 2013; MAGALHÃES *et al.*, 2014; ALESSA *et al.*, 2016; SONG, XIAOLING *et al.*, 2016; ZHANG; JIAO; KONG, 2017; SHIH *et al.*, 2021). O jejum desencadeia aumento da adiponectina no líquido cefalorraquidiano (LCR) e ativação da AMPK no cérebro, que aumenta o neuropeptídeo Y e induz a alimentação. A alimentação reduz a adiponectina e diminui o apetite. Na obesidade, a capacidade de diminuir a adiponectina em resposta à alimentação é suprimida, impedindo o desligamento do apetite (STEINBERG; KEMP, 2007).

Abreviações: SM: síndrome metabólica; DM2: Diabetes *mellitus* tipo 2; RI: resistência à insulina; SNPs: polimorfismos de nucleotídeos únicos; AMPK: proteína quinase ativada por adenosina monofosfato, do inglês *Adenosine monophosphate-activated protein kinase*.

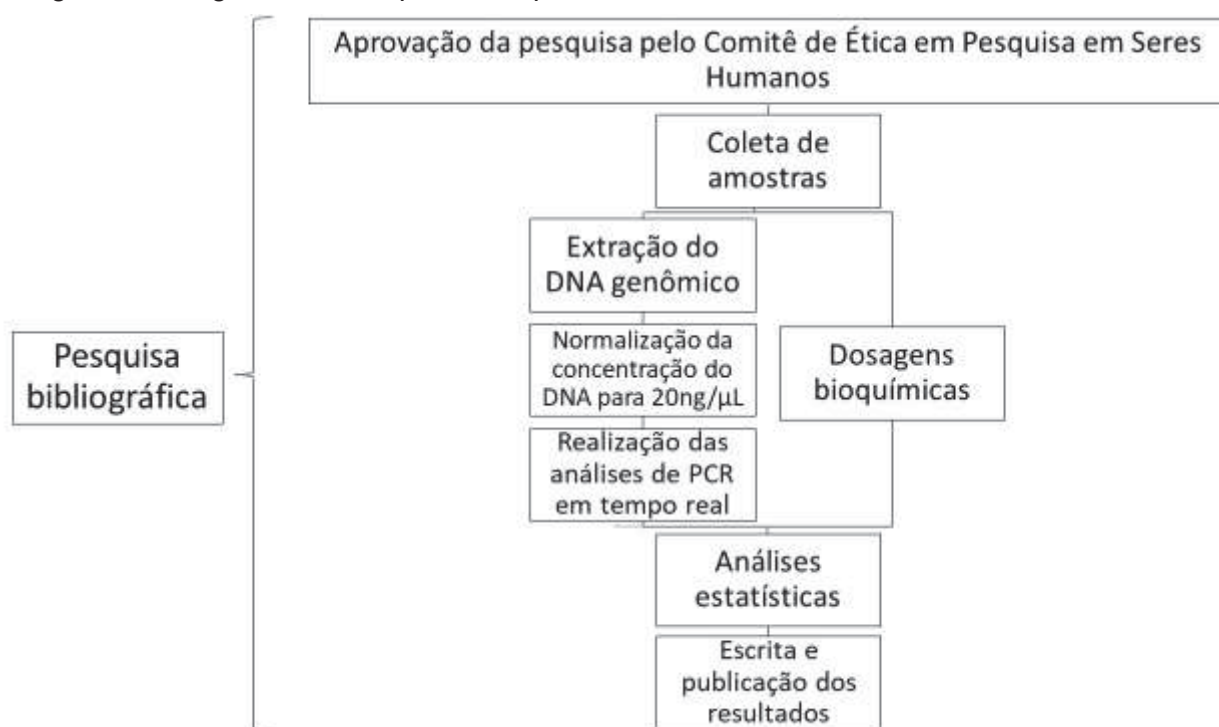
Adaptado de Kadowaki e colaboradores (2006); Kim e colaboradores (2020) e Harnischfeger e Dando (2021).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

A presente pesquisa é um estudo tipo caso-controle, no qual a amostra em estudo foi dividida em dois grandes grupos (DM1 de início precoce e DM2). O projeto tem aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Federal do Paraná – Setor de Ciências da Saúde/SCS. Para a pesquisa em crianças com o Certificado de Apresentação de Apreciação Ética (CAAE) sob número 24676613.6.0000.0102 e para a pesquisa envolvendo adultos o CAAE sob número 01038112.0.0000.0102. As aprovações são apresentadas no Anexo B e Anexo C.

A Figura 24 representa a sequência das etapas desenvolvidas no estudo e cada etapa será discorrida a seguir.

Figura 19. Diagrama das etapas do Capítulo 2



Fonte: Autor (2022).

3.1 Amostras

Participaram da pesquisa 196 crianças com idade igual ou inferior a 16 anos classificadas como diabéticos tipo 1 (DM1, n=98) (ou seja, classificados como DM1 de início precoce pois o diagnóstico foi dado na infância) e saudáveis (grupo controle crianças, n=98), e ainda, 265 adultos com idade igual ou superior a 18 anos

classificados como diabéticos tipo 2 (DM2, n=133) e saudáveis (grupo controle adultos, n=132).

Os critérios utilizados para a caracterização dos pacientes diabéticos foram os preconizados pela Associação Americana de Diabetes (ADA), pela Sociedade Internacional de Diabetes Pediátrica e Adolescentes (*International Society for Pediatric and Adolescent Diabetes* - ISPAD) e SBD. Para formar o grupo controle foram incluídos indivíduos saudáveis, que declararam durante a triagem clínica não apresentar qualquer tipo de DM, hipertensão, doença renal, doenças da tireoide e/ou estarem em uso contínuo de qualquer medicamento.

Foram objeto de análise deste estudo as amostras de sangue total e de soro, bem como os dados clínicos e antropométricos obtidos por meio de entrevista (diabéticos e grupo controle) e dados do prontuário médico (diabéticos). Só participaram da pesquisa após adesão voluntária e ciência e assinatura prévia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) pelos participantes maiores de idade, ou dos pais ou responsáveis pelas crianças.

No caso do grupo DM1, as coletas das amostras e entrevistas foram realizadas na Unidade de Endócrino Pediatria (UEP) do Complexo Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná (HC – UFPR) e no Hospital Pequeno Príncipe (HPP). Os participantes do grupo DM2 foram recrutados na Unidade de Diabetes do Serviço de Endocrinologia e Metabologia do CHC-UFPR (SEMPR). O grupo controle de crianças e adultos foram obtidas em escolas municipais de cidades da região metropolitana de Curitiba e no Banco de Sangue do CHC-UFPR, respectivamente.

Para a entrevista, foi utilizado um questionário padronizado e a entrevista para preenchimento foi realizada pelo grupo de pesquisa. O questionário está disponível no Apêndice B. E para coleta e obtenção das amostras, foram utilizados tubos secos (BD Vacutainer® K2EDTA; Becton, Dickinson, Co.) no caso de sangue total e tubos com gel separador (Gel BD Vacutainer® SSTTM; Becton Dickinson, Co.) para coleta de soro. As amostras de sangue total foram homogeneizadas durante 15 minutos e fracionadas em alíquota de aproximadamente 1,0 mL para determinação de hemoglobina glicada e, volume restante, empregado na obtenção da camada de leucócitos utilizada na extração do DNA genômico (*buffy coat*) por meio de centrifugação, enquanto que as amostras de soro foram submetidas a centrifugação (centrífuga Hermle Z206A) durante 10 minutos a 6.000 rotações por minuto,

aliquotadas em microtubos de 0,5 mL e armazenadas em freezer -20°C e -80°C para posterior dosagem dos parâmetros bioquímicos.

Os critérios de exclusão das amostras adotados foram: amostras hemolisadas, lipêmicas e/ou ictéricas. Todas as amostras que se encaixavam nestes critérios foram excluídas dos ensaios. Os ensaios foram realizados nas dependências físicas do laboratório de Bioquímica Clínica Campus Jardim Botânico, do Departamento de Análises Clínicas da UFPR, utilizando equipamentos e material disponíveis para pesquisa.

3.2 Extração e quantificação do DNA genômico

Após a centrifugação do sangue total, e obtenção do *buffy coat*, o DNA genômico foi, então, extraído pelo método de *salting out* com modificações do descrito por Lahiri e Nurnberger (1991). O DNA extraído foi quantificado por espectrofotometria em 260 e 280 nm (A_{260}/A_{280}) através do Espectrofotômetro UV/VIS (S60, Biochrom) (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS, 1989).

A pureza da amostra do DNA é estimada pela razão entre as absorbâncias A_{260}/A_{280} quantificado pela espectrofotometria. Valores entre 1,8 e 2,0 são considerados adequados e indicam grau de pureza adequado para a amostra (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS, 1989). Amostras com grau de pureza inferior ao citado, ou concentração menor que 20 ng/ μ L foram excluídas dos ensaios. As amostras de DNA com qualidade apropriada foram, então, diluídas, com água ultrapura estéril, a 20 ng/ μ L, para genotipagem pelo sistema de reação de PCR em tempo real com sondas Taqman®.

3.3 Variantes genéticas estudadas

As genotipagens dos polimorfismos selecionados para este estudo foram realizadas utilizando a técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real. A PCR em tempo real (qPCR) empregada nas análises foi o sistema TaqMan® (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), que utiliza a reação de amplificação em cadeia da polimerase e a discriminação alélica com sondas marcadas com diferentes fluoróforos (SCHLEINITZ; DISTEFANO; KOVACS, 2011).

A Tabela 9 apresenta os genes e os polimorfismos de único nucleotídeo estudados neste trabalho.

Tabela 9. Caracterização dos polimorfismos estudados e da reação de qPCR

Designação OMIM	Gene	Cromossomo Posição	Localização Região	Polimorfismo	Troca de aminoácido	Troca alélica	TaqMan®
606226	TAS1R2	1p36.13	Éxon3	rs35874116	Ile191Val	T>C	C_55646_20
606226	TAS1R2	1p36.13	Éxon 6	rs12033832	Ser<Ser	G>A/ G>C	C_25985586_10
612556	ADIPOQ	3q27.3	Região promotora	rs266729	-	G>C	C_2412786_10

Fonte: Adaptado de Online Mendelin Inheritance in Man (OMIM) e NCBI

3.3.1 Reação de qPCR com sondas Taqman®

Os ensaios de PCR em tempo real utilizando sondas fluorescentes do tipo TaqMan® foram realizados em equipamento de PCR em tempo real 7500 FAST (Applied Biosystems/Life Technologies) e para cada amostra foi realizado o ensaio TaqMan® com reagentes e produtos discriminados a seguir (Tabela 10).

Tabela 10. Reagentes e produtos usados no ensaio TaqMan®

Reagentes	Volume (µL)
TaqMan Master Mix®	3,0
SNP <i>Genotyping Assay</i> (sonda TaqMan®)	0,1
Água ultra pura (mili-Q)	1,9
DNA (20 ng/µL)	3,0

Master Mix (DNA polimerase, Mg⁺⁺, tampão, ativadores).

Fonte: Autor (2022).

Conforme apresentado, na reação estavam presentes os Master Mix, SNP *Genotyping Assay* e água ultrapura (Mili-Q) compondo o Super Master Mix. Esta mistura foi distribuída na placa de 96 poços e, posteriormente, cada amostra de DNA (20 ng/µL) foi adicionada ao Super Master Mix. Todos os ensaios foram realizados com o controle negativo (apenas Super Master Mix) por placa para monitoramento de contaminações.

Após o fim das reações, o programa *7500 Fast SDS System Software*® plotou os resultados da discriminação alélica em gráficos que ilustram a emissão de fluorescência em cada amostra submetida à amplificação. As genotipagens foram obtidas com mais de 95% de qualidade, dado reportado pelo *software* de análise de dados.

3.4 Quantificação dos biomarcadores

Os biomarcadores de controle glicêmico, perfil lipídico, perfil nutricional e função renal foram quantificados no soro das amostras que compuseram os grupos de estudo em sistema automatizado Architect Ci8200 (Abbott Diagnóstica Laboratórios do Brasil®) ou sistema automatizado Labmax 400 (Labtest®), no mesmo Laboratório em que ocorreram as demais análises.

Os analitos usados, o princípio metodológico, o coeficiente de variação (CVa%) e o intervalo de referência para cada biomarcador avaliado, estão descritos na Tabela 11.

Tabela 11. Biomarcadores analisados e respectivo princípio metodológico, CVa% e intervalo de referência

Dosagem	Princípio metodológico	CVa%	Intervalo de referência
Ácido úrico	Uricase, 4-aminoantipirina (4-AAP), ácido 2,4,6-tribromo-3-hidroxibenzóico	1,6	2,6-6,0 mg/dL
Albumina	Colorimétrico (Verde de Bromocresol)	1,3	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 Laspartato, cetoglutarato, NADH e piridoxal fosfato	2,2	15-40 U/L
Colesterol total	Enzimático Colorimétrico (Reação de Trinder)	2,7	Desejável: 200 mg/dL
Creatinina	Colorimétrico (Picrato alcalino)	2,7	0,26-0,81 mg/dL
Gama-GT	Fotometria em modo cinético (método de Szasz modificado)	1,13	5-58 mg/dL
Glicose	Glucose oxidase – Trinder	2,2	130 mg/dL
HbA1c)	Imunoensaio (padronizado DCCT)	1,7	4,0-6,0%
HDL-colesterol	Enzimático Colorimétrico (Acelerador - Detergente Seletivo)	3,6	Desejável: 35-40 mg/dL
LDL-colesterol	Surfactante Seletivo	4,2	Desejável: 130 mg/dL
Proteínas totais	Reação do Biureto	1,4	6,0-8,0 g/dL
Triglicerídeos	Enzimático Colorimétrico (Reação de Trinder)	3,4	Desejável: 130 mg/dL
Ureia	Ensaio cinético com uréase, GLDH e NADH.	1,1	15-44 mg/dL
1,5 anidroglicitol (1,5-AG)	Enzimático Glycomark	3,4	>10 µg/mL

Fonte: Autor (2022).

3.5 Análises estatísticas

A normalidade foi avaliada com o teste de Kolmogorov-Smirnov e a detecção de *outliers* foi realizada pelo método gráfico disponível no programa Statistica 8.0 (StatSoft Inc, Tulsa OK, USA).

Variáveis contínuas com 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 ($\pm 1SD$). As variáveis que não apresentaram distribuição normal foram comparadas com o teste U de Mann-Whitney, ou o teste de Kruskal-Wallis (mais de 2 grupos), sendo os valores apresentados como mediana e intervalo interquartil (25%- 75%).

Para as variáveis categóricas, como frequências genotípicas e alélicas, foram utilizados: teste do Chi-quadrado (χ^2) ou o teste Exato de Fischer bidirecional, quando 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 codificados como 1 (homozigoto usual); 2 (heterozigoto) e 3 (homozigoto raro) para todas as análises de correlação, também usando o programa Statistica 8.0.

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 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 alelo menos frequente se encontrava dentro do limite de confiança de 95% (95% IC).

Uma probabilidade (P) inferior a 5% ($P < 0,05$) foi considerada significativa em todas as análises.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados são apresentados na sequência, nas populações estudadas (DM1 e DM2) e em três subgrupos: dados antropométricos e clínicos, parâmetros bioquímicos e análises moleculares. Nos grupos diabéticos, a coleta de sangue ocorreu durante a realização de exames de rotina, com orientação para 10 horas de jejum, enquanto o grupo controle, por ser formado por doadores de sangue saudáveis, foram orientados a se alimentarem antes da coleta devido a doação de sangue, portanto, a coleta foi obtida na ausência de jejum.

4.1 Dados antropométricos e clínicos

A Tabela 12 apresenta os dados antropométricos dos grupos que foram avaliados no estudo.

Tabela 12. Dados antropométricos e clínicos dos participantes do estudo enquadrados no grupo DM1, DM2 e seus respectivos controles

DM1	Controle (n=98)	DM1 (n=98)	P
Idade (anos)	10 ± 1,0 (9-11)	11 ± 2,6 (9-13)	0,0022*
Sexo feminino	64%	64%	ND
Sexo masculino	36%	36%	
Peso (kg)	38,2 ± 10,2 (30,7-45,5)	41,1 ± 14,3 (30-51)	0,0981
Altura (m)	1,42 ± 0,1 (1,36-1,47)	1,44 ± 0,16 (1,34-1,56)	0,2204
IMC (kg/m ²)	18,7 ± 3,1 (15,8-21,1)	19,4 ± 3,6 (16,3-21,8)	0,3909
Escores-Z	+0,34 ± 1,09 (-0,72-+1,41)	+0,31 ± 1,16 (-0,66-+1,31)	0,8351
Idade ao diagnóstico (anos)	-	4,1 ± 3,1 (1,3-7,0)	-
Tempo de diabetes (anos)	-	7,2 ± 3,8 (4,2-10,0)	-
DM2	Controle (n=132)	DM2 (n=133)	P
Idade (anos)	50 ± 12 (45-55)	51 ± 13 (43-60)	0,3304
Sexo feminino	100%	100%	ND
Sexo masculino	0%	0%	
Peso (kg)	73 ± 15 (60-84)	71 ± 16 (58-84)	0,3142
Altura (m)	1,62 ± 0,07 (1,57-1,67)	1,58 ± 0,07 (1,53-1,63)	<0,0001*
IMC (kg/m ²)	28 ± 5 (23-32)	28 ± 6 (23,3-33,4)	0,3181
Idade ao diagnóstico (anos)	-	41,1 ± 11,1 (34,0-48,9)	-
Tempo de diabetes (anos)	-	9,9 ± 7,5 (4,7-13,8)	-

Os resultados são apresentados como média ± desvio padrão e mediana (intervalo interquartil 25%-75%). IMC: Índice de massa corpórea. Probabilidade (p), teste *t-Student* amostras não pareadas, ND: Dado não disponível. *representa resultado estatisticamente diferente entre linhas.

As amostras foram pareadas por sexo, contudo o pareamento por idade não foi possível, uma vez que as crianças do grupo controle ($10 \pm 1,0$ anos) são mais jovens ($p=0,0022$) que o grupo DM1 ($11 \pm 2,6$ anos). A idade média do grupo DM1 selecionada foi a com início precoce e é similar à de outros estudos (HARJUTSALO; FORSBLOM; GROOP, 2011; HANNONEN *et al.*, 2012; BAECHLE *et al.*, 2014). Não houve diferença do escore Z entre os grupos (Tabela 12).

O escore Z é índice que congrega informações como peso, idade e estatura, indicado na avaliação do crescimento e estado nutricional de crianças e adolescentes que fornece uma medida do *status* de crescimento de um indivíduo em comparação ao valor de referência (DIBLEY *et al.*, 1987). Os pacientes com DM1 geralmente costumavam apresentar IMC reduzido (ADA, 2021), mas o fenótipo desses pacientes tem mudado nos últimos anos (CONWAY; LANCE, 2010). Tem sido observado aumento da obesidade infantil em pacientes com DM1 (LIU *et al.*, 2010; LIPMAN *et al.*, 2013), tendo aumentado a prevalência de sobrepeso e obesidade no início do DM1 três vezes ao longo de duas décadas. Inclusive, foi demonstrado que jovens com DM1 são mais propensos a estar acima do peso do que seus pares sem a condição (LIU *et al.*, 2010). Contudo, em nosso estudo o grupo DM1 apresentou Escore-Z dentro dos valores que predizem um diagnóstico nutricional de eutrofia (quando o Escore-Z varia de -2 a +1) (BRASIL, 2011).

O grupo adulto foi composto apenas pelo sexo feminino e foi pareado por idade e IMC, o qual indica sobrepeso, uma vez que se encontram entre 25 e 29,99 kg/m² (WHO, 2000) (Tabela 12), um dos principais fatores de risco para o DM2, sendo que quanto maior o IMC, maior o risco em desenvolver a doença (LOGUE; WILD; SATTAR, 2011).

4.2 Análises bioquímicas

Os tópicos a seguir apresentam as concentrações séricas dos biomarcadores avaliados, sendo subdividido em controle glicêmico, perfil lipídico, perfil nutricional, função renal e hepática.

4.2.1 Marcadores de controle glicêmico

Como esperado, as concentrações plasmáticas de glicemia em jejum e HbA1c nos grupos DM são superiores ($p < 0,0001$) ao dos grupos controle (Tabela 13), e confirma os critérios de seleção dos grupos, visto que os grupos controles apresentaram a glicemia dentro dos intervalos de referência (mesmo que a coleta deste grupo não tenha sido feita em jejum).

Os grupos DM apresentaram mau controle glicêmico em relação a HbA1c ($\text{HbA1c} > 7,0\%$) (SBD, 2019; ADA, 2022). Também como esperado, o controle glicêmico é melhor no grupo DM2 em comparação com o DM1 (HALLSTRÖM *et al.*, 2021). O grupo DM2 apresentou uma glicemia em jejum média inferior ao preconizado pela ADA (Glicemia em jejum $< 180\text{ mg/dL}$) (ADA, 2022) e 1,5-AG superior a $10\text{ }\mu\text{g/mL}$, indicando que apresentaram poucos picos hiperglicêmicos pós-prandial (VAN LEEUWEN; BLADH, 2015). O mau controle glicêmico reportado neste estudo para o grupo DM1 está de acordo com a dificuldade de alcançar um bom controle glicêmico nesta faixa etária (KIM, H. *et al.*, 2012). Na verdade, o DCCT já havia mostrado que as concentrações de HbA1c são maiores em adolescentes do que em adultos ($8,1\%$ vs $7,2\%$ no grupo de tratamento intensivo e $9,7\%$ vs $8,9\%$ no grupo de tratamento convencional, respectivamente) (DIABETES CONTROL AND COMPLICATIONS TRIAL RESEARCH GROUP *et al.*, 1993).

Tabela 13. Biomarcadores de controle glicêmico nos grupos DM1 e DM2 e nos respectivos controles

DM1	Controle (n=98)	DM1 (n=98)	P
Glicemia em jejum (mg/dL)	95,1 $\pm$ 18 (87-101)	238,8 $\pm$ 117,5 (145-314)	<0,0001*
HbA1c (%)	5,3 $\pm$ 0,3 (5,0-5,4)	10 $\pm$ 2,1 (8,6-11)	<0,0001*
1,5-AG ($\mu\text{g/mL}$)	30,1 $\pm$ 7,6 (24,8-35,2)	3,6 $\pm$ 2,6 (1,6-4,9)	<0,0001*
DM2	Controle (n=132)	DM2 (n=133)	P
Glicemia em jejum (mg/dL)	95,1 $\pm$ 18 (83-104)	153,1 $\pm$ 81 (100-172)	<0,0001*
HbA1c (%)	5,31 $\pm$ 0,4 (5,0-5,6)	7,9 $\pm$ 2,4 (6,1-9,6)	<0,0001*
1,5-AG ($\mu\text{g/mL}$)	22,1 $\pm$ 6,8 (18-26,4)	13,6 $\pm$ 8,5 (6,5-20,3)	0,0126*

Os resultados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão e mediana (intervalo interquartil 25%-75%). Probabilidade (p), teste t-Student amostras não pareadas, *representa resultado estatisticamente diferente entre linhas.

4.2.2 Marcadores de perfil lipídico

Nesse estudo, os pacientes com DM1 apresentaram concentrações maiores de colesterol total e LDL-C e menores de triglicerídeos que o grupo controle (Tabela 14). Embora dislipidemia seja comum em crianças com DM1 (KERSHNAR *et al.*, 2006; SCHWAB *et al.*, 2006; GUY *et al.*, 2009; ORCHARD; COSTACOU, 2010), também é possível encontrar concentrações normais de lipídeos (GUY *et al.*, 2009). Contudo, este perfil lipídico normal pode estar associado a perfis lipídicos mais aterogênicos (ORCHARD *et al.*, 1999; COLHOUN *et al.*, 2002; KORNERUP *et al.*, 2003; ALBERS *et al.*, 2008).

Já, os pacientes com DM2 apresentaram um perfil lipídico similar ao grupo controle, com exceção do HDL-colesterol, que foi inferior ($P=0,0003$). Estes perfil lipídico no DM2 chama atenção porque as alterações no metabolismo dos lipídeos são frequentes nos pacientes com DM2 (KONES; RUMANA, 2014). Mas é importante ressaltar que a ausência de jejum nos grupos controle pode ter afetado positivamente as concentrações de triglicérides, cuja dosagem necessita de jejum mínimo de 12 horas, enquanto os diabéticos são submetidos à intensa terapia hipolipemiante. Ainda que outros achados demonstrem anormalidade lipídica em diabéticos submetidos a tratamento hipolipemiante (AL SIFRI *et al.*, 2014).

Tabela 14. Biomarcadores lipídicos nos grupos DM1 e DM2 e nos respectivos controles

DM1	Controle (n=98)	DM1 (n=98)	P
Colesterol total (mg/dL)	159,4 ± 26,2 (143,8-171)	172,9 ± 39,4 (146-188)	0,0030*
HDL-colesterol (mg/dL)	55,5 ± 11 (49-62,3)	56,5 ± 12,7 (49-64)	0,5300
LDL-colesterol (mg/dL)	82,6 ± 22,9 (69-95)	100 ± 30,6 (79-117)	<0,0001*
Triglicerídeos (mg/dL)	106,8 ± 42,3 (76,8-129)	81,8 ± 49 (52-85,5)	0,0002*
DM2	Controle (n=132)	DM2 (n=133)	P
Colesterol total (mg/dL)	196 ± 43 (168-224)	191 ± 48 (158-216)	0,3830
HDL-colesterol (mg/dL)	58,1 ± 14,6 (47,3-67,8)	48,5 ± 26,3 (36-54)	0,0003*
LDL-colesterol (mg/dL)	109 ± 38,2 (88-129)	110,8 ± 37,3 (84-129)	0,7453
Triglicerídeos (mg/dL)	145 ± 83 (88-181)	156 ± 111 (100-183)	0,3263

Os resultados são apresentados como média ± desvio padrão e mediana (intervalo interquartil 25%-75%). Probabilidade (p), teste t-Student amostras não pareadas, *representa resultado estatisticamente diferente entre linhas.

Como os pacientes com DM1 têm de 2 a 4 vezes mais risco de desenvolver aterosclerose em comparação com pessoas sem DM1 (TOMKIN, 2008; LEMKES *et al.*, 2010; SCHNELL *et al.*, 2013) e pacientes com DM2 têm, em média, risco duas a

quatro vezes maior de desenvolver doença coronariana que indivíduos sem diabetes (SARWAR *et al.*, 2010), passou a ser necessário estratificar o risco cardiovascular de pacientes com DM, tanto DM2 como DM1, 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).

4.2.3 Marcadores de perfil nutricional

Apesar dos valores de proteínas totais e de albumina serem estatisticamente diferentes entre os grupos avaliados (DM1, DM2) e seus respectivos controles, as concentrações destes parâmetros se encontram dentro do intervalo de referência de 2,9-4,7 g/dL para a albumina e 6,0 – 8,0 g/dL para proteínas totais (Tabela 15).

Tabela 15. Biomarcadores do perfil nutricional nos grupos DM1 e DM2 e nos respectivos controles

DM1	Controle (n=98)	DM1 (n=98)	P
Albumina (g/dL)	4,5 ± 0,3 (4,4-4,7)	4,3 ± 0,3 (4,1-4,5)	<0,0001*
Proteínas totais (mg/dL)	8,5 ± 0,87 (8,0-9,1)	7,3 ± 0,7 (6,9-7,7)	<0,0001*
DM2	Controle (n=132)	DM2 (n=133)	P
Albumina (g/dL)	3,9 ± 0,2 (3,7-4,0)	4,1 ± 0,4 (3,9-4,4)	<0,0001*
Proteínas totais (mg/dL)	6,9 ± 0,5 (6,5-7,2)	8,4 ± 0,8 (7,8-8,9)	<0,0001*

Os resultados são apresentados como média ± desvio padrão e mediana (intervalo interquartil 25%-75%). Probabilidade (p), teste t-Student amostras não pareadas, *representa resultado estatisticamente diferente entre linhas.

Valores reduzidos de albumina e proteínas totais poderiam sugerir hipoproteinemias, seja por falha na síntese proteica decorrente de hepatopatias e desnutrição, ou perda proteica ocasionada por síndrome nefrótica, por exemplo (ROSHAN; STANTON, 2013) enquanto valores aumentados são comumente encontrados em doenças inflamatórias e/ou disfunções endoteliais (SILVA *et al.*, 2005).

4.2.4 Marcadores de função renal

Portadores de DM apresentam alto risco de lesão renal e complicações vasculares como a nefropatia diabética, como resultado da falta de controle glicêmico. A nefropatia é considerada uma condição crônica de alta prevalência e elevada mortalidade, podendo afetar a sobrevida dos diabéticos (MURUSSI *et al.*, 2003).

Um estudo demonstrou que 1/3 dos pacientes com DM1 desenvolvem doença renal em estágio final requerendo diálise ou transplante (REDDI; CAMERINI-DAVALOS, 1990). Dentre os indicativos de lesão renal de longa data (estimativa de cinco anos após o DM) e/ou nefropatia diabética manifesta, tem-se a proteinúria persistente detectável por testes laboratoriais de triagem, principalmente quando há taxa de excreção de albumina urinária $\geq 200 \mu\text{g}/\text{min}$, ou indicadores plasmáticos como creatinina, ureia e ácido úrico (RIFAI; HORVATH; WITTEW, 2018). Estes indicadores foram avaliados no estudo e seu resultado é apresentado na Tabela 16.

Tabela 16. Biomarcadores de função renal nos grupos DM1 e DM2 e nos respectivos controles

DM1	Controle (n=98)	DM1 (n=98)	P
Creatinina (mg/dL)	0,70 $\pm$ 0,1 (0,6-0,8)	0,72 $\pm$ 0,1 (0,6-0,8)	0,2375
Ureia (mg/dL)	24,1 $\pm$ 6,2 (20-28)	27 $\pm$ 7,2 (22-31)	0,0043*
Ácido úrico (mg/dL)	4,2 $\pm$ 1,0 (3,4-4,8)	3,2 $\pm$ 1,1 (2,5-3,7)	<0,0001*
DM2	Controle (n=132)	DM2 (n=133)	P
Creatinina (mg/dL)	0,62 $\pm$ 0,2 (0,48-0,71)	0,88 $\pm$ 0,3 (0,7-0,9)	<0,0001*
Ureia (mg/dL)	26,2 $\pm$ 7,2 (21-32)	33,6 $\pm$ 12,8 (26-39)	<0,0001*
Ácido úrico (mg/dL)	3,9 $\pm$ 1,0 (3-4,5)	4,8 $\pm$ 1,4 (3,8-5,6)	0,5145

Os resultados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão e mediana (intervalo interquartil 25%-75%). Probabilidade (p), teste t-Student amostras não pareadas, *representa resultado estatisticamente diferente entre linhas.

Achados nesse estudo demonstram diferença significativa em determinados marcadores de função renal na comparação entre diabéticos e seus respectivos controles, porém os valores de ureia e creatinina (CERIOTTI *et al.*, 2008) ainda se encontram dentro dos limites de referência, indicando ausência de lesão renal manifesta. Embora a nefropatia esteja dentre as complicações mais frequentes associadas ao DM, esta é progressiva e associada ao mau controle glicêmico (DONAGHUE *et al.*, 2014; MACISAAC; EKINCI; JERUMS, 2014). O grupo DM1 apresenta inadequado controle glicêmico, mas apresenta a doença há, em média, 7,2

anos. O grupo DM2 embora apresente a doença por um período mais longo (aproximadamente 10 anos), possui um melhor controle glicêmico (Tabela 13).

A concentração sérica de ácido úrico foi significativamente menor ($P < 0,0001$) no grupo DM1 ($3,2 \pm 1,1$ mg/dL) quando comparada às crianças saudáveis ($4,2 \pm 1,0$ mg/dL), este achado também foi reportado em outro estudo de Lytvyn e colaboradores (LYTVYN *et al.*, 2015), provavelmente devido a uma diminuição da reabsorção do ácido úrico mediada por altas concentrações de glicose no lúmen dos túbulos renais.

Diferente de outros estudos que detectaram hiperuricemia em pacientes com DM2 e associaram a RI (YOO *et al.*, 2011; KRISHNAN *et al.*, 2012), não observamos diferença na concentração sérica do ácido úrico no grupo DM2 quando comparado ao grupo controle ($P = 0,5145$). A associação causal entre hiperuricemia e DM2 pode ser mediada pela disfunção renal bem como RI. Contudo, nem todos os estudos chegam as mesmas conclusões (LI; HSIEH; CHANG, 2013). Um grande estudo prospectivo (TANIGUCHI *et al.*, 2001) não mostrou associação entre as concentrações plasmáticas de ácido úrico e o DM2, e associação inversa às concentrações plasmáticas de ácido úrico e o DM2 foram observadas (HERMAN; MEDALIE; GOLDBOURT, 1976; TUOMILEHTO *et al.*, 1988).

4.2.5 Marcadores de função hepática

Os marcadores de função hepática são importantes de serem avaliados, visto que a presença de hepatopatias ocorre no DM devido ao aumento da peroxidação lipídica, diminuição da oxidação de carboidratos e acúmulo de gordura nos hepatócitos, resultantes do mecanismo de RI (SHARMA *et al.*, 2012).

O DM, principalmente o tipo 2, pode ocasionar o acúmulo de gordura nos hepatócitos, com surgimento da doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA), que por sua vez, provocam alteração das enzimas hepáticas AST, ALT e Gama-GT (CAXAMBÚ; CARROCINI; THOMAZELLI, 2015). Estas foram as enzimas avaliadas neste estudo e o resultado das análises é apresentado a seguir (Tabela 17).

Tabela 17. Biomarcadores de função hepática nos grupos DM1 e DM2 e nos respectivos controles

DM1	Controle (n=98)	DM1 (n=98)	P
ALT (U/L)	13,7 ± 5,3 (10-16)	13,9 ± 9,8 (10-15)	0,9447
AST (U/L)	24,5 ± 6,2 (21-28)	22,5 ± 14,2 (17-25)	0,1554
Gama-GT (U/L)	14,9 ± 4,1 (12 - 16,8)	16 ± 15,5 (10-15)	0,2202
DM2	Controle (n=132)	DM2 (n=133)	P
ALT (U/L)	15,8 ± 7,4 (12-19)	17,3 ± 9,6 (10-21,8)	0,1546
AST (U/L)	21,9 ± 11,3 (17-23,8)	18,3 ± 10,7 (12-20)	0,0076*
Gama-GT (U/L)	29,0 ± 15 (18 - 36)	40,1 ± 41,1 (18-46)	0,0044*

Os resultados são apresentados como média ± desvio padrão e mediana (intervalo interquartil 25%-75%). Probabilidade (p), teste t-Student amostras não pareadas, *representa resultado estatisticamente diferente entre linhas.

Embora o grupo DM2 apresentou atividades AST ($17,3 \pm 9,6$ U/L) e Gama-GT ($40,1 \pm 41,1$ U/L) diferentes do grupo controle (AST $21,9 \pm 11,3$ U/L e Gama-GT $29,0 \pm 15$ U/L), estas atividades encontram-se dentro do intervalo de referência.

Altas atividades das enzimas hepáticas também podem prever independentemente o desenvolvimento posterior de diabetes (NAKANISHI; SUZUKI; TATARA, 2004; WANNAMETHEE *et al.*, 2005), bem como eventos cardiovasculares (DCV) e mortalidade, também em indivíduos com DM2 (SCHINDHELM; DIAMANT; DEKKER, 2006; MONAMI *et al.*, 2007). Além disso, há evidências de que enzimas hepáticas elevadas podem estar relacionadas à sensibilidade à insulina no fígado ou em todo o corpo e/ou secreção de insulina (VOZAROVA *et al.*, 2002) e síndrome metabólica (YKI-JARVINEN, 2014).

4.3 Análises moleculares

Foram estudados os polimorfismos rs35874116 e rs12033832 do gene *TAS1R2* e rs266729 do gene *ADIPOQ* e suas frequências genotípicas e alélicas, tanto no DM1, como no DM2 e seus respectivos controles, apresentaram-se dentro do equilíbrio de Hardy-Weinberg (H-W; $P > 0,05$). O equilíbrio de H-W, sob determinadas condições, evidencia que as frequências alélicas na população estudada permanecem constantes de uma geração à outra, visto que desvios no equilíbrio de H-W podem indicar mutações, fluxo gênico/migração entre populações ou até mesmo seleção de genótipos para reprodução (NAMIPASHAKI; RAZAGHI-MOGHADAM; ANSARI-

POUR, 2015). Os resultados foram divididos em subtópicos de acordo com o gene em estudo.

4.3.1 Polimorfismos do gene *TAS1R2*

O gene *TAS1R2* é responsável por codificar o receptor de doce do tipo T1R2. Este receptor é considerado polimórfico e de alta diversidade, provavelmente resultante da vantagem seletiva (KIM et al., 2006). Nesse gene, foram avaliados dois polimorfismos. Os resultados das frequências genotípicas e alélicas para os polimorfismos rs35874116 e rs12033832 são apresentados na Tabela 18 para o grupo DM1 e na Tabela 19 para o grupo DM2.

Tabela 18. Frequências genotípicas e alélicas dos polimorfismos rs35874116 e rs12033832 do gene *TAS1R2* em pacientes com DM1 e controles saudáveis

Polimorfismos Modelos	Genótipos Alelos	Controle (n=98)	DM1 (n=98)	P
TAS1R2, rs35874116				0,128
Co-dominante	T/T	45 (45,93%)	53 (54,1%)	
	T/C	46 (46,93%)	33 (33,7%)	
	C/C	7 (7,14%)	12 (12,2%)	
	H-W (p)	0,299	0,069	
FAM	C-alelo	30,6%	29,1%	0,740*
	[95% IC]	[24-37%]	[23-55%]	
TAS1R2, rs12033832				0,573
Co-dominante	G/G	54 (55,1%)	54 (55,1%)	
	G/A	38 (38,8%)	41 (41,8%)	
	A/A	6 (6,1%)	3 (3,1%)	
	H-W (p)	0,841	0,144	
FAM	A-alelo	25,5%	24,0%	0,725*
	[95% IC]	[19-32%]	[18-30%]	

DM1, Diabetes *mellitus* tipo 1; Controles, crianças sem diabetes; Valores apresentados em n (%); DM1, crianças com DM1 e Controle, crianças saudáveis. Probabilidade P-valor, teste do Chi-quadrado para o genótipo e frequências alélicas*. 95% IC - Intervalo de Confiança de 95%. Todos os grupos estão no equilíbrio de Hardy-Weinberg ($P > 0,05$). *Modelo dominante e **Modelo recessivo

Tabela 19. Frequências genotípicas e alélicas dos polimorfismos rs35874116 e rs12033832 do gene *TAS1R2* em pacientes com DM2 e controles saudáveis

Polimorfismos Modelos	Genótipos Alelos	Controle (n=132)	DM2 (n=133)	P
TAS1R2, rs35874116				0,227
Co-dominante	T/T	62 (47,0%)	71 (53,4%)	
	T/C	57 (43,2%)	53 (39,8%)	
	C/C	13 (9,8%)	9 (6,8%)	
	H-W (p)	0,985	0,833	
FAM	C-alelo [95% IC]	31,4% [26-37%]	26,7% [21-32%]	0,229*
TAS1R2, rs12033832				0,041
Co-dominante	G/G	63 (47,7%)	80 (60,1%)	
	G/A	55 (41,7%)	44 (33,1%)	
	A/A	14 (10,6%)	9 (6,8%)	
	H-W (p)	0,700	0,389	
FAM	A-alelo [95% IC]	31,4% [26-37%]	23,3% [18-28%]	0,036*
Dominante	G/G vs G/A + A/A	63/69	80/53	0,04
Recessivo	A/A vs. G/G + G/A	14/118	9/124	0,27

DM2, Diabetes *mellitus* tipo 2; Controles, indivíduos sem diabetes; FAM, frequência do alelo menor. As frequências dos polimorfismos estavam dentro do equilíbrio de Hardy-Weinberg; controle (P=0,700) e DM2 (P=0,389). P-valor, teste do Chi-quadrado para o genótipo e frequências alélicas*. 95% IC-intervalo de confiança de 95%. Em negrito probabilidade significativa (P<0,05)

Conforme apresentado na Tabela 18, os polimorfismos rs35874116 e rs12033832 do gene *TAS1R2* não apresentaram diferença nas frequências alélicas e genotípicas entre os grupos DM1 e controle, não estando associado ao DM1 na amostra em estudo. O polimorfismo rs35874116 do gene *TAS1R2* também não foi associado ao DM2 (Tabela 19). Este polimorfismo foi associado a ingestão de alimentos doces (ENY et al., 2010), mas não a obesidade (SCHNOR et al., 2017; KOC; SOYOCAK; ANDAC-OZTURK, 2021), DM2 (SCHNOR et al., 2017) ou DMG (BARTÁKOVÁ et al., 2016). Foi reportado que o alelo C foi associado a menores excursões de glicose pós-prandial (SERRANO et al., 2021).

Avaliando a frequência genotípica da presente pesquisa com outras pesquisas realizadas para o rs35874116, pode-se observar na Tabela 20, que os resultados do grupo controle crianças (30,6% 24-37%) e adultos (31,4% [26-37%]) são similares a outro estudo brasileiro, e ainda, canadenses, mexicanos, espanhóis, turcos, tchecos e ingleses.

Tabela 20. Levantamento de outros estudos do polimorfismo rs35874116

TAS1R2 – rs35874116			Genótipo (%)			Alelo MAF (%)
Grupo étnico	Características	N	TT	TC	CC	C
Brasileiros (PRESENTE ESTUDO)	Controle crianças	98	45,9%	46,9%	7,1%	31%
	DM1	98	54,1%	33,7%	12,2%	29%
	Controle adulto	132	47%	43,2%	9,8%	31%
	DM2	133	53,4%	38,9%	6,8%	27%
Euro-brasileiros (NOVAIS <i>et al.</i> , 2016)	Mulheres obesas	351	48%	43%	9%	31%
Canadenses (ENY <i>et al.</i> , 2010)	DM2	100	47%	43%	11%	33%
Mexicanos (oeste) (RAMOS-LOPEZ <i>et al.</i> , 2016)	Indivíduos adultos saudáveis	441	56,9%	37,4%	5,7%	24%
Coreanos (CHOI <i>et al.</i> , 2017)	Indivíduos adultos saudáveis	1.053	73%	25,1%	1,8%	14%
Australianos (HAN; KEAST; ROURA, 2017)	Jovens adultos saudáveis	28	60,7%	35,7%	3,6%	21%
Espanhóis (BARRAGÁN <i>et al.</i> , 2018)	Caucasianos saudáveis (18 a 80 anos)	949	36,4%	47,1%	16,5%	40%
Turca (HAZNEDAROĞLU <i>et al.</i> , 2015)	escolares com idades entre 7 e 12 anos	182	51,6%	41,8%	6,6%	28%
República tcheca (HOLLA <i>et al.</i> , 2015)	Crianças	637	52%	39,7%	8,3%	28%
Ingleses (METHVEN; ELLIS; KAVALLIAUSKAITE, 2018)	Indivíduos adultos saudáveis	62	58%	37%	5%	24%
Chineses (sul da china) (WANG <i>et al.</i> , 2020)	Escolares de 13 a 14 anos sem caries	673	77,4%	21,4%	1,2%	12%

Fonte: Autor (2022).

Após a genotipagem para o polimorfismo rs12033832, não foi observada diferença nas frequências alélicas ($P=0,725$) e genotípicas para o modelo codominante ($p=0,573$) para o polimorfismo rs12033832 entre o grupo DM1 e controle, não estando associado ao DM1 (Tabela 18). Contudo, houve diferença significativa nas frequências alélicas ($P=0,036$) e genotípicas para o modelo codominante ($P=0,041$) entre o grupo DM2 e controle (Tabela 19). Além disso, para os portadores

do alelo mais frequente, G/G, confere risco para o DM2, de 1,5 vezes (*odds ratio*) com intervalo de confiança de 95% (1,03-2,22).

O polimorfismo rs12033832 trata-se de um SNP recentemente estudado. Em 2015, um primeiro estudo que buscou avaliar a frequência desse polimorfismo em uma população canadense demonstrou que o polimorfismo rs12033832 do gene *TAS1R2* está associado ao paladar da sacarose e à ingestão de açúcar (DIAS *et al.*, 2015), posteriormente, outro estudo identificou que indivíduos eutróficos com genótipo A/A tiveram maior sensibilidade ao paladar doce e não gostam de consumir produtos com alto teor de açúcar, enquanto indivíduos obesos com genótipo G/G possuem menor sensibilidade, ocasionando maior ingestão do açúcar (BAHAUDDIN *et al.*, 2020).

Existe uma forte relação entre a ingestão de calorias, principalmente provenientes do açúcar e a obesidade e, paralelamente ao aumento do sobrepeso e da obesidade, a prevalência da síndrome metabólica e do DM2 também está aumentando, demonstrando que a ingestão de açúcar está intimamente relacionada com a taxa de DM em todo o mundo. Sabe-se, também, que os aspectos ambientais e genéticos fornecem uma explicação potencial sobre a susceptibilidade de certos grupos ao desenvolvimento de DM (JOHNSON *et al.*, 2009), o que impulsiona a necessidade em pesquisar a relação entre os fatores que afetam o consumo alimentar e o DM.

Até o presente momento, não foi encontrado estudo desse polimorfismo em populações brasileiras e sua relação com o DM também não foi estudada. Poucos estudos estão disponíveis acerca desse polimorfismo, as frequências obtidas foram, então, comparadas e são apresentadas na Tabela 21.

Tabela 21. Levantamento de outros estudos do polimorfismo rs12033832

TAS1R2 – rs12033832			Genótipo (%)			Alelo MAF (%)
Grupo étnico	Características	N	GG	GA	AA	A
Brasileiros (PRESENTE ESTUDO)	Controle crianças	98	55,1%	38,8%	6,1%	26%
	DM1	98	55,1%	41,8%	3,1%	24%
	Controle adulto	132	47,7%	41,7%	10,6%	31%
	DM2	133	60,1%	33,1%	6,8%	23%
Canadenses (DIAS <i>et al.</i> , 2015)	Controle adulto	91	58,2%	31,9%	9,9%	26%
Australianos (HAN; KEAST; ROURA, 2017)	Jovens adultos saudáveis	28	34,5%	37,9%	27,6%	47%
Inglêses (METHVEN; ELLIS; KAVALLIAUSKAITE, 2018)	Indivíduos adultos saudáveis	62	43%	47%	10%	34%
Suecos (HABBERSTAD; DRAKE; SONESTEDT, 2017)	Indivíduos saudáveis de meia idade não fumantes	3602	41%	46%	14%	37%
Coreanos (CHOI, 2021)	Mulheres saudáveis	2198	26,8%	49,4%	23,8%	49%

Fonte: Autor (2022).

Conforme apresentado, a presente população controle adulto apresentou frequência do alelo menor (31,4% [26-37%]) semelhante aos resultados obtidos no primeiro estudo realizado para este polimorfismo, que o avaliou em uma população canadense (DIAS *et al.*, 2015), além das populações inglesa (METHVEN; ELLIS; KAVALLIAUSKAITE, 2018) e sueca (HABBERSTAD; DRAKE; SONESTEDT, 2017). Sendo a frequência do alelo raro diferente do encontrado em australianos (HAN; KEAST; ROURA, 2017) e coreanos (CHOI, 2021), inclusive o heterozigoto não foi o mais frequente, como nessas duas populações e no estudo com ingleses (METHVEN; ELLIS; KAVALLIAUSKAITE, 2018) e suecos (HABBERSTAD; DRAKE; SONESTEDT, 2017).

O estudo desse polimorfismo se mostra necessário devido à falta de estudos em brasileiros, bem como sua relação com o DM. Resumidamente, o polimorfismo rs12033832 do gene *TAS1R2* foi associado ao DM2, com risco aumentado de 1,5 vezes (*odds ratio*) com intervalo de confiança de 95% (1,03-2,22) para o alelo mais frequente (G/G genótipo). As frequências genótípicas observadas na população em

estudo são similares ao estudo realizado com a população canadense, inglesa e sueca.

4.3.2 Polimorfismos do gene *ADIPOQ*

As frequências genótípicas e alélicas do polimorfismo rs266729 estão apresentados na Tabela 22 para o grupo DM1 e na Tabela 23 para o grupo DM2. As frequências genótípicas e alélicas do polimorfismo rs266729 foram similares entre os grupos DM e seus respectivos controles, não sendo associado ao DM1 ou DM2.

Tabela 22. Frequências genótípicas e alélicas do polimorfismo rs266729 do gene *ADIPOQ* em pacientes com DM1 e controles saudáveis

Polimorfismos Modelos	Genótipos Alelos	Controle (n=98)	DM1 (n=98)	P
ADIPOQ, rs266729				0,955
Co-dominante	C/C	55 (56,1%)	53 (54,1%)	0,773*
	C/G	35 (35,7%)	37 (37,7%)	
	G/G	8 (8,2%)	8 (8,2%)	
	H-W (p)	0,474	0,669	
	G-alelo	26,0%	27,0%	
	[95% IC]	[20-32%]	[21-33%]	

DM1, Diabetes *mellitus* tipo 1; Controles, crianças sem diabetes. Valores apresentados em n (%); DM1, crianças com diabetes tipo 1 e Controle, crianças saudáveis. Probabilidade P-valor, teste do Chi-quadrado para o genótipo e frequências alélicas*. 95% IC - Intervalo de Confiança de 95%. Todos os grupos estão no equilíbrio de Hardy-Weinberg ($P>0,05$). *Modelo dominante e **Modelo recessivo.

Tabela 23. Frequências genótípicas e alélicas do polimorfismo rs266729 do gene *ADIPOQ* em pacientes com DM 2 e controles saudáveis

Polimorfismos/ Modelos	Genótipos Alelos	Controle (n=132)	DM2 (n=133)	P
ADIPOQ, rs266729				0,423
Co-dominante	C/C	67 (50,8%)	72 (54,1%)	0,455*
	C/G	58 (43,9%)	57 (42,9%)	
	G/G	7 (5,3%)	4 (3,0%)	
	H-W (p)	0,216	0,064	
	G-alelo	27,3%	24,4%	
	[95% IC]	[22-33%]	[19-30%]	

DM2, Diabetes *mellitus* tipo 2; Controles, indivíduos sem diabetes; FAM, frequência do alelo menor. As frequências dos polimorfismos estavam dentro do equilíbrio de Hardy-Weinberg; controle ($P=0,216$) e DM2 ($P=0,064$). P-valor, teste do Chi-quadrado para o genótipo e frequências alélicas*. 95% IC-intervalo de confiança de 95%.

Como o polimorfismo rs266729 consiste em uma substituição de uma citosina por uma guanina, na posição -11377, que sobrepõe um dos sítios de ligação do fator de transcrição da proteína de especificidade 1 (Sp1), foi sugerido que os portadores

do alelo G apresentem menores concentrações plasmáticas de adiponectina, ou seja, esse polimorfismo pode afetar a produção deste hormônio (SRINIVASAN *et al.*, 2017).

Autores ressaltaram a associação inversa entre adiponectina e risco de complicações em pacientes com DM1 e DM2 (PRIOR *et al.*, 2009), uma vez que baixas concentrações plasmáticas de adiponectina estão associados à obesidade (ARITA *et al.*, 1999) e DM2 (LINDSAY *et al.*, 2002). Enquanto as concentrações de adiponectina estão elevadas no DM1 (FRYSTYK *et al.*, 2005).

De forma discordante com nossos resultados, foi reportado associação deste polimorfismo com o DM2 nas populações africana (OLCKERS *et al.*, 2007), afro-americana (UKKOLA *et al.*, 2005), indiana (PRAKASH *et al.*, 2015), iraniana (KAFTAN; HUSSAIN, 2015; ALIM; GOODARZI; NEKOEI, 2021) e chinesa (LI *et al.*, 2013). Contudo, também foi reportado falta de associação do polimorfismo rs266729 com DM2 na população de Taiwan (HSIAO; LIN, 2016), japonesa (HARA *et al.*, 2002), italiana (BACCI *et al.*, 2004; CHIODINI *et al.*, 2010), finlandesa (ZACHAROVA; CHIASSON; LAAKSO, 2005) e caucasiana do Reino Unido (GABLE *et al.*, 2007).

Foram reportados resultados discordantes da associação de variantes no gene *ADIPOQ* a vários biomarcadores no Sul da Europa, mas não no Norte. As variantes do gene *ADIPOQ* foram, portanto, consideradas marcadores atualmente pobres para o desenvolvimento do DM2. Sua influência no risco depende significativamente de interações que não são atualmente compreendidas, como variação genética em outros lugares ou com o ambiente da amostra estudada (GABLE *et al.*, 2007).

Os estudos de associação entre o polimorfismo rs266729 do gene *ADIPOQ* e nefropatia diabética DM1 também são conflitantes, sendo encontrado na população dinamarquesa (VIONNET *et al.*, 2006) e americana (ZHANG *et al.*, 2009), mas não na francesa (VIONNET *et al.*, 2006), finlandesas (VIONNET *et al.*, 2006) e sueca (MA *et al.*, 2007). Também já foi relatado por outros autores uma associação entre o alelo C da variante rs266729 e risco de doença cardiovascular em uma amostra de indivíduos participantes do projeto “*Golden Years*” composta por indivíduos com DM1 de longa data (PRIOR *et al.*, 2009).

Deve-se ressaltar que os resultados obtidos, em comparação com a população mundial, podem ser discrepantes devido as diferenças étnicas entre populações, interações gene-ambiente, desenho do estudo, modo de herança e cultura alimentar (SALANTI *et al.*, 2009).

A frequência do alelo menos frequente G nos grupos controle crianças (26% [20-32%]) e adultos (27% [22-33%]) foram similares às populações finlandesa não diabética (ALIMI; GOODARZI; NEKOEI, 2021), inglesa (ALIMI; GOODARZI; NEKOEI, 2021) e italiana (BACCI *et al.*, 2004) e diferentes da indiana (PRAKASH *et al.*, 2015), iraniana (ERFANIAN *et al.*, 2016) e taiwanesa (HSIAO; LIN, 2016) (Tabela 24).

Tabela 24. Levantamento de outros estudos do polimorfismo rs266729

ADIPOQ – rs266729			Genótipo (%)			Alelo MAF (%)
Grupo étnico	Características	N	CC	CG	GG	G
Brasileiros (PRESENTE ESTUDO)	Controle crianças	98	56,1%	35,7%	8,2%	26%
	DM1	98	54,1%	37,7%	8,2%	27%
	Controle adultos	132	50,8%	43,9%	5,3%	27%
	DM2	133	54,1%	42,9%	3,0%	24%
Finlandeses (ALIMI; GOODARZI; NEKOEI, 2021)	Controle	110	50,0%	41,8%	8,2%	29%
	DM2	100	33,0%	58,0%	9,0%	38%
Ingleses (PRIOR <i>et al.</i> , 2009)	Caucasianos com diabetes	739	54,7%	39,8%	5,5%	25%
Indianos (PRAKASH <i>et al.</i> , 2015)	Homens e mulheres	643	80,1%	17,9%	2,0%	11%
Italianos (BACCI <i>et al.</i> , 2004)	Controle	234	50,4%	37,6%	12%	31%
	DM2	142	49,3%	45,8%	4,9%	28%
Taiwaneses (HSIAO; LIN, 2016)	Não diabéticos	1281	46,2%	29,4%	6,1%	21%
Iranianos (ERFANIAN <i>et al.</i> , 2016)	Controle	300	88,3%	11,3%	0,3%	6%
	DM2	300	85%	14%	1%	8%

Resumidamente, o polimorfismo rs266729 do gene *ADIPOQ* não foi associado, na população estudada, ao DM1 e ao DM2, e a frequência do alelo menos frequente G foi similar à de outras populações caucasoides.

5 CONCLUSÃO

- O polimorfismo rs35874116 do gene *TAS1R2* e rs266729 do gene *ADIPOQ* não foram associados ao DM1 de início precoce e ao DM2 na população Euro-Brasileira;
- O polimorfismo rs12033832 do gene *TAS1R2* não foi associado ao DM1 de início precoce na população Euro-Brasileira;
- O genótipo GG do polimorfismo rs12033832 do gene *TAS1R2* foi associado ao aumento de risco para o DM2 em 1,5 vezes (*odds ratio*).

REFERÊNCIAS

- ABBASI, F. *et al.* Discrimination between obesity and insulin resistance in the relationship with adiponectin. **Diabetes**. v. 53, n.3, p. 585-90. 2004.
- ABDELHAMID, G. *et al.* Modulation of NAD(P)H:quinone oxidoreductase by vanadium in human hepatoma HepG2 cells. **Toxicology in Vitro**. v. 24, p. 2010.
- ADA. Standards of Medical Care in Diabetes - 2020. **Diabetes Care**. v. 43, n.supplement 1, p. s1–s212. 2020.
- ADA. Standards of Medical Care in Diabetes -2021. **Diabetes Care**. v. 44, n.Suppl 1, p. 244. 2021.
- ADA. Standards of Medical Care in Diabetes - 2022. **Diabetes Care**. v. 45, n.1, p. 2022.
- AHMADI-ESLAMLOO, H.; MOOSAVI, S. M. S.; DEHGHANI, G. A. Cerebral Ischemia-Reperfusion Injuries in Vanadyl-Treated Diabetic Rats. **IJMS**. v. 42, n.6, p. 544-552. 2017.
- AKINS, M. R.; BENSON, D. L.; GREER, C. A. Cadherin expression in the developing mouse olfactory system. **J. Comp. Neurol.** . v. 501, p. 483–497. 2007.
- AL SIFRI, S. N. *et al.* Results of the Dyslipidemia International Study (DYSIS)-Middle East: Clinical Perspective on the Prevalence and Characteristics of Lipid Abnormalities in the Setting of Chronic Statin Treatment. **PLoS ONE**. v. 9, n.1, p. 2014.
- ALBERS, J. J. *et al.* Prevalence and determinants of elevated apolipoprotein B and dense low-density lipoprotein in youths with type 1 and type 2 diabetes. **J Clin Endocrinol Metab**. v. 93, n.3, p. 735-42. 2008.
- ALESSA, H. B. *et al.* High Fiber and Low Starch Intakes Are Associated with Circulating Intermediate Biomarkers of Type 2 Diabetes among Women. **J Nutr**. v. 146, n.2, p. 306-17. 2016.
- ALI, M. K. *et al.* Achievement of goals in U.S. diabetes care, 1999-2010. **N Engl J Med**. v. 368, n.17, p. 1613-24. 2013.
- ALIABAD, H. B. *et al.* Vanadium complex: an appropriate candidate for killing hepatocellular carcinoma cancerous cells. **BioMetals**. v. p. 1-10. 2018.
- ALIMI, M; GOODARZI, M. T; NEKOEI, M. Association of ADIPOQ rs266729 and rs1501299 gene polymorphisms and circulating adiponectin level with the risk of type 2 diabetes in a population of Iran: a case-control study. **J Diabetes Metab Disord**. v. 20, n.1, p. 87-93. 2021.

ALMEIDA, J. T. R. **Susceptibilidade genética à diabetes mellitus tipo 1: variantes genômicas nas vias de metabolismo da vitamina D.** Bioquímica Universidade Da Beira Interior, Covilhã, 2017.

ALQHAZO, M; RASHAID, A. B. The concentrations of bioelements in the hair samples of Jordanian children who stutter. **International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology**. v. 112, p. 158-162. 2018.

ALVES, A. C. *et al.* GWAS on longitudinal growth traits reveals different genetic factors influencing infant, child, and adult BMI. **Sci. Adv.** v. 5, n. 9, p. eaaw3095. 2019.

AMERICAN DIABETES. Economic Costs of Diabetes in the U.S. in 2017. **Diabetes Care**. v. 41, n.5, p. 917-928. 2018.

ANDREASSON, A. N. *et al.* Leptin and adiponectin: distribution and associations with cardiovascular risk factors in men and women of the general population. **Am. J. Hum. Biol.** v. 24, p. 595–601. 2012.

ARITA, Y. *et al.* Paradoxical Decrease of an Adipose-Specific Protein, Adiponectin, in Obesity. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. v. 257, p. 79–83. 1999.

ATKINSON, M. A; EISENBARTH, G. S; MICHELS, A. W. Type 1 diabetes. **Lancet**. v. 383, n.9911, p. 69-82. 2014.

ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry). Toxicological Profile for Vanadium, Department of Health and Humans Services. **Public Health Service, Centers for Disease Control, Atlanta, GA**, . v. p. 2012.

AURELIANO, M. *et al.* Sarcoplasmic Reticulum Calcium ATPase Is Inhibited by Organic Vanadium Coordination Compounds: Pyridine-2,6-dicarboxylatodioxovanadium(V), BMOV, and an Amavadin Analogue. **Inorg. Chem.** v. 47, p. 5677-5684. 2008.

AURELIANO, M; OHLIN, C. A. Decavanadate in vitro and in vivo effects: facts and opinions. **Journal of Inorganic Biochemistry**. v. 137, p. 123-130. 2014.

AWAZAWA, M. *et al.* Adiponectin enhances insulin sensitivity by increasing hepatic IRS-2 expression via a macrophage-derived IL-6-dependent pathway. **Cell Metab.** v. 13, n.4, p. 401-412. 2011.

BACCI, S. *et al.* The +276 G/T single nucleotide polymorphism of the adiponectin gene is associated with coronary artery disease in type 2 diabetic patients. **Diabetes Care**. v. 27, n.8, p. 2015-20. 2004.

BACHA, F. *et al.* Adiponectin in youth: relationship to visceral adiposity, insulin sensitivity, and beta-cell function. **Diabetes Care**. v. 27, n.2, p. 547-52. 2004.

BAECHLE, C. *et al.* Is Disordered Eating Behavior More Prevalent in Adolescents with Early-Onset Type 1 Diabetes than in Their Representative Peers? **Int J Eat Disord.** v. 47, p. 342–352. 2014.

BAGCHI, A.; MUKHERJEE, P.; RAHA, A. A review on transition metal complex-mordern weapon in medicine. **Int J Recent Adv Pharm Res.** v. 5, n.3, p. 171-180. 2015.

BAHAUDDIN, A. R. *et al.* Association Between TAS1R2 Gene Polymorphism (rs12033832) and Sweet Taste Perception Amongst Malay Obese and Non-obese Subjects. **Malaysian Journal of Medicine and Health Sciences.** v. 16, n.4, p. 4-12. 2020.

BÂLICI, Ș. *et al.* Ultrastructural Analysis of In Vivo Hypoglycemic Effect of Two Polyoxometalates in Rats with Streptozotocin-Induced Diabetes. **Microsc. Microanal.** v. 21, p. 1236-1248. 2015.

BAPTISTELLA, G. B. *et al.* An oxalate-bridged oxovanadium(IV) binuclear complex that improves the in vitro cell uptake of a fluorescent glucose analog. **Polyhedron.** v. 198, p. 2021.

BARAN, E. J. Oxovanadium(IV) and oxovanadium(V) complexes relevant to biological systems. **Journal of Inorganic Biochemistry.** v. 80, p. 1-10. 2000.

BARRAGÁN, R. *et al.* Bitter, Sweet, Salty, Sour and Umami Taste Perception Decreases with Age: Sex-Specific Analysis, Modulation by Genetic Variants and Taste-Preference Associations in 18 to 80 Year-Old Subjects. **Nutrients.** v. 10, n.1538, p. 1-23. 2018.

BARTÁKOVÁ, V. *et al.* Differences in food intake and genetic variability in taste receptors between Czech pregnant women with and without gestational diabetes mellitus. **Eur J Nutr.** v. 57, n.2, p. 513-521. 2016.

BASU, A. *et al.* Ameliorative effect of an oxovanadium (IV) complex against oxidative stress and nephrotoxicity induced by cisplatin. **Redox Report.** v. p. 1-11. 2017.

BATISTA, J. C; FILHO, P. C. D. S; SERRA, O. A. Effect of the vanadium(V) concentration on the spectroscopic properties of nanosized europium-doped yttrium phosphates. **Dalton Transactions.** v. 41, p. 6310-6318. 2017.

BAYE, A. M. *et al.* The Genetics of Adverse Drug Outcomes in Type 2 Diabetes: A Systematic Review. **Front Genet.** v. 12, p. 675053. 2021.

BEHRENS, M; MEYERHOF, W. Gustatory and extragustatory functions of mammalian taste receptors. **Physiology & Behavior.** v. 105, p. 4–13. 2011.

BERG, A. H. *et al.* The adipocyte-secreted protein Acrp30 enhances hepatic insulin action. **Nat Med.** v. 7, n.8, p. 947-53. 2001.

BERNARDIS, L. L. Prediction of carcass fat, water and lean body mass from Lee's "nutritive ratio" in rats with hypothalamic obesity. **Experientia**. v. 26, n.7, p. 789 – 790. 1970.

BEYFUSS, K; HOOD, D. A. A systematic review of p53 regulation of oxidative stress in skeletal muscle. **Redox Report**. v. p. 1-18. 2018.

BISWAS, S; CHIDA, A. S; RAHMAN, I. Redox modifications of protein–thiols: Emerging roles in cell signaling. **Biochemical pharmacology**. v. 7, p. 551-564. 2006.

BJORNSTAD, P; CHERNEY, D; MAAHS, D. M. Early diabetic nephropathy in type 1 diabetes: new insights. **Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes**. v. 21, n.4, p. 279-86. 2014.

BJORNSTAD, P. *et al*. TODAY Study Group. Insulin sensitivity and diabetic kidney disease in children and adolescents with type 2 diabetes: an observational analysis of data from the TODAY clinical trial. **Am J Kidney Dis**. v. 71, n.1, p. 65–74. 2018.

BLAKESLEE, A. F; SALMON, T. N. Genetics of sensory thresholds: individual taste reactions for different substances. **Genetics**. v. 21, p. 84-90. 1935.

BODE, B. W; GARG, S. K. The Emerging Role of Adjunctive Noninsulin Antihyperglycemic Therapy in the Management of Type 1 Diabetes. **Endocr Pract**. v. 22, n.2, p. 220-30. 2016.

BONADONNA, R. C. Alterations of glucose metabolism in type 2 diabetes mellitus. An overview. **Rev Endocr Metab Disord**. v. 5, n.2, p. 89-97. 2004.

BOSE, S. *et al*. Molecular mechanism of bis(maltolato)oxovanadium(IV)-induced insulin signaling in 3T3-L1 and IM9 cells: impact of dexamethasone. **Journal of Molecular Endocrinology**. v. 38, p. 627–649. 2007.

BRADFIELD, J. P. *et al*. A trans-ancestral meta-analysis of genome-wide association studies reveals loci associated with childhood obesity. **Hum. Mol. Genet**. v. 28, p. 3327–3338. 2019.

BRANDÃO, T. A. S; HENGGE, A. C; JOHNSON, S. J. Insights into the Reaction of Protein-tyrosine Phosphatase 1B: crystal structures for transition state analogs of both catalytic steps. **J. Biol. Chem**. v. 285, p. 15874-15883. 2010.

BRANDÃO, T. A. S. *et al*. Impaired Acid Catalysis by Mutation of a Protein Loop Hinge Residue in a YopH Mutant Revealed by Crystal Structures. **J. Am. Chem. Soc**. v. 131, n.2, p. 778–786. 2009.

BRASIL. Conselho Nacional de Controle de Experimentação Nacional – CONCEA. Resolução nº 13, de 20 de setembro de 2013. Diretrizes para a prática de eutanásia do CONCEA. v. p. 2013.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. **Guia Alimentar para a População Brasileira**. Brasília: Ministério da Saúde, 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção Primária à Saúde. Departamento de Promoção da Saúde. **PROTEJA**: Estratégia Nacional para Prevenção e Atenção à Obesidade Infantil: orientações técnicas. Brasília: Ministério da Saúde, 2022.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. **Orientações para a coleta e análise de dados antropométricos em serviços de saúde**: Norma Técnica do Sistema de Vigilância Alimentar e Nutricional - SISVAN / Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde, Departamento de Atenção Básica. Brasília: Ministério da Saúde, 2011.

BRICHARD, S. M; HENQUIN, J. C. The role of vanadium in the management of diabetes. **Trends Pharmacol Sci**. v. 16, n.8, p. 265-270. 1995.

BROWN, S. A; BASU, A; KOVATCHEV, B. P. Beyond HbA1c : using continuous glucose monitoring metrics to enhance interpretation of treatment effect and improve clinical decision-making. **Diabet Med**. v. 36, n.6, p. 679-687. 2019.

BROWNLEE, M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. **Nature**. v. 414, n.6865, p. 813-20. 2001.

BUCHANAN, T. A. *et al*. What is gestational diabetes? **Diabetes Care**. v. 30 Suppl 2, p. S105-11. 2007.

BUFE, B. *et al*. The Molecular Basis of Individual Differences in Phenylthiocarbamide and Propylthiouracil Bitterness Perception. **Curr Biol**. v. 15, n.4, p. 322–327. 2005.

BUSE, J. B. *et al*. Primary prevention of cardiovascular diseases in people with diabetes mellitus: a scientific statement from the American Heart Association and the American Diabetes Association. **Diabetes Care**. v. 30, n.1, p. 162-72. 2007.

CAKIR, Y; YILDIZ, D. Efflux of glutathione and glutathione complexes from human erythrocytes in response to vanadate. **Blood Cells, Molecules, and Diseases**. v. 50, p. 1-7. 2013.

CAM, M. C; BROWNSEY, R. W; MCNEILL, J. H. Mechanisms of vanadium action: insulin-mimetic or insulin-enhancing agent? **Can J Physiol Pharmacol**. v. 78, n.10, p. 829-847. 2000.

CANDLER, T. P. *et al*. Continuing rise of Type 2 diabetes incidence in children and young people in the UK. **Diabet Med**. v. 35, n.6, p. 737-744. 2018.

CANTLEY, L. C. *et al*. Vanadate is a potent (Na, K)-ATPase inhibitor found in ATP derived from muscle. **J Biol Chem**. v. 252, p. 7421–7423. 1977.

CAO, Y. *et al.* Two New Oxovanadium(IV) Compounds Containing Amino Acid Schiff Base and 1,10-Bathophenanthroline Ligands: Syntheses, Crystal Structures, and In Vitro Evaluation of the Anticancer Activities. **Aust. J. Chem.** v. 70, p. 608–613. 2017.

CAO, Y. *et al.* Syntheses, crystal structures and in vitro anticancer activities of oxovanadium(IV) complexes of amino acid Schiff base and 1,10-phenanthroline ligands. **Transition Met Chem.** v. 41, n.5, p. 531–538. 2016.

CARMELLI, D; CARDON, L. R; FABSITZ, R. Clustering of hypertension, diabetes, and obesity in adult male twins: same genes or same environments? **Am J Hum Genet.** v. 55, n.3, p. 566-73. 1994.

CARPÉNÉ, C. *et al.* Insulin-mimetic compound hexakis (benzylammonium) decavanadate is antilipolytic in human fat cells. **World J Diabetes.** v. 8, n.4, p. 143-153. 2017.

CAXAMBÚ, A. L. R. L; CARROCINI, M. M. S; THOMAZELLI, F. C. S. Prevalência das alterações de enzimas hepáticas relacionadas à doença hepática gordurosa não-alcoólica em pacientes com Diabetes Mellitus. **Arq. Catarin Med.** v. 44, n.1, p. 03-13. 2015.

CERIOTTI, F. *et al.* Reference Intervals for Serum Creatinine Concentrations: Assessment of Available Data for Global Application. **Clinical Chemistry.** v. 54, n.3, p. 559–566. 2008.

CHAO, A. M. *et al.* Stress, cortisol, and other appetite-related hormones: Prospective prediction of 6-month changes in food cravings and weight. . **Obesity.** v. 25, p. 713-720. 2017.

CHAUDHURY, A. *et al.* Clinical Review of Antidiabetic Drugs: Implications for Type 2 Diabetes Mellitus Management. **Front Endocrinol (Lausanne).** v. 8, p. 6. 2017.

CHEN, C. Y. *et al.* α -Hydroxy coordination of mononuclear vanadyl citrate, malate and S-citramalate with N-heterocycle ligand, implying a new protonation pathway of iron–vanadium cofactor in nitrogenase. **Journal of Inorganic Biochemistry.** v. 141, p. 114–120. 2014.

CHILLARON, J. J. *et al.* Type 1 diabetes, metabolic syndrome and cardiovascular risk. **Metabolism.** v. 63, n.2, p. 181-7. 2014.

CHIODINI, B. D. *et al.* Adiponectin gene polymorphisms and their effect on the risk of myocardial infarction and type 2 diabetes: an association study in an Italian population. **Ther Adv Cardiovasc Dis.** v. 4, n.4, p. 223-30. 2010.

CHOI, J. H. TAS1R2 sweet taste receptor genetic variation and dietary intake in Korean females. **Appetite.** v. 105281, p. 1-7. 2021.

CHOI, J. H. *et al.* Genetic variations in taste perception modify alcohol drinking behavior in Koreans. **Appetite.** v. 113, n.1, p. 178-186. 2017.

CHOI, S. R. *et al.* Adiponectin receptor agonist AdipoRon decreased ceramide, and lipotoxicity, and ameliorated diabetic nephropathy. **Metabolism**. v. 85, p. 348-360. 2018.

CHOQUET, H; MEYRE, D. Genetics of Obesity: What have we Learned? **Current Genomics**. v. 12, p. 169-179. 2011.

CLARK, J; TAYLOR, C. G; ZAHRAKKA, P. Exploring the Cardio-metabolic Relevance of T-cadherin: A Pleiotropic Adiponectin Receptor. **Immune Disord. Drug Targets**. v. 17, p. 200–206. 2017.

CLARK, T. A. *et al.* Alternative therapies for diabetes and its cardiac complications: role of vanadium. **Heart Fail Rev**. v. 19, p. 123–132. 2014.

CLELAND, S. J. *et al.* Insulin resistance in type 1 diabetes: what is 'double diabetes' and what are the risks? **Diabetologia**. v. 56, n.7, p. 1462-70. 2013.

COBBINA, E. *et al.* Binding of Oxovanadium(IV) Complexes to Blood Serum Albumins. **J. Mex. Chem. Soc.** v. 57, n.3, p. 180-191. 2013.

COHEN, M. D. *et al.* Pulmonary Immunotoxic Potentials of Metals Are Governed by Select Physicochemical Properties: Vanadium Agents. **Journal of Immunotoxicology**. v. 4, p. 49-60. 2007.

COLHOUN, H. M. *et al.* Lipoprotein subclasses and particle sizes and their relationship with coronary artery calcification in men and women with and without type 1 diabetes. **Diabetes**. v. 51, n.6, p. 1949-56. 2002.

COLLINS, F. S; GUYER, M. S; CHARKRAVARTI, A. Variations on a theme: cataloging human DNA sequence variation. **Science**. v. 278, n.5343, p. 1580-1. 1997.

CONG, X. Q. *et al.* Bis(maltolato)oxovanadium(IV) (BMOV) Attenuates Apoptosis in High Glucose-Treated Cardiac Cells and Diabetic Rat Hearts by Regulating the Unfolded Protein Responses (UPRs). **Biol Trace Elem Res**. v. p. 2016.

CONWAY, B. *et al.* Temporal patterns in overweight and obesity in Type 1 diabetes. **Diabet Med**. v. 27, n.4, p. 398-404. 2010.

CONWAY, J; LANCE, C. What Reviewers Should Expect from Authors Regarding Common Method Bias in Organizational Research. **Journal of Business and Psychology**. v. 25, n.3, p. 325-334. 2010.

COOK, J. R; SEMPLE, R. K. Hypoadiponectinemia—Cause or Consequence of Human “Insulin Resistance”? **J Clin Endocrinol Metab**. v. 95, n.4, p. 1544–1554, 2010.

CORREIA, I. *et al.* Interaction of [VIVO(acac)₂] with human serum transferrin and albumin. **Chem Asian J**. v. 12, n.16, p. 2062–2084, 2017.

COSTA-PESSOA, J. *et al.* Vanadium and proteins: uptake, transport, structure, activity and function. **Coord Chem Rev.** v. 301–302, p. 49–86, 2015.

COSTA-PESSOA, J. *et al.* New insights on vanadium binding to human serum transferrin. **Inorganica Chimica Acta.** v. 420, p. 60–68, 2013.

COSTA PESSOA, J; TOMAZ, I. Transport of Therapeutic Vanadium and Ruthenium Complexes by Blood Plasma Components. **Current Medicinal Chemistry.** v. 17, p. 3701-3738, 2010.

COSTA PESSOA, J. *et al.* The systems V(IV)O(2+)-glutathione and related ligands: a potentiometric and spectroscopic study. **J Biol Inorg Chem.** v. 7, p. 225–240, 2002.

CRAIG, M. E. *et al.* ISPAD Clinical Practice Consensus Guidelines 2014. Definition, epidemiology, and classification of diabetes in children and adolescents. **Pediatr Diabetes.** v. 15, n.Suppl 20, p. 4-17, 2014.

CRANS, D; BUNCH, R. L; THEISEN, L. A. Interaction of Trace Levels of Vanadium(IV) and Vanadium(V) in Biological Systems. **J. Am. Chem. Soc.** v. 111, p. 7597-7607, 1989.

CRANS, D. C. *et al.* The Chemistry and Biochemistry of Vanadium and the Biological Activities Exerted by Vanadium Compounds. **Chem. Rev.** v. 104, p. 849-902. 2004.

CRANS, D. C. *et al.* How environment affects drug activity: Localization, compartmentalization and reactions of a vanadium insulin-enhancing compound, dipicolinatooxovanadium(V). **Coordination Chemistry Reviews.** v. 255, p. 2178–2192, 2011.

CRANS, D. C. *et al.* Health Benefits of Vanadium and Its Potential as an Anticancer Agent. **Metal Ions in Life Sciences.** v. 18, p. 251–279, 2018.

CROSSON, M. S. *et al.* Taste Receptor Cells in Mice Express Receptors for the Hormone Adiponectin. **Chem. Senses.** v. 44, p. 409–422, 2019.

CRYER, P. E. Mechanisms of hypoglycemia-associated autonomic failure in diabetes. **N Engl J Med.** v. 369, n.4, p. 362-72, 2013.

CUI, H; LÓPEZ, M; RAHMOUNI, K. The cellular and molecular bases of leptin and ghrelin resistance in obesity. **Nat Rev Endocrinol.** v. 13, p. 338-351, 2017.

CUSCHIERI, S. The genetic side of type 2 diabetes - A review. **Diabetes Metab Syndr.** v. 13, n.4, p. 2503-2506, 2019.

CUSI, K. *et al.* Vanadyl Sulfate Improves Hepatic and Muscle Insulin Sensitivity in Type 2 Diabetes. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism.** v. 86, n.3, p. 1410-1417, 2010.

DA ROCHA FERNANDES, J. *et al.* IDF Diabetes Atlas estimates of 2014 global health expenditures on diabetes. **Diabetes Res Clin Pract.** v. 117, p. 48-54, 2016.

DAI, S; VERA, E; MCNEILL, J. H. Lack of Haematological Effect of Oral Vanadium Treatment in Rats. **Pharmacology & Toxicology**. v. 76, p. 263-268, 1995.

DANNE, T. *et al.* Sotagliflozin Added to Optimized Insulin Therapy Leads to Lower Rates of Clinically Relevant Hypoglycemic Events at Any HbA1c at 52 Weeks in Adults with Type 1 Diabetes. **Diabetes technology & therapeutics**. v. 21, n.9, p. 471-477, 2019.

DAVIES, D. R; HOL, W. G. J. The power of vanadate in crystallographic investigations of phosphoryl transfer enzymes. **FEBS Letters**. v. 577, p. 315–321, 2004.

DE CREMER, K. *et al.* Fractionation of vanadium complexes in serum, packed cells and tissues of Wistar rats by means of gel filtration and anion-exchange chromatography. **J Biol Inorg Chem**. v. 7, p. 884–890, 2002.

DE MORAIS, H. *et al.* Sub-chronic treatment with cannabidiol but not with URB597 induced a mild antidepressant-like effect in diabetic rats. **Neuroscience Letters**. v. 682, p. 62–68, 2018.

DEGANI, H. *et al.* Electron Paramagnetic Resonance Studies and Insulin-like Effects of Vanadium in Rat Adipocytes. **Biochemistry**. v. 20, p. 5795-5799, 1981.

DELGADO, T. C. *et al.* Uptake and metabolic effects of insulin mimetic oxovanadium compounds in human erythrocytes. **J Inorg Biochem**, v. 12, p. 2328-2339, 2005.

DENZEL, M. S. *et al.* T-cadherin is critical for adiponectin-mediated cardioprotection in mice. **J Clin Invest**. v. 120, n.12, p. 4342-52, 2010.

DESAI, M.; JELLYMAN, J.; ROSS, M. Epigenomics, gestational programming and risk of metabolic syndrome. **International journal of obesity**. v. 39, n.4, p. 633, 2015.

DIAB, M. A.; HASSAN, B.; EL-MEZAYEN, H. A. Possible Therapeutic Role of Novel Vanadium Complexes in Diabetes Mellitus Animal Models. **Scientific Journal for Damietta Faculty of Science**. v. 8, n.1, p. 84–92, 2018.

DIABETES CONTROL AND COMPLICATIONS TRIAL RESEARCH GROUP. *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**. v. 329, n.14, p. 977-86, 1993.

DIAS, A. G. *et al.* Variation in the TAS1R2 Gene, Sweet Taste Perception and Intake of Sugars. **J. Nutrigenet Nutrigenomics**. v. 8, p. 81–90, 2015.

DIBLEY, M. J. *et al.* Development of normalized curves for the international growth reference: historical and technical considerations. **Am J Clin Nutr**. v. 46, p. 736-748, 1987.

DIVERS, J. *et al.* Trends in Incidence of Type 1 and Type 2 Diabetes Among Youths - Selected Counties and Indian Reservations, United States, 2002-2015. **MMWR Morb Mortal Wkly Rep.** v. 69, n.6, p. 161-165, 2020.

DOMINGO, J. L; GÓMEZ, M. Vanadium compounds for the treatment of human diabetes mellitus: A scientific curiosity? A review of thirty years of research. **Food and Chemical Toxicology.** v. 95, p. 137–141, 2016.

DONAGHUE, K. C. *et al.* ISPAD Clinical Practice Consensus Guidelines 2014. Microvascular and macrovascular complications in children and adolescents. **Pediatr Diabetes.** v. 15 Suppl 20, p. 257-69, 2014.

DONNELLY, L. A. *et al.* Frequency and predictors of hypoglycaemia in Type 1 and insulin-treated Type 2 diabetes: a population-based study. **Diabet Med.** v. 22, n.6, p. 749-55, 2005.

DORIA, A; PATTI, M. E.; KAHN, C. R. The emerging genetic architecture of type 2 diabetes. **Cell Metab.** v. 8, n.3, p. 186-200, 2008.

DOTSON, C. D. *et al.* Bitter Taste Receptors Influence Glucose Homeostasis. **PLoS ONE.** v. 3, n.12, p. 1-10, 2008.

DUBYAK, G. R; KLEINZELLER, A. The insulin-mimetic effects of vanadate in isolated rat adipocytes. Dissociation from effects of vanadate as a (Na⁺-K⁺)ATPase inhibitor. . **J. Biol. Chem.** v. 255, n.11, p. 5306–5312, 1980.

DYER, J. *et al.* Expression of sweet taste receptors of the T1R family in the intestinal tract and enteroendocrine cells. **Biochemical Society Transactions.** v. 33, n.1, p. 302-305, 2005.

EISSA, A. T. B. Investigate the relation between Adiponectin gene variants and cardiovascular comorbidities and diabetes. **International Journal of Health Sciences.** v. 10, n.2, p. 184-189, 2016.

EIZIRIK, D. L; MANDRUP-POULSEN, T. A choice of death—the signal-transduction of immune-mediated beta-cell apoptosis. **Diabetologia.** v. 44, p. 2115–2133. 2001.

EJELONU, B. C. Metal complexes: effective approach for the management of diabetes mellitus. **Eur J Biomed Pharm sci.** v. 3, n.9, p. 211–217, 1980.

ELLIOTT, R. A; KAPOOR, S; TINCELLO, D. G. Expression and Distribution of the Sweet Taste Receptor Isoforms T1R2 and T1R3 in Human and Rat Bladders. **The journal of urology,** v. 186, p. 2455-2462, 2011.

ENY, K. M. *et al.* Genetic variation in TAS1R2 (Ile191Val) is associated with consumption of sugars in overweight and obese individuals in 2 distinct populations. **Am J Clin Nutr.** v. 92, p. 1501–1510, 2010.

EQANI, S. A. M. A. S. *et al.* Occurrence of selected elements (Ti, Sr, Ba, V, Ga, Sn, TI, and Sb) in deposited dust and human hair samples: implications for human health in Pakistan. **Environ Sci Pollut Res**. v. 25, n.13, p. 12234–12245, 2018.

ERFANIAN, S. *et al.* Data describing the association between rs266729 polymorphism in adiponectin promoter gene and Type 2 Diabetes Mellitus. **Data in Brief**. v. 9, p. 1138-1140, 2016.

ESBAK, H. *et al.* Aminoacid-derivatised picolinate-oxidovanadium(IV) complexes: Characterisation, speciation and ex vivo insulin-mimetic potential. **Journal of Inorganic Biochemistry**. v. 103, p. 590–600, 2009.

EVANGELOU, A. M. Vanadium in cancer treatment. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**. v. 42, p. 249–265. 2002.

FAGOT-CAMPAGNA, A. Emergence of type 2 diabetes mellitus in children: epidemiological evidence. **J Pediatr Endocrinol Metab**. v. 13, n.Suppl 6, p. 1395-402. 2000.

FAWCETT, J. P. *et al.* Oral Vanadyl Sulphate Does not Affect Blood Cells, Viscosity or Biochemistry in Humans. **Pharmacology & Toxicology**. v. 80, p. 202-206. 1997.

FEINGOLD, K. R. Oral and Injectable (Non-Insulin) Pharmacological Agents for the Treatment of Type 2 Diabetes. In: FEINGOLD, K. R. *et al.* **Endotext**. South Dartmouth (MA), 2000

FICKL, H. *et al.* Vanadium promotes hydroxyl radical formation by activated human neutrophils. **Free Radical Biology & Medicine**. v. 40, p. 146 – 155. 2006.

FLACHS, P. *et al.* Polyunsaturated fatty acids of marine origin induce adiponectin in mice fed a high-fat diet. **Diabetologia**. v. 49, n.2, p. 394-7. 2006.

FOLARIN, O. R. *et al.* Brain Metal Distribution and Neuro-Inflammatory Profiles after Chronic Vanadium Administration and Withdrawal in Mice. **Frontiers in Neuroanatomy**. v. 11, n.58, p. 1-15. 2017.

FOSTER, S. R. *et al.* Expression, Regulation and Putative Nutrient-Sensing Function of Taste GPCRs in the Heart. **PLoS ONE**. v. 8, n.5, p. 1-11. 2013.

FRANCIK, R. *et al.* Bis(4,4'-dimethyl-2,2'-bipyridine)oxidovanadium(IV) Sulfate Dehydrate: Potential Candidate for Controlling Lipid Metabolism? **BioMed Research International**. v. p. 1-5. 2017.

FRAQUEZA, G. *et al.* Decavanadate, decaniobate, tungstate and molybdate interactions with sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase: quercetin prevents cysteine oxidation by vanadate but does not reverse ATPase inhibition. **Dalton Trans**. v. 41, p. 12749–12758. 2012.

- FREITAS, A. *et al.* Appetite-Related Eating Behaviours: An Overview of Assessment Methods, Determinants and Effects on Children's Weight. **Ann Nutr Metab.** v. 73, p. 19–29. 2018.
- FRUEBIS, J. *et al.* Proteolytic Cleavage Product of 30-Kda Adipocyte Complement-Related Protein Increases Fatty Acid Oxidation in Muscle and Causes Weight Loss in Mice. **Proc. Natl Acad. Sci. USA.** v. 98, p. 2005–2010. 2001.
- FRYSTYK, J. *et al.* Increased serum adiponectin levels in type 1 diabetic patients with microvascular complications. **Diabetologia.** v. 48, n.9, p. 1911-8. 2005.
- FU, Y. *et al.* Vanadyl bisacetylacetonate induced G1/S cell cycle arrest via high-intensity ERK phosphorylation in HepG2 cells. **J Biol Inorg Chem.** v. 13, p. 1001–1009. 2008.
- FUGONO, J; YASUI, H; SAKURAI, H. Improvement of diabetic states in streptozotocin-induced type 1 diabetic rats by vanadyl sulfate in enteric-coated capsules. **Journal of Pharmacy and Pharmacology.** v. 57, n.5, p. 665-669. 2005.
- FUJISHIMA, Y. *et al.* Adiponectin association with T-cadherin protects against neointima proliferation and atherosclerosis. **FASEB J.** v. 31, n.4, p. 1571-1583. 2017.
- FULLER, J. L. Single-locus control of saccharin preference in mice. **J. Hered.** v. 65, p. 33–36. 1974.
- FURUKAWA, S. *et al.* Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. **J Clin Invest.** v. 114, n.12, p. 1752-61. 2004.
- GABLE, D. R. *et al.* Common adiponectin gene variants show different effects on risk of cardiovascular disease and type 2 diabetes in European subjects. **Ann Hum Genet.** v. 71, n. 4, p. 453-66. 2007.
- GAEDE, P. *et al.* Effect of a multifactorial intervention on mortality in type 2 diabetes. **N Engl J Med.** v. 358, n.6, p. 580-91. 2008.
- GALE, S. M; CASTRACANE, V. D; MANTZOROS, C. S. Energy homeostasis, obesity and eating disorders: recent advances in endocrinology. **J Nutr.** v. 134, n.2, p. 295-8. 2004.
- GALINDO, M. M. *et al.* Taste Preferences. In. **Progress in Molecular Biology and Translational Science:** Elsevier, 2012
- GALLARDO-VERA, F. *et al.* Vanadium pentoxide increased PTEN and decreased SHP1 expression in NK-92MI cells, affecting PI3K-AKT-mTOR and Ras-MAPK pathways. **Journal of Immunotoxicology.** v. 15, n.1, p. 1-11. 2018.
- GANDA, O. P; ROSSINI, A. A; LIKE, A. A. Studies on Streptozotocin Diabetes. **Diabetes.** v. 25, n.7, p. 595-603. 1976.

GAO, Z. *et al.* Vanadyl bisacetylacetonate protects b cells from palmitate-induced cell death through the unfolded protein response pathway. **J Biol Inorg Chem**. v. 16, p. 789–798. 2011.

GARCIA-BAILO, B. *et al.* Genetic Variation in Taste and Its Influence on Food Selection. **Journal of Integrative Biology**. v. 13, n.1, p. 69-80. 2009.

GHIO, A. J. *et al.* Divalent metal transporter-1 decreases metal-related injury in the lung. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**. v. 289, p. L460–L467. 2005.

GOLDFINE, A. *et al.* Metabolic Effects of Vanadyl Sulfate in Humans With Non-Insulin-Dependent Diabetes Mellitus: In Vivo and In Vitro Studies. **Metabolism**. v. 49, n.3, p. 400-410. 2000.

GOLDFINE, A. *et al.* Metabolic effects of sodium metavanadate in humans with insulin-dependent and noninsulin-dependent diabetes mellitus in vivo and in vitro studies. **J Clin Endocrinol Metab**. v. 80, n.11, p. 3311-3320. 1995.

GOMEZ-LLORENTE, M. A. *et al.* Obesity and Asthma: A Missing Link. **Int J Mol Sci**. v. 18, n.7, p. 2017.

GORZSÁS, A; ANDERSSON, I; PETTERSSON, L. Speciation in the aqueous H⁺/H₂VO₄⁻/H₂O₂/L-(+)-lactate system. **Dalton Trans**. v. p. 2503-2511. 2003.

GOTTESMAN, M. E; MUSTAEV, A. Inorganic phosphate, arsenate, and vanadate enhance exonuclease transcript cleavage by RNA polymerase by 2000-fold. **PNAS**. v. 115, n.11, p. 2746–2751. 2018.

GOULD, T. D; DAO, D. T; KOVACSICS, C. E. Mood and Anxiety Related Phenotypes in Mice: The Open Field Test. **Neuromethods**. v. 42, p. 21-41. 2009.

GUILLOD-MAXIMIN, E. *et al.* Adiponectin receptors are expressed in hypothalamus and colocalized with proopiomelanocortin and neuropeptide Y in rodent arcuate neurons. **J. Endocrinol**. v. 200, p. 93–105. 2008.

GULDEN, E.; WONG, F. S.; WEN, L. The gut microbiota and Type 1 Diabetes. **Clin Immunol**. v. 159, n.2, p. 143-53. 2015.

GUY, J. *et al.* Lipid and lipoprotein profiles in youth with and without type 1 diabetes: the SEARCH for Diabetes in Youth case-control study. **Diabetes Care**. v. 32, n.3, p. 416-20. 2009.

HABBERSTAD, C.; DRAKE, I.; SONESTEDT, E. Variation in the sweet Taste receptor gene and Dietary intake in a swedish Middle-aged Population. **Frontiers in Endocrinology**. v. 8, n.348, p. 1-6. 2017.

HALLSTRÖM, S. *et al.* Characteristics of Continuous Glucose Monitoring Metrics in Persons with Type 1 and Type 2 Diabetes Treated with Multiple Daily Insulin Injections. **Diabetes Technol Ther**. v. 23, n.6, p. 425-433. 2021.

HAN, P.; KEAST, R. S. J.; ROURA, E. Salivary leptin and TAS1R2/TAS1R3 polymorphisms are related to sweet taste sensitivity and carbohydrate intake from a buffet meal in healthy young adults. **British Journal of Nutrition**. v. 118, n.10, p. 763-770. 2017.

HAN, Q.; DING, Y. Recent advances in the field of light-driven water oxidation catalyzed by transition-metal substituted polyoxometalates. **Dalton Trans**. v. 47, p. 8180–8188. 2013.

HAN, S. H. *et al.* Adiponectin and cardiovascular disease: response to therapeutic interventions. **J Am Coll Cardiol**. v. 49, n.5, p. 531-8. 2007.

HANNONEN, R. *et al.* Academic skills in children with early-onset type 1 diabetes: the effects of diabetes-related risk factors. **DEVELOPMENTAL MEDICINE & CHILD NEUROLOGY**. v. 54, p. 457-463. 2012.

HARA, K. *et al.* Genetic variation in the gene encoding adiponectin is associated with an increased risk of type 2 diabetes in the Japanese population. **Diabetes**. v. 51, n.2, p. 536-40. 2002.

HARJUTSALO, V.; FORSBLOM, C.; GROOP, P.-H. Time trends in mortality in patients with type 1 diabetes: nationwide population based cohort study. **BMJ**. v. 343, n.d5364, p. 1-11. 2011.

HARNISCHFEGGER, F.; DANDO, R. Obesity-induced taste dysfunction, and its implications for dietary intake. **Int J Obes (Lond)**. v. 45, n.8, p. 1644-1655. 2021.

HARRIS, K. *et al.* Adjunctive therapy for glucose control in patients with type 1 diabetes. **Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy**. v. 11, p. 159–173. 2018.

HARRIS, W. R.; CARRANO, C. J. Binding of Vanadate to Human Serum Transferrin. **J Inorg Biochem**. v. 22, n.3, p. 201–218. 1984.

HASIN, Y.; SELDIN, M.; LUSIS, A. Multi-omics approaches to disease. **Genome Biol**. v. 18, n.1, p. 83. 2017.

HASS, N.; SCHWARZENBACHER, K.; BREER, H. T1R3 is expressed in brush cells and ghrelin-producing cells of murine stomach. **Cell Tissue Res**. v. 339, p. 493–504. 2010.

HATTERSLEY, A. T.; PATEL, K. A. Precision diabetes: learning from monogenic diabetes. **Diabetologia**. v. 60, n.5, p. 769-777. 2017.

HAZNEDAROĞLU, E. *et al.* Association of Sweet Taste Receptor Gene Polymorphisms with Dental Caries Experience in School Children. **Caries Res**. v. 49, p. 475–281. 2015.

HE, Z. *et al.* Alzheimer's Disease and Diabetes Mellitus in Comparison: The Therapeutic Efficacy of the Vanadium Compound. **Int J Mol Sci**. v. 22, n.21, p. 2021.

HEINEMANN, G. *et al.* Binding of vanadate to human albumin in infusion solutions, to proteins in human fresh frozen plasma, and to transferrin. **Journal of Inorganic Biochemistry**. v. 90, p. 38–42. 2002.

HEINEMANN, G.; FICHTL, B.; VOGT, W. Pharmacokinetics of vanadium in humans after intravenous administration of a vanadium containing albumin solution. **Br Clin Pharmacol**. v. 55, p. 241–245. 2003.

HENQUIN, J.-C. Do Pancreatic B Cells “Taste” Nutrients to Secrete Insulin? **METABOLISM**. v. 5, n.239, p. 2012.

HERMAN, J. B.; MEDALIE, J. H.; GOLDBOURT, U. Diabetes, prediabetes and uricaemia. **Diabetologia**. v. 12, n.1, p. 47-52. 1976.

HEYLIGER, C.; TAHILIANI, A.; MCNEILL, J. Effect of Vanadate on Elevated Blood Glucose and Depressed Cardiac Performance of Diabetic Rats. **Science**. v. 227, n.4693, p. 1474–1477. 1985.

HIROMURA, M. *et al.* Action mechanism of bis(allixinato)oxovanadium(IV) as a novel potent insulin-mimetic complex: regulation of GLUT4 translocation and FoxO1 transcription factor. **J Biol Inorg Chem**. v. 12, p. 1275–1287. 2007.

HOLLA, L. I. *et al.* GLUT2 and TAS1R2 Polymorphisms and Susceptibility to Dental Caries. **Caries Res**. v. 49, p. 417–424. 2015.

HOLLAND, W. L. *et al.* Receptor-mediated activation of ceramidase activity initiates the pleiotropic actions of adiponectin. **Nat Med**. v. 17, n.1, p. 55-63. 2011.

HOWLADER, M. *et al.* Adiponectin gene polymorphisms associated with diabetes mellitus: A descriptive review. **Heliyon**. v. 7, n.8, p. e07851. 2021.

HSIAO, T. J.; LIN, E. A Validation Study of Adiponectin rs266729 Gene Variant with Type 2 Diabetes, Obesity, and Metabolic Phenotypes in a Taiwanese Population. **Biochem Genet**. v. 54, n.6, p. 830-841. 2016.

HUANG, C. *et al.* Vanadium-induced Nuclear Factor of Activated T Cells Activation through Hydrogen Peroxide. **The journal of biological chemistry**. v. 276, n.25, p. 22397–22403. 2001.

HUANG, C. *et al.* Vanadate Induces p53 Transactivation through Hydrogen Peroxide and Causes Apoptosis. **The journal of biological chemistry**. v. 275, n.42, p. 32516–32522. 2000.

HUBÁČEK, J. A. *et al.* FTO Variant, Energy Intake, Physical Activity and Basal Metabolic Rate in Caucasians. The HAPIEE Study. **Physiol. Res**. v. 60, p. 175–183. 2011.

HUG, C. *et al.* T-cadherin is a receptor for hexameric and high-molecularweight forms of Acrp30/adiponectin. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**. v. 101, p. 10308–10313. 2004.

HWANG, S.-L.; CHANG, H. W. Natural vanadium-containing Jeju ground water stimulates glucose uptake through the activation of AMP-activated protein kinase in L6 myotubes. **Mol Cell Biochem**. v. 360, n.1-2, p. 401-409. 2012.

IDF (International Diabetes Federation). **Diabetes Atlas**. Brussels, Belgium: International Diabetes Federation, 2021.

IGLESIAS-GONZÁLEZ, T. *et al.* Absorption, transport and insulin-mimetic properties of bis(maltolato)oxovanadium (IV) in streptozotocin-induced hyperglycemic rats by integrated mass spectrometric techniques. **Anal Bioanal Chem**. v. 402, p. 277–285. 2012.

ILONEN, J. *et al.* Environmental factors and primary prevention in type 1 diabetes. **Pediatr Endocrinol Diabetes Metab**. v. 15, n.4, p. 227-32. 2009.

IMTIAZ, M. *et al.* Vanadium, recent advancements and research prospects: A review. **Environ Int**. v. 80, p. 79-88. 2015.

IMURA, H. *et al.* Vanadium Toxicity in Mice: Possible Impairment of Lipid Metabolism and Mucosal Epithelial Cell Necrosis in the Small Intestine. **Toxicologic Pathology**. v. 41, p. 842-856. 2013.

INGELSSON, E.; MCCARTHY, M. I. Human Genetics of Obesity and Type 2 Diabetes Mellitus: Past, Present, and Future. **Circ Genom Precis Med**. v. 11, n.6, p. e002090. 2018.

IRVING, E.; STOKER, A. W. Vanadium Compounds as PTP Inhibitors. **Molecules**. v. 22, p. 2269-2288. 2017.

ISLAM, M. K. *et al.* Reduction of vanadium(V) to vanadium(IV) by NADPH, and vanadium(IV) to vanadium(III) by cysteine methyl ester in the presence of biologically relevant ligands. **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 1170, p. 1212–1218. 2007.

IVOVIC, A. *et al.* IKK β inhibition prevents fat-induced beta cell dysfunction in vitro and in vivo in rodents. **Diabetologia**. v. 60, n.10, p. 2021–2032. 2017.

IWAKAMI, S. *et al.* Concentration-dependent Dual Effects of Hydrogen Peroxide on Insulin Signal Transduction in H4IIEC Hepatocytes. **PLoS ONE**. v. 6, n.11, p. 1-11. 2011.

IWATSUKI, K.; UNEYAMA, H. Sense of taste in the gastrointestinal tract. **J Pharmacol Sci**. v. 118, n.2, p. 123-128. 2012.

JACOBSEN, L.; SCHATZ, D. Current and future efforts toward the prevention of type 1 diabetes. **Pediatr Diabetes**. v. 17 Suppl 22, p. 78-86. 2016.

JANG, H. J. *et al.* Gut-expressed gustducin and taste receptors regulate secretion of glucagon-like peptide-1. **Proc Natl Acad Sci U S A**. v. 104, n.38, p. 15069-74. 2007.

JANSSEN, S. *et al.* Bitter taste receptors and α -gustducin regulate the secretion of ghrelin with functional effects on food intake and gastric emptying. **Proc Natl Acad Sci U S A**. v. 108, n.5, p. 2094-9. 2011.

JASPERS, I. *et al.* Vanadium-Induced kB-Dependent Transcription Depends upon Peroxide-Induced Activation of the p38 Mitogen-Activated Protein Kinase. **American journal of respiratory cell and molecular biology**. v. 23, p. 95-102. 2000.

JHANG, K. A. *et al.* Resveratrol ameliorates tau hyperphosphorylation at Ser396 site and oxidative damage in rat hippocampal slices exposed to vanadate: Implication of ERK1/2 and GSK-3 β signaling cascades. **J. Agric. Food Chem.** v. 65, n.44, p. 1-34. 2018.

JIANG, B. *et al.* Protective effects of marein on high glucose-induced glucose metabolic disorder in HepG2 cells. **Phytomedicine**. v. 23, p. 891–900. 2016.

JOHNSON, R. J. *et al.* Hypothesis: Could Excessive Fructose Intake and Uric Acid Cause Type 2 Diabetes? **Endocrine Reviews**. v. 30, n.1, p. 96–116. 2009.

KADOWAKI, T. *et al.* Adiponectin and adiponectin receptors in insulin resistance, diabetes, and the metabolic syndrome. **J Clin Invest**. v. 116, n.7, p. 1784-92. 2006.

KAFTAN, A. N.; HUSSAIN, M. K. Association of adiponectin gene polymorphism rs266729 with type two diabetes mellitus in Iraqi population. A pilot study. **Gene**. v. 570, p. 95–99. 2015.

KAHN, S. E.; HULL, R. L.; UTZSCHNEIDER, K. M. Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. **Nature**. v. 444, n.7121, p. 840–846. 2006.

KALRA, S.; GUPTA, Y. Ambulatory glucose profile: Flash glucose monitoring. **J Pak Med Assoc**. v. 65, n.12, p. 1360-2. 2015.

KANSANEN, E. *et al.* The Keap1-Nrf2 pathway: Mechanisms of activation and dysregulation in cancer. **Redox Biology**. v. 1, p. 45–49. 2013.

KARLSSON, K. E. *et al.* Comparisons of Analysis Methods for Proof-of-Concept Trials. **CPT Pharmacometrics Syst Pharmacol**. v. 2, p. e23. 2013.

KERSHNAR, A. K. *et al.* Lipid abnormalities are prevalent in youth with type 1 and type 2 diabetes: the SEARCH for Diabetes in Youth Study. **J Pediatr**. v. 149, n.3, p. 314-9. 2006.

KESKITALO, K. *et al.* Genetic and environmental contributions to food use patterns of young adult twins. **Physiol. Behav**. v. 93, p. 235–242. 2008.

- KHANOLKAR, A. R. *et al.* Ethnic Minorities Are at Greater Risk for Childhood-Onset Type 2 Diabetes and Poorer Glycemic Control in England and Wales. **J Adolesc Health**. v. 59, n.3, p. 354-361. 2016.
- KHARROUBI, A. T.; DARWISH, H. M. Diabetes mellitus: The epidemic of the century. **World J Diabetes**. v. 6, n.6, p. 850-867. 2015.
- KHERA, A. V. *et al.* Polygenic Prediction of Weight and Obesity Trajectories from Birth to Adulthood. **Cell**. v. 177, p. 587–596. 2019.
- KIM, C.; NEWTON, K. M.; KNOPP, R. H. Gestational diabetes and the incidence of type 2 diabetes: a systematic review. **Diabetes Care**. v. 25, n.10, p. 1862-8. 2002.
- KIM, H. *et al.* Characteristics of children with type 1 diabetes and persistent suboptimal glycemic control. **J Clin Res Pediatr Endocrinol**. v. 4, n.2, p. 82-8. 2012.
- KIM, J. Y. *et al.* Adiponectin: The Potential Regulator and Therapeutic Target of Obesity and Alzheimer's Disease. **Int J Mol Sci**. v. 21, n.17, p. 2020.
- KIM, J. Y. *et al.* Obesity-associated improvements in metabolic profile through expansion of adipose tissue. **J Clin Invest**. v. 117, n.9, p. 2621-37. 2007.
- KIM, U. *et al.* Variation in the Human TAS1R Taste Receptor Genes. **Chem. Senses**. v. 31, p. 599–611. 2006.
- KISS, T. *et al.* Binding Constant of VIVO to Transferrin. **Eur. J. Inorg. Chem.** v. 18, p. 3607–3613. 2006.
- KISS, T. *et al.* The formation of ternary complexes between VO(maltolate)₂ and small bioligands. **Inorganica Chimica Acta**. v. 283, p. 202-210. 1998.
- KISS, T. A. *et al.* Biospeciation of antidiabetic VO(IV) complexes. **Coordination Chemistry Reviews**. v. 252, p. 1153–1162. 2008.
- KITA, S. *et al.* Native adiponectin in serum binds to mammalian cells expressing T-cadherin, but not AdipoRs or calreticulin. **eLife**. v. 8, p. 2019.
- KJAER, I. G. *et al.* Obesity prevalence in Norwegian adults assessed by body mass index, waist circumference and fat mass percentage. **Clin Obes**. v. 5, n.4, p. 211-8. 2015.
- KOC, G.; SOYOCAK, A.; ANDAC-OZTURK, S. TAS1R2 rs35874116 and TRPM5 rs886277 polymorphisms are not related with risk of obesity. **Int J Clin Pract**. v. 75, n.9, p. e14562. 2021.
- KONDOH, K.; NISHIDA, E. Regulation of MAP kinases by MAP kinase phosphatases. **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 1773, p. 1227–1237. 2007.
- KONES, R.; RUMANA, U. Stable Ischemic Heart Disease. **Cardiology Clinics**. v. 32, n.3, p. 333-351. 2014.

KONGOT, M. *et al.* Oxidovanadium(IV/V) complexes bound with a ONS donor backbone: The search for therapeutic versatility in one class of compounds. **Appl Organomet Chem.** v. p. 1-16. 2021.

KONGOT, M. *et al.* Oxidovanadium (IV) and iron (III) complexes with O₂N₂ donor linkage as plausible antidiabetic candidates: Synthesis, structural characterizations, glucose uptake and model biological media studies. **Appl Organometal Chem.** v. 34, n.3, p. 1-14. 2019.

KONTAŞ AŞKAR, T. *et al.* Effect of vanadium (IV) chloride supplementation on appetite-related hormone levels in rats with experimentally induced diabetes. **Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences.** v. 45, p. 501-507. 2021.

KONUMA, T.; OKADA, Y. Statistical genetics and polygenic risk score for precision medicine. **Inflamm Regen.** v. 41, n.1, p. 18. 2021.

KORBECKI, J. *et al.* Biochemical and medical importance of vanadium compounds. **ACTABP.** v. 59, n.2, p. 195-200. 2012.

KORNERUP, K. *et al.* Increased transvascular low density lipoprotein transport in insulin dependent diabetes: a mechanistic model for development of atherosclerosis. **Atherosclerosis.** v. 170, n.1, p. 163-8. 2003.

KOSTA, L.; BYRNE, A. R.; DERMEIJ, M. Trace elements in some human milk samples by radiochemical neutron activation analysis. **The Science of the Total Environment.** v. 29, p. 261-268. 1983.

KRISHNAN, E. *et al.* Hyperuricemia in young adults and risk of insulin resistance, prediabetes, and diabetes: a 15-year follow-up study. **Am J Epidemiol.** v. 176, n.2, p. 108-16. 2012.

KROŚNIAK, M.; GAWLIK, M.; GRYBOŚ, R. Effect of vanadium complexes and insulin administered simultaneously for oxidative stress in stz diabetic rats. **Bull Vet Inst Pulawy.** v. 53, p. 535-540. 2009.

LAFFITTE, A.; NEIERS, F.; BRIAND, L. C. Functional roles of the sweet taste receptor in oral and extraoral tissues. **Carbohydrates.** v. 17, n.4, p. 1363-1950. 2014.

LAHIRI, D. K.; NURNBERGER JR, J. I. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. **Nucleic Acids Research.** v. 19, n.19, p. 1991.

LARA-CASTRO, C. *et al.* Adiponectin and the metabolic syndrome: mechanisms mediating risk for metabolic and cardiovascular disease. **Curr. Opin. Lipidol.** v. 18, p. 263–270. 2007.

- LAUMEN, H. *et al.* Functional Characterization of Promoter Variants of the Adiponectin Gene Complemented by Epidemiological Data. **Diabetes**. v. 58, n.4, p. 2008.
- LAWRENCE, J. M. *et al.* Trends in Prevalence of Type 1 and Type 2 Diabetes in Children and Adolescents in the US, 2001-2017. **JAMA**. v. 326, n.8, p. 717-727. 2021.
- LEMKES, B. A. *et al.* Hyperglycemia: a prothrombotic factor? **J Thromb Haemost**. v. 8, n.8, p. 1663-9. 2010.
- LEVINA, A. *et al.* Reactivity–activity relationships of oral antidiabetic vanadium complexes in gastrointestinal media: an X-ray absorption spectroscopic study. **Metallomics**. v. 6, p. 1880--1888. 2014.
- LEVY, R. B. *et al.* Ultra-processed food consumption and type 2 diabetes incidence: A prospective cohort study. **Clinical Nutrition**. v. 40, n.5, p. 3608-3614. 2021.
- LI, C.; HSIEH, M. C.; CHANG, S. J. Metabolic syndrome, diabetes, and hyperuricemia. **Curr Opin Rheumatol**. v. 25, n.2, p. 210-6. 2013.
- LI, M. *et al.* Anti-diabetic effects of vanadium(III, IV, V)–chlorodipicolinate complexes in streptozotocin-induced diabetic rats. **BioMetals**. v. 22, p. 895–905. 2009.
- LI, X. *et al.* Pseudogenization of a sweet-receptor gene accounts for cats' indifference toward sugar. **PLoS Genet**. v. 1, n.1, p. 27-35. 2005.
- LI, Y.-Y. *et al.* Adiponectin-11377CG Gene Polymorphism and Type 2 Diabetes Mellitus in the Chinese Population: A Meta-Analysis of 6425 Subjects. **PLoS ONE**. v. 8, n.4 e61153, p. 1-10. 2013.
- LI, Z. *et al.* Vanadyl Sulfate Inhibits NO Production via Threonine Phosphorylation of eNOS. **Environmental Health Perspectives**. v. 112, n.2, p. 2004.
- LIAO, J.; SCHULTZ, P. G. Three sweet receptor genes are clustered in human Chromosome 1. **Mammalian Genome**. v. 14, p. 291–301. 2003.
- LIBMAN, I. M. *et al.* Changing Prevalence of Overweight Children and Adolescents at Onset of Insulin-Treated Diabetes. **Diabetes Care**. v. 26, n.10, p. 2871–2875. 2003.
- LIMA, L. M. A. *et al.* Vanadium(IV)-diamine complex with hypoglycemic activity and a reduction in testicular atrophy. **J Inorg Biochem**. v. 216, p. 111312. 2021.
- LINDSAY, R. S. *et al.* Adiponectin and development of type 2 diabetes in the Pima Indian population. **Lancet**. v. 360, p. 57–58. 2002.
- LING, H. *et al.* Genome-wide Linkage and Association Analyses to Identify Genes Influencing Adiponectin Levels: The GEMS Study. **Obesity**. v. 17, n.4, p. 737–744. 2009.

LIPMAN, T. H. *et al.* Increasing incidence of type 1 diabetes in youth: twenty years of the Philadelphia Pediatric Diabetes Registry. **Diabetes Care**. v. 36, n.6, p. 1597-1603. 2013.

LIU, L. L. *et al.* SEARCH for Diabetes in Youth Study Group. Prevalence of overweight and obesity in youth with diabetes in USA: the SEARCH for Diabetes in Youth study. **Pediatr Diabetes**. v. 11, p. 4-11. 2010.

LIU, M.; LIU, F. Transcriptional and post-translational regulation of adiponectin. **Biochem J**. v. 425, n.1, p. 41-52. 2009.

LIU, T.-T. *et al.* Reactive-oxygen-species-mediated Cdc25C degradation results in differential antiproliferative activities of vanadate, tungstate, and molybdate in the PC-3 human prostate cancer cell line. **J Biol Inorg Chem**. v. 17, p. 311–320. 2012.

LIYANAGE, T. *et al.* Worldwide access to treatment for end-stage kidney disease: a systematic review. **Lancet**. v. 385, n.9981, p. 1975-82. 2015.

LLEWELLYN, C. H. Genetic susceptibility to the “obesogenic” environment: the role of eating behavior in obesity and an appetite for change. **Am J Clin Nutr**. v. 108, p. 429-430. 2018.

LOCKE, A. E. *et al.* Genetic studies of body mass index yield new insights for obesity biology. **Nature**. v. 518, p. 197–206. 2015.

LU, L. *et al.* Inhibition protein tyrosine phosphatases by an oxovanadium glutamate complex, Na₂[VO(Glu)₂(CH₃OH)](Glu 5 glutamate). **BioMetals**. v. 23, p. 1139–1147. 2010.

LUDDEKE, H. J. *et al.* PREDICTIVE- a global, prospective observational study to evaluate insulin detemir treatment in types 1 and 2 diabetes: baseline characteristics and predictors of hypoglycaemia from the European cohort. **Diabetes Obes Metab**. v. 9, n.3, p. 428-34. 2007.

LUIPPOLD, G. *et al.* Short- and Longterm Glycemic Control of Streptozotocin-Induced Diabetic Rats Using Different Insulin Preparations. **PLoS ONE**. v. 11, n.6, p. e0156346. 2016.

LYONNET, B. L.; MARTZ, M.; MARTIN, E. T. **L'emploi thérapeutique des derives du vanadium**. Lyon: Assoc. typogr, 1899.

LYTVYN, Y. *et al.* Glycosuria-mediated urinary uric acid excretion in patients with uncomplicated type 1 diabetes mellitus. **Am J Physiol Renal Physiol**. v. 308, n.2, p. F77-83. 2015.

MA, J. *et al.* Distribution of neuropeptide Y Leu7Pro polymorphism in patients with type 1 diabetes and diabetic nephropathy among Swedish and American populations. **Eur J Endocrinol**. v. 157, n.5, p. 641-5. 2007.

MA, J. *et al.* Estimation of the daily soil/dust (SD) ingestion rate of children from Gansu Province, China via hand-to-mouth contact using tracer elements. **Environ Geochem Health**. v. 40, n.1, p. 295–301. 2016.

MACHADO, U. F. Transportadores de glicose. **Arq Bras Endocrinol Metab**. v. 42, n.6, p. 413-421. 1998.

MACISAAC, R. J.; EKINCI, E. I.; JERUMS, G. Markers of and risk factors for the development and progression of diabetic kidney disease. **Am J Kidney Dis**. v. 63, n.2 Suppl 2, p. S39-62. 2014.

MAEDA, N. *et al.* Diet-induced insulin resistance in mice lacking adiponectin/ACRP30. **Nat Med**. v. 8, n.7, p. 731-737. 2002.

MAGALHÃES, G. C. *et al.* Hypoadiponectinaemia in nonalcoholic fatty liver disease obese women is associated with infrequent intake of dietary sucrose and fatty foods. **J Hum Nutr Diet**. v. 27 Suppl 2, p. 301-12. 2014.

MAITREPIERRE, E. *et al.* Recombinant expression, in vitro refolding, and biophysical characterization of the N-terminal domain of T1R3 taste receptor. **Protein Expr Purif**. v. 83, p. 75–83. 2012.

MAKINEN, M. W.; SALEHITAZANGI, M. The structural basis of action of vanadyl (VO₂⁺) chelates in cells. **Coordination Chemistry Reviews**. v. 279, p. 1-22. 2014.

MALABU, U. H. *et al.* Effects of chronic vanadate administration in the STZ-induced diabetic rat. The antihyperglycemic action of vanadate is attributable entirely to its suppression of feeding. **Diabetes**. v. 43, n.1, p. 1-15. 1994.

MALAISSSE, W. J. *et al.* Effects of artificial sweeteners on insulin release and cationic fluxes in rat pancreatic islets. **Cell Signal**. v. 10, n.10, p. 727–733. 1998.

MAMBIYA, M. *et al.* The Play of Genes and Non-genetic Factors on Type 2 Diabetes. **Front Public Health**. v. 7, p. 349. 2019.

MANNERING, S. I.; PATHIRAJA, V.; KAY, T. W. The case for an autoimmune aetiology of type 1 diabetes. **Clin Exp Immunol**. v. 183, n.1, p. 8-15. 2016.

MAO, X. *et al.* APPL1 binds to adiponectin receptors and mediates adiponectin signalling and function. . **Nat. Cell Biol**. v. 8, p. 516–523. 2006.

MARIN-PENALVER, J. J. *et al.* Update on the treatment of type 2 diabetes mellitus. **World J Diabetes**. v. 7, n.17, p. 354-95. 2016.

MARQUES, M. P. M. *et al.* An EXAFS Approach to the Study of Polyoxometalate–Protein Interactions: The Case of Decavanadate–Actin. **Inorg. Chem**. v. 1, p. 1-11. 2017.

MARSHALL, M. W. *et al.* Prediction of carcass fat from body measurements made on live rats differing in age, sex and strain. **Br. J. Nutr**. v. 23, p. 353-369. 1969.

MASUBUCHI, Y. *et al.* A novel regulatory function of sweet taste-sensing receptor in adipogenic differentiation of 3T3-L1 cells. **PLoS ONE**. v. 8, n.1, p. 1-12. 2013.

MASUBUCHI, Y. *et al.* A Novel Regulatory Function of Sweet Taste-Sensing Receptor in Adipogenic Differentiation of 3T3-L1 Cells. **PLoS ONE**. v. 8, n.1, p. 1-12. 2013.

MATSUGO, S. *et al.* Cytotoxicity and enhancement of the insulin signaling pathway induced by peroxidovanadium(V) complexes. **Inorganica Chimica Acta**. v. 1, p. 1-7. 2014.

MATSUZAWA, Y. *et al.* Adiponectin and Metabolic Syndrome. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**. v. 24, n.1, p. 29-33. 2004.

MAX, M. *et al.* Tas1r3, encoding a new candidate taste receptor, is allelic to the sweet responsiveness locus Sac. **Nature Genetics**. v. 28, p. 58–63. 2001.

MAYER-DAVIS, E. J. *et al.* ISPAD Clinical Practice Consensus Guidelines 2018: Definition, epidemiology, and classification of diabetes in children and adolescents. **Pediatr Diabetes**. v. 19 Suppl 27, p. 7-19. 2018.

MBATHA, B. *et al.* Cardio-protective effects of a dioxidovanadium(V) complex in male sprague–dawley rats with streptozotocin-induced diabetes. **BioMetals**. v. 34, n.1, p. 161-173. 2021.

MELO, S. V. *et al.* Evaluation of the association between the TAS1R2 and TAS1R3 variants and food intake and nutritional status in children. **Genet. Mol. Biol**. v. 40, n.2, p. 2017.

MEOTTI, F. C. *et al.* Antinociceptive properties of coumarins, steroid and dihydrostyryl-2-pyrones from *Polygala sabulosa* (Polygalaceae) in mice. **Pharmacy and Pharmacology**. v. 58, n.1, p. 107-112. 2006.

METELO, A. M. *et al.* VO(dmpp)₂ normalizes pre-diabetic parameters as assessed by in vivo magnetic resonance imaging and spectroscopy. **Journal of Inorganic Biochemistry**. v. 115, p. 44–49. 2012.

METHVEN, L.; ELLIS, L.; KAVALIAUSKAITE, G. Investigating perception and liking of non-nutritive sweeteners in individuals representing different taste receptor genotypes. In: 15th Weurman Flavour Research Symposium. **Flavour Sci**. v. 18, n.22, p. 193-198. 2018.

MEYEROVITCH, J. *et al.* Oral administration of vanadate normalizes blood glucose levels in streptozotocin-treated rats. Characterization and mode of action. **The journal of biological chemistry**. v. 262, n.14, p. 6658-6662. 1987.

MICHALAK, M. *et al.* Calreticulin, a multi-process calcium-buffering chaperone of the endoplasmic reticulum. **Biochem. J**. v. 417, p. 651–666. 2009.

MICHAUD, A. *et al.* Abdominal subcutaneous and omental adipocyte morphology and its relation to gene expression, lipolysis and adipocytokine levels in women. **Metabolism**. v. 63, p. 372–381. 2014.

MISHRA, V. *et al.* Emerging Treatment Strategies for Diabetes Mellitus and Associated Complications: An Update. **Pharmaceutics**. v. 13, n.10, p. 2021.

MOHAMMAD, A.; SHARMA, V.; MCNEILL, J. H. Vanadium increases GLUT4 in diabetic rat skeletal muscle. **Molecular and Cellular Biochemistry**. v. 233, n.1-2, p. 139-143. 2002.

MOLDOGAZIEVA, N. T. *et al.* ROS and RNS signaling: adaptive redox switches through oxidative/nitrosative protein modifications. **Free Radic Res**. v. 52, n.5, p. 507–543. 2018.

MONAMI, M. *et al.* Prognostic value of serum liver enzymes levels in type 2 diabetic patients. **Diabetes Metab. Res. Rev.** v. 23, p. 625–630. 2007.

MORITA, A. *et al.* Sodium Orthovanadate Inhibits p53-Mediated Apoptosis. **American Association for Cancer Research**. v. 70, n.1, p. 257-265. 2010.

MORRISH, N. J. *et al.* Mortality and causes of death in the WHO Multinational Study of Vascular Disease in Diabetes. **Diabetologia**. v. 44 Suppl 2, p. S14-21. 2001.

MORSY, M. D. *et al.* The impact of concomitant administration of vanadium and insulin on endothelial dysfunction markers (PAI-1 and ET-1) in type 1 diabetic rats. **Arch Physiol Biochem**. v. 127, n.1, p. 20-27. 2021.

MOSINGER, B. *et al.* Genetic loss or pharmacological blockade of testes-expressed taste genes causes male sterility. **PNAS**. v. 110, n.30, p. 12319–12324. 2013.

MOSKALYK, R. R.; ALFANTAZI, A. M. Processing of vanadium: a review. **Miner. Engineer**. v. 16, n.9, p. 793–805. 2003.

MOSMANN, T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. **Journal of Immunological Methods**. v. 65, p. 55-63. 1983.

MOZAFFARINA, D. *et al.* Changes in diet and lifestyle and long-term weight gain in women and men. **N. Engl. J. Med.** v. 364, p. 2392–2404. 2011.

MUKHERJEE, S. *et al.* A Small Insulinomimetic Molecule Also Improves Insulin Sensitivity in Diabetic Mice. **PLoS ONE**. v. 12, n.e0169809, p. 1-23. 2017.

MURUSSI, M. *et al.* Diabetic nephropathy in type 2 diabetes mellitus: risk factors and prevention. **Arq Bras Endocrinol Metab**. v. 47, n.3, p. 2003.

MUSSO, G. *et al.* Hypoadiponectinemia predicts the severity of hepatic fibrosis and pancreatic Beta-cell dysfunction in nondiabetic nonobese patients with nonalcoholic steatohepatitis. **Am J Gastroenterol**. v. 100, n.11, p. 2438-46. 2005.

MUZY, J. *et al.* [Prevalence of diabetes mellitus and its complications and characterization of healthcare gaps based on triangulation of studies]. **Cad Saude Publica**. v. 37, n.5, p. e00076120. 2021.

NAGAO, K. *et al.* Conjugated linoleic acid enhances plasma adiponectin level and alleviates hyperinsulinemia and hypertension in Zucker diabetic fatty (fa/fa) rats. **Biochem Biophys Res Commun**. v. 310, n.2, p. 562-6. 2003.

NAGASAWA, A. *et al.* Effects of soy protein diet on the expression of adipose genes and plasma adiponectin. **Horm Metab Res**. v. 34, n.11-12, p. 635-9. 2002.

NAKAJIMA, K. *et al.* Selective Attenuation of Metabolic Branch of Insulin Receptor Down-signaling by High Glucose in a Hepatoma Cell Line, HepG2 Cells. **Journal of Inorganic Biochemistry**. v. 141, p. 114-120. 2014.

NAKANISHI, N.; SUZUKI, K.; TATARA, K. Serum gamma-glutamyltransferase and risk of metabolic syndrome and type 2 diabetes in middle-aged Japanese men. **Diabetes Care**. v. 27, p. 1427–1432. 2004.

NAMIPASHAKI, A.; RAZAGHI-MOGHADAM, Z.; ANSARI-POUR, N. The Essentiality of Reporting Hardy-Weinberg Equilibrium Calculations in Population-Based Genetic Association Studies. **Cell J. Summer**. v. 17, n.2, p. 187-192. 2015.

NASO, L. G. *et al.* Bovine serum albumin binding, antioxidant and anticancer properties of an oxidovanadium(IV) complex with luteolin. **J Inorg Biochem**. v. 157, p. 80–93. 2016.

NATHAN, D. M.; GROUP., D. E. R. The Diabetes Control and Complications Trial/Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications Study at 30 Years: Overview. **Diabetes Care**. v. 37, p. 2014.

NEELAKANTAN, N. *et al.* Sugar-sweetened beverage consumption, weight gain, and risk of type 2 diabetes and cardiovascular diseases in Asia: a systematic review. . **Nutrition Reviews**. v. 80, n.1, p. 50–67. 2022.

NI, L. *et al.* Synthesis, in vitro cytotoxicity, and structure–activity relationships (SAR) of multidentate oxidovanadium(iv) complexes as anticancer agents. **Dalton Transactions**. v. 47, n.30, p. 1-11. 2018.

NILSSON, J. *et al.* Bis- and tris(pyridyl)amine-oxidovanadium complexes: Characteristics and insulin-mimetic potential. **Dalton Trans**. v. p. 7902–7911. 2009.

NITTARI, G. *et al.* Fighting obesity in children from European World Health Organization member states. Epidemiological data, medical-social aspects, and prevention programs. **Clin Ter**. v. 170, n.3, p. 2019.

NIU, X.; YANG, J.; YANG, X. Synthesis and anti-diabetic activity of new N,N-dimethylphenylenediaminederivatized nitrilotriacetic acid vanadyl complexes. **Journal of Inorganic Biochemistry**. v. 177, p. 291–299. 2017.

NIU, Y. *et al.* Effects of bis(α -furancarboxylato)oxovanadium(IV) on glucose metabolism in fat-fed/streptozotocin-diabetic rats. **European Journal of Pharmacology**. v. 572, p. 213–219. 2007.

NOBLE, J. A. *et al.* HLA class I and genetic susceptibility to type 1 diabetes: results from the Type 1 Diabetes Genetics Consortium. **Diabetes**. v. 59, n.11, p. 2972-9. 2010.

NOCTOR, E. *et al.* Abnormal glucose tolerance post-gestational diabetes mellitus as defined by the International Association of Diabetes and Pregnancy Study Groups criteria. **Eur J Endocrinol**. v. 175, n.4, p. 287-97. 2016.

NOVAIS, P. F. S. *et al.* Gene polymorphisms as a predictor of body weight loss after Roux-en-Y gastric bypass surgery among obese women. **Obesity Research & Clinical Practice**. v. 10, p. 724—727. 2016.

NOVELLI, E. L. B. *et al.* Anthropometrical parameters and markers of obesity in rats. **Lab Anim**. v. 41, n.111, p. 111–119. 2007.

NTP (National Toxicology Program). Toxicology and carcinogenesis studies of vanadium pentoxide (CAS No. 131462-1) in F344/N rats and B6C3F1 mice (inhalation). **Natl Toxicol Program Tech Rep Ser**. v. 507, p. 1–343. 2002.

NTP (National Toxicology Program). Chemical information review document for oral exposure to tetravalent and pentavalent vanadium compounds. National Institute of Environmental Health Sciences. 2008.

NTP (National Toxicology Program). **Report on carcinogens**. Research Triangle Park NC: U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, National Toxicology Program (NTP). v. 12, 2011.

NUSHRAT, P.; AMIT, R.; PUSHPA, P. Diabetes Mellitus – Pathophysiology & Herbal Management. **Pharmaceutical and Biosciences Journal**. v. p. 34-42. 2017.

O'CONNELL, B. S. Select Vitamins and Minerals in the Management of Diabetes. **Diabetes Spectr**. v. 14, n.3, p. 133-148. 2001.

OESTER, I. M. *et al.* Type 2 diabetes mellitus in Danish children and adolescents in 2014. **Pediatr Diabetes**. v. 17, n.5, p. 368-73. 2016.

OLCKERS, A. *et al.* Protective effect against type 2 diabetes mellitus identified within the ACDC gene in a black South African diabetic cohort. **Metabolism Clinical and Experimental**. v. 56, p. 587– 592. 2007.

OLIVERI, L. M. *et al.* ALAS1 gene expression is down-regulated by Akt-mediated phosphorylation and nuclear exclusion of FOXO1 by vanadate in diabetic mice. **Biochem. J**. v. 442, p. 303–310. 2012.

ORCHARD, T. J.; COSTACOU, T. When are type 1 diabetic patients at risk for cardiovascular disease? **Curr Diab Rep.** v. 10, n.1, p. 48-54. 2010.

ORCHARD, T. J. *et al.* Type 1 diabetes and coronary artery disease. **Diabetes Care.** v. 29, n.11, p. 2528-38. 2006.

ORCHARD, T. J. *et al.* Antibodies to oxidized LDL predict coronary artery disease in type 1 diabetes: a nested case-control study from the Pittsburgh Epidemiology of Diabetes Complications Study. **Diabetes.** v. 48, n.7, p. 1454-8. 1999.

OUCHI, N. *et al.* Adiponectin stimulates angiogenesis by promoting cross-talk between AMP-activated protein kinase and Akt signaling in endothelial cells. **J Biol Chem.** v. 279, n.2, p. 1304-9. 2004.

OUELLET, M.; BARBEAU, B.; TREMBLAY, M. J. p56lck, ZAP-70, SLP-76, and Calcium-regulated Effectors Are Involved in NF- κ B Activation by Bisperoxovanadium Phosphotyrosyl Phosphatase Inhibitors in Human T Cells. **The journal of biological chemistry.** v. 274, n.49, p. 35029–35036. 1999.

PAJVANI, U. B. *et al.* Structure-function studies of the adipocyte-secreted hormone Acrp30/adiponectin. Implications for metabolic regulation and bioactivity. **J. Biol. Chem.** v. 278, p. 9073–9085. 2003.

PAJVANI, U. B. *et al.* Complex distribution, not absolute amount of adiponectin, correlates with thiazolidinedione-mediated improvement in insulin sensitivity. **J Biol Chem.** v. 279, n.13, p. 12152-62. 2004.

PAL, R. P. *et al.* Inorganic Vanadium Supplementation in Crossbred Calves: Effects on Antioxidant Status, Immune Response and Haemato-Biochemical Attributes. **Biological Trace Element Research.** v. 1, p. 1-8. 2018.

PAL, R. P. *et al.* Influence of Feeding Inorganic Vanadium on Growth Performance, Endocrine Variables and Biomarkers of Bone Health in Crossbred Calves. **Biol Trace Elem Res.** v. 182, n.2, p. 248–256. 2018.

PAMBIANCO, G. *et al.* The 30-year natural history of type 1 diabetes complications: the Pittsburgh Epidemiology of Diabetes Complications Study experience. **Diabetes.** v. 55, n.5, p. 1463–1469. 2006.

PAMBIANCO, G.; COSTACOU, T.; ORCHARD, T. J. The prediction of major outcomes of type 1 diabetes: a 12-year prospective evaluation of three separate definitions of the metabolic syndrome and their components and estimated glucose disposal rate: the Pittsburgh Epidemiology of Diabetes Complications Study experience. **Diabetes Care.** v. 30, n.5, p. 1248-54. 2007.

PANAHI, G. *et al.* High glucose induces inflammatory responses in HepG2 cells via the oxidative stress-mediated activation of NF- κ B, and MAPK pathways in HepG2 cells. **Arch Physiol Biochem.** v. 124, n.5, p. 468-474. 2018.

PANARO, B. L.; CONE, R. D. Melanocortin-4 receptor mutations paradoxically reduce preference for palatable foods. **Proc Natl Acad Sci U S A**. v. 110, n.17, p. 7050-7055. 2013.

PANDEY, G. K. *et al.* High molecular weight adiponectin reduces glucolipotoxicity-induced inflammation and improves lipid metabolism and insulin sensitivity via APPL1-AMPK-GLUT4 regulation in 3T3-L1 adipocytes. **Atherosclerosis**. v. 288, p. 67-75. 2019.

PANDEY, S. K.; CHIASSEON, J. L.; SRIVASTAVA, A. K. Vanadium salts stimulate mitogen-activated protein (MAP) kinases and ribosomal S6 kinases. **Molecular and Cellular Biochemistry**. v. 153, p. 69-78. 1995.

PANKOW, J. S. *et al.* Insulin resistance and cardiovascular disease risk factors in children of parents with the insulin resistance (metabolic) syndrome. **Diabetes Care**. v. 27, n.3, p. 775-80. 2004.

PARK, S. *et al.* Long-term central infusion of adiponectin improves energy and glucose homeostasis by decreasing fat storage and suppressing hepatic gluconeogenesis without changing food intake. **J Neuroendocrinol**. v. 23, n.8, p. 687-98. 2011.

PARKER-DUFFEN, J. L. *et al.* Divergent roles for adiponectin receptor 1 (AdipoR1) and AdipoR2 in mediating revascularization and metabolic dysfunction in vivo. **J. Biol. Chem**. v. 289, p. 16200–16213. 2014.

PARRONDO, R. *et al.* RNesFea-rckhB activation enhances cell death by antimetabolic drugs in human prostate cancer cells. **Molecular Cancer**. v. 182, n.2, p. 2-13. 2010.

PATEL, S.; SANTANI, D. Role of NF- κ B in the pathogenesis of diabetes and its associated complications. **Pharmacol Rep**. v. 61, n.4, p. 595–603. 2009.

PERES, L. A. B. *et al.* Padronização do Teste do MTT em Modelo de Preservação a Frio como Instrumento de Avaliação da Viabilidade Celular Renal. **J. Bras. Nefrol**. v. 30, n.1, p. 48-53. 2008.

PETERS, M. L. *et al.* The current total economic burden of diabetes mellitus in the Netherlands. **Neth J Med**. v. 75, n.7, p. 281-297. 2017.

PETERSEN, M. C.; SHULMAN, G. I. MECHANISMS OF INSULIN ACTION AND INSULIN RESISTANCE. **Physiol Rev**. v. 98, n.4, p. 2133–2223. 2018.

PILLAI, S. I.; SUBRAMANIAN, S. P.; KANDASWAMY, M. A novel insulin mimetic vanadium-flavonol complex: synthesis, characterization and in vivo evaluation in STZ-induced rats. **Eur J Med Chem**. v. 63, p. 109–117. 2013.

PIOLTINE, M. B. *et al.* Genetic Variations in Sweet Taste Receptor Gene Are Related to Chocolate Powder and Dietary Fiber Intake in Obese Children and Adolescents. **J. Pers. Med**. v. 8, n.7, p. 1-9. 2018.

PISCHON, T. *et al.* Association between dietary factors and plasma adiponectin concentrations in men. **Am J Clin Nutr.** v. 81, n.4, p. 780-6. 2005.

POLITO, R. *et al.* Adiponectin Role in Neurodegenerative Diseases: Focus on Nutrition Review. **Int J Mol Sci.** v. 21, n.23, p. 2020.

POLITO, R. *et al.* Adiponectin Receptors and Pro-inflammatory Cytokines Are Modulated in Common Variable Immunodeficiency Patients: Correlation With Ig Replacement Therapy. **Front Immunol.** v. 10, p. 2812. 2019.

POUCHERET, P. *et al.* Long-term correction of STZ-diabetic rats after short-term i.p. VOSO 4 treatment: Persistence of insulin secreting capacities assessed by isolated pancreas studies. **Molecular and Cellular Biochemistry.** v. 153, p. 197-204. 1995.

POZZILLI, P. *et al.* Obesity, autoimmunity, and double diabetes in youth. **Diabetes Care.** v. 34, n.Suppl 2, p. S166–S170. 2011.

PRAKASH, J. *et al.* Association of Adiponectin Gene Polymorphism with Adiponectin Levels And Risk for Insulin Resistance Syndrome. **International Journal of Preventive Medicine.** v. 6, n.1, p. 31-38. 2015.

PRIOR, S. L. *et al.* Association between the adiponectin promoter rs266729 gene variant and oxidative stress in patients with diabetes mellitus. **Eur Heart J.** v. 30, n.10, p. 1263-1269. 2009.

PRIYA, G.; KALRA, S. A Review of Insulin Resistance in Type 1 Diabetes: Is There a Place for Adjunctive Metformin? **Diabetes Ther.** v. 9, n.1, p. 349-361. 2018.

PURNELL, J. Q. *et al.* Relationship of family history of type 2 diabetes, hypoglycemia, and autoantibodies to weight gain and lipids with intensive and conventional therapy in the Diabetes Control and Complications Trial. **Diabetes.** v. 52, n.10, p. 2623-9. 2003.

PURNELL, J. Q. *et al.* The effect of excess weight gain with intensive diabetes mellitus treatment on cardiovascular disease risk factors and atherosclerosis in type 1 diabetes mellitus: results from the Diabetes Control and Complications Trial/Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications Study (DCCT/EDIC) study. **Circulation.** v. 127, n.2, p. 180–187. 2013.

RAKATZI, I. *et al.* Adiponectin counteracts cytokine- and fatty acid-induced apoptosis in the pancreatic beta-cell line INS-1. **Diabetologia.** v. 47, n.2, p. 249-58. 2004.

RAM, R. *et al.* Systematic Evaluation of Genes and Genetic Variants Associated with Type 1 Diabetes Susceptibility. **J Immunol.** v. 196, n.7, p. 3043-53. 2016.

RAMASARMA, T.; RAO, A. V. S. Decavanadate interacts with microsomal NADH oxidation system and enhances cytochrome c reduction. **Molecular and Cellular Biochemistry.** v. 281, p. 139–144. 2006.

RAMOS-LOPEZ, O. *et al.* Sweet Taste Receptor TAS1R2 Polymorphism (Val191Val) Is Associated with a Higher Carbohydrate Intake and Hypertriglyceridemia among the Population of West Mexico. **Nutrients**. v. 8, n.101, p. 1-12. 2016.

RAMOS, S.; MOURAA, J. J. G.; AURELIANO, M. Recent advances into vanadyl, vanadate and decavanadate interactions with actin. **Metallomics**. v. 4, p. 16–22. 2012.

RANGEL, M. *et al.* Novel 3-hydroxy-4-pyridinonato oxidovanadium(IV) complexes to investigate structure/activity relationships. **J Inorg Biochem**. v. 103, n.4, p. 496–502. 2009.

RANKINEN, T.; BOUCHARD, C. GENETICS OF FOOD INTAKE AND EATING BEHAVIOR PHENOTYPES IN HUMANS. **Annu. Rev. Nutr.** v. 26, p. 413–434. 2006.

RAO, A. V. S.; RAMASARMA, T. NADH-dependent decavanadate reductase, an alternative activity of NADP-specific isocitrate dehydrogenase protein. **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 1474, p. 321-330. 2000.

RAO KONDAPALLY SESHASAI, S. *et al.* Diabetes mellitus, fasting glucose, and risk of cause-specific death. **N Engl J Med**. v. 364, n.9, p. 829-841. 2011.

RATNER, R. E. *et al.* Amylin replacement with pramlintide as an adjunct to insulin therapy improves long-term glycaemic and weight control in Type 1 diabetes mellitus: a 1-year, randomized controlled trial. **Diabet Med**. v. 21, n.11, p. 1204-12. 2004.

RAWSHANI, A. *et al.* Mortality and cardiovascular disease in type 1 and type 2 diabetes. **N Engl J Med**. v. 376, n.15, p. 1407–1418. 2017.

REDDI, A. S.; CAMERINI-DAVALOS, R. A. Diabetic Nephropathy. **Archives of Internal Medicine**. v. 150, n.1, p. 31. 1990.

REHDER, D. The potentiality of vanadium in medicinal applications. **Future Med. Chem**. v. 4, n.14, p. 1823–1837. 2012.

REHDER, D. **Vanadium. Its Role for Humans**. Met Ions Life Sci, 2013.

REHDER, D. The role of vanadium in biology. **Metallomics**. v. 7, n.5, p. 730–742. 2015.

REHDER, D. The potentiality of vanadium in medicinal applications. **Inorganica Chimica Acta**. v. 504, p. 119445. 2020.

REN, X. *et al.* Sweet taste signaling functions as a hypothalamic glucose sensor. **Frontiers in Integrative Neuroscience**. v. 3, n.12, p. 1-15. 2009.

RETNAKARAN, R. *et al.* Adiponectin and beta cell dysfunction in gestational diabetes: pathophysiological implications. **Diabetologia**. v. 48, n.5, p. 993-1001. 2005.

REZVANI, R. *et al.* Effects of sugar-sweetened beverages on plasma acylation stimulating protein, leptin and adiponectin: relationships with metabolic outcomes. **Obesity (Silver Spring)**. v. 21, n.12, p. 2471-80. 2013.

RICCARDI, G. *et al.* Separate influence of dietary carbohydrate and fibre on the metabolic control in diabetes. **Diabetologia**. v. 26, n.2, p. 116-21. 1984.

RIFAI, N.; HORVATH, A. R.; WITTEW, C. T. **Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics**. Louis: Elsevier, 2018.

ROBERTSON, C. C.; RICH, S. S. Genetics of type 1 diabetes. **Curr Opin Genet Dev**. v. 50, p. 7-16. 2018.

RODRIGUES, T. C. *et al.* Obesity and coronary artery calcium in diabetes: the Coronary Artery Calcification in Type 1 Diabetes (CACTI) study. **Diabetes Technol Ther**. v. 13, n.10, p. 991-6. 2011.

ROSE, K. *et al.* Influence of the vitamin D plasma level and vitamin D-related genetic polymorphisms on the immune status of patients with type 1 diabetes: a pilot study. **Clin Exp Immunol**. v. 171, n.2, p. 171-85. 2013.

ROSHAN, B.; STANTON, R. C. A story of microalbuminuria and diabetic nephropathy. **J Nephrology**. v. 2, n.4, p. 2013.

ROZENGURT, N. *et al.* Colocalization of the α -subunit of gustducin with PYY and GLP-1 in L cells of human colon. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**. v. 291, p. G792–G802. 2006.

RUAN, H.; DONG, L. Q. Adiponectin signaling and function in insulin target tissues. **Journal of Molecular Cell Biology**. v. 8, n.2, p. 101–109. 2016.

SAKURAI, H. A New Concept: The Use of Vanadium Complexes in the Treatment of Diabetes Mellitus. **The Chemical Record**. v. 2, p. 237–248. 2002.

SAKURAI, H. *et al.* Orally active and long-term acting insulin-mimetic vanadyl complex: Bis(picolinato)oxovanadium(IV). **Biochemical and Biophysical Research Communications**. v. 214, n.3, p. 1095-1101. 1995.

SAKURAI, H. *et al.* An orally active antidiabetic vanadyl complex, bis(1-oxy-2-pyridinethiolato)oxovanadium(IV), with VO(S₂O₂) coordination mode; in vitro and in vivo evaluations in rats. **Journal of Inorganic Biochemistry**. v. 80, p. 90-105. 2000.

SALANTI, G. *et al.* Underlying Genetic Models of Inheritance in Established Type 2 Diabetes Associations. **Am J Epidemiol**. v. 170, n.5, p. 537–545. 2009.

SALBE, A. D. *et al.* Taste preferences and body weight changes in an obesity-prone population. **Am. J. Clin. Nutr**. v. 79, p. 372–378. 2004.

SÁLICE, V. C. *et al.* Tyrosine phosphorylation and morphological transformation induced by four vanadium compounds on MC3T3E1 cells. **Molecular and Cellular Biochemistry**. v. 198, p. 119–128. 1999.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. R.; MANIATIS, T. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2nd ed.)**. NY: Cold Spring Harbor, 1989.

SÁNCHEZ-GONZÁLEZ, C. *et al.* Changes in Iron Metabolism and Oxidative Status in STZ-Induced Diabetic Rats Treated with Bis(maltolato) Oxovanadium (IV) as an Antidiabetic Agent. **The ScientificWorld Journal**. v. p. 1-6. 2014.

SÁNCHEZ-LARA, E. *et al.* Decavanadate Salts of Cytosine and Metformin: A Combined Experimental-Theoretical Study of Potential Metallodrugs Against Diabetes and Cancer. **Frontiers in Chemistry**. v. 6, p. 402. 2018.

SÁNCHEZ-LOMBARDO, I. *et al.* Evaluating transition state structures of vanadium–phosphatase protein complexes using shape analysis. **J Inorg Biochem**. v. 147, p. 153–164. 2015.

SÁNCHEZ, D.; MIGUEL, M.; ALEIXANDRE, A. Dietary fiber, gut peptides, and adipocytokines. **J Med Food**. v. 15, n.3, p. 223-30. 2012.

SANCHEZ, D. *et al.* Developmental Toxicity Evaluation of Orthovanadate in the Mouse. **Biological Trace Element Research**. v. 30, p. 219-226. 1991.

SANNA, D.; MICERA, G.; GARRIBBA, E. On the Transport of Vanadium in Blood Serum. **Inorg. Chem**. v. 48, p. 5747–5757. 2009.

SANNA, D.; MICERA, G.; GARRIBBA, E. Interaction of VO₂⁺ Ion and Some Insulin-Enhancing Compounds with Immunoglobulin G. **Inorg. Chem**. v. 50, p. 3717–3728. 2011.

SANNA, D. *et al.* Interaction of Antidiabetic Vanadium Compounds with Hemoglobin and Red Blood Cells and Their Distribution between Plasma and Erythrocytes. **Inorg Chem**. v. 53, n.3, p. 1449–1464. 2014.

SANNA, D. *et al.* Biorelevant reactions of the potential anti-tumor agent vanadocene dichloride. **Metallomics**. v. 8, n.5, p. 532–541. 2016.

SANNA, D. *et al.* Speciation of potential anti-diabetic vanadium complexes in real serum samples. **J Inorg Biochem**. v. 173, p. 52–65. 2017.

SANTIAGO, R. M. *et al.* Depressive-like behaviors alterations induced by intranigral MPTP, 6-OHDA, LPS and rotenone models of Parkinson's disease are predominantly associated with serotonin and dopamine. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**. v. 34, p. 1104–1114. 2010.

SARMIENTO-ORTEGA, V. E. *et al.* Sodium metavanadate treatment improves glycogen levels in multiple tissues in a model of metabolic syndrome caused by chronic cadmium exposure in Wistar rats. **BioMetals**. v. 34, p. 245–258. 2021.

SARWAR, N. *et al.* Diabetes mellitus, fasting blood glucose concentration, and risk of vascular disease: a collaborative meta-analysis of 102 prospective studies. **Lancet**. v. 375, n.9733, p. 2215-22. 2010.

SBD. **Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes 2019-2020**. São Paulo: Clannad Editora Científica, 2019.

SCHERER, P. E. *et al.* A novel serum protein similar to C1q, produced exclusively in adipocytes. **J Biol Chem**. v. 270, n.45, p. 26746-26749. 1995.

SCHINDHELM, R. K.; DIAMANT, M.; DEKKER, J. M. Alanine aminotransferase as a marker of non-alcoholic fatty liver disease in relation to type 2 diabetes mellitus and cardiovascular disease. **Diabetes Metab. Res. Rev.** v. 22, p. 437–443. 2006.

SCHLEINITZ, D.; DISTEFANO, J. K.; KOVACS, P. Targeted SNP genotyping using the TaqMan® assay. **Methods Mol Biol**. v. 700, p. 77-87. 2011.

SCHNELL, O. *et al.* Type 1 diabetes and cardiovascular disease. **Cardiovasc Diabetol**. v. 12, p. 156. 2013.

SCHNOR, N. P. P. *et al.* Association of 5-HT2C (rs3813929) and UCP3 (rs1800849) gene polymorphisms with type 2 diabetes in obese women candidates for bariatric surgery. **Arch Endocrinol Metab**. v. 61, n.4, p. 326-331. 2017.

SCHOFIELD, J.; HO, J.; SORAN, H. Cardiovascular Risk in Type 1 Diabetes Mellitus. **Diabetes Ther**. v. 10, n.3, p. 773-789. 2019.

SCHWAB, K. O. *et al.* Spectrum and prevalence of atherogenic risk factors in 27,358 children, adolescents, and young adults with type 1 diabetes: cross-sectional data from the German diabetes documentation and quality management system (DPV). **Diabetes Care**. v. 29, n.2, p. 218-25. 2006.

ŚCIBIOR, A. *et al.* Evaluation of lipid peroxidation and the level of some elements in rat erythrocytes during separate and combined vanadium and magnesium administration. **Chem Biol Interact**. v. 93, p. 1–10. 2018.

SCRIDON, A. *et al.* Aortic rings of Wistar rats with streptozotocin-induced diabetes mellitus display time-dependent changes in contractility, endothelium-dependent and -independent relaxation. **Acta Endocrinologica (Buc)**. v. 6, n.3, p. 276-283. 2015.

SELKOE, D. J.; HARDY, J. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease at 25 years. **EMBO Mol Med**. v. 8, n.6, p. 595-608. 2016.

SELLING, A. *et al.* Multicomponent polyanions. 47. The aqueous vanadophosphate system. **Inorg Chem**. v. 33, p. 3141–3150. 1994.

SELMAN, M. *et al.* Multi-modal potentiation of oncolytic virotherapy by vanadium compounds. **Mol Ther**. v. 26, n.1, p. 56–69. 2018.

SEMIZ, S.; MCNEILL, H. Oral treatment with vanadium of Zucker fatty rats activates muscle glycogen synthesis and insulin-stimulated protein phosphatase-1 activity. **Mol Cell Biochem.** v. 236, p. 123–131. 2002.

SERAL-CORTES, M. *et al.* Development of a Genetic Risk Score to predict the risk of overweight and obesity in European adolescents from the HELENA study. **Sci. Rep.** . v. 11, p. 1-11. 2021.

SERRANO, J. *et al.* The Ile191Val is a partial loss-of-function variant of the TAS1R2 sweet-taste receptor and is associated with reduced glucose excursions in humans. **Mol Metab.** v. 54, p. 101339. 2021.

SHAFER, M. M. *et al.* Chemical speciation of vanadium in particulate matter emitted from diesel vehicles and urban atmospheric aerosols. **Environ Sci Technol.** v. 46, n.1, p. 189–195. 2012.

SHARMA, S. *et al.* Diabetic fatty liver disease is associated with specific changes in blood-borne markers. **Diabetes Metab Res Rev.** v. 28, p. 343–348. 2012.

SHI, X.; DALAL, N. S. Vanadate-mediated hydroxyl radical generation from superoxide radical in the presence of NADH: Haber-Weiss vs. Fenton mechanism. **Arch Biochem Biophys.** v. 307, p. 336–341. 1993.

SHIH, P. H. *et al.* Fucoidan and Fucoxanthin Attenuate Hepatic Steatosis and Inflammation of NAFLD through Modulation of Leptin/Adiponectin Axis. **Mar. Drugs.** v. 19, p. 148. 2021.

SIITONEN, N. *et al.* Association of ADIPOQ gene variants with body weight, type 2 diabetes and serum adiponectin concentrations: the Finnish Diabetes Prevention Study. **BMC Medical Genetics.** v. 12, n.5, p. 2011.

SILVA, T. C. P. *et al.* Efeito do tamoxifeno no perfil das proteínas plasmáticas em condição de diabetes mellitus tipo 1. **Acta Cirúrgica Brasileira.** v. 20, n.1, p. 85-93. 2005.

SIMENTAL-MENDIA, L. E. *et al.* The triglyceride and glucose index is a useful biomarker to recognize glucose disorders in apparently healthy children and adolescents. **Eur J Pediatr.** v. 179, n.6, p. 953-958. 2020.

SIMMONS, S. O.; FAN, C. Y.; RAMABHADHAN, R. Cellular stress response pathway system as a sentinel ensemble in toxicological screening. **Toxicol Sci.** v. 111, p. 202–225. 2009.

SIMON, B. R. *et al.* Sweet Taste Receptor Deficient Mice Have Decreased Adiposity and Increased Bone Mass. **PLoS ONE.** v. 9, n.1, p. 1-11. 2014.

SIMON, B. R. *et al.* Artificial sweeteners stimulate adipogenesis and suppress lipolysis independently of sweet taste receptors. **J Biol Chem.** v. 288, p. 32475–32489. 2013.

SKALNY, A. V. *et al.* The level of toxic and essential trace elements in hair of petrochemical workers involved in different technological processes. **Environ Sci Pollut Res Int.** v. 24, n.6, p. 5576–5584. 2017.

SMITH, A. D. *et al.* Genetic and environmental influences on food preferences in adolescence. **Am J Clin Nutr.** v. 104, p. 446–453. 2016.

SMITH, C. A.; AINSCOUGH, E. W.; BRODIE, A. M. Complexes of human lactoferrin with vanadium in oxidation states +3, +4 and +5. **Chem Soc Dalton Trans.** v. 7, p. 1121–1126. 1995.

SO, W. Y. *et al.* Genetics of type 2 diabetes mellitus. **Hong Kong Med J.** v. 6, n.1, p. 69-76. 2000.

SOKOL, M. C. *et al.* Impact of medication adherence on hospitalization risk and healthcare cost. **Med Care.** v. 43, n.6, p. 521-30. 2005.

SONG, X. *et al.* Low-Fat High-Carbohydrate Diet Reduces Plasma Total Adiponectin Concentrations Compared to a Moderate-Fat Diet with No Impact on Biomarkers of Systemic Inflammation in a Randomized Controlled Feeding Study. **Eur. J. Nutr.** . v. 55, p. 237–246. 2016.

SOUSA, G. R. *et al.* Glycemic Control, Cardiac Autoimmunity, and Long-Term Risk of Cardiovascular Disease in Type 1 Diabetes Mellitus. **Circulation.** v. 139, n.6, p. 730-743. 2019.

SOVEID, M.; DEH GHANI, G. A.; OMRANI, G. R. Long- term efficacy and safety of vanadium in the treatment of type 1 diabetes. **Arch Iran Med.** v. 16, n.7, p. 408-411. 2013.

SRINIVASAN, S. *et al.* Influence of serum lipids on the incidence and progression of diabetic retinopathy and macular oedema- Sankara Nethralaya Diabetic Retinopathy Epidemiology and Molecular Genetics Study (SN-DREAMS II). **Clinical and Experimental Ophthalmology.** v. 45, n.9, p. 894-900. 2017.

SRIVASTAVA, A. K.; MEHDI, M. Z. Insulino-mimetic and anti-diabetic effects of vanadium compounds. **Diabetes UK. Diabetic Medicine.** v. 22, p. 2-13. 2004.

STEINBERG, G. R.; KEMP, B. E. Adiponectin: starving for attention. **Cell Metab.** v. 6, n.1, p. 3-4. 2007.

STERN, J. H.; RUTKOWSKI, J. M.; SCHERER, P. E. Adiponectin, Leptin, and Fatty Acids in the Maintenance of Metabolic Homeostasis through Adipose Tissue Crosstalk. **Cell Metab.** v. 23, n.5, p. 770-84. 2016.

STUMVOLL, M.; GOLDSTEIN, B. J.; VAN HAEFTEN, T. W. Type 2 diabetes: principles of pathogenesis and therapy. **Lancet.** v. 365, n.9467, p. 1333-46. 2005.

STUMVOLL, M. *et al.* Association of the T-G polymorphism in adiponectin (exon 2) with obesity and insulin sensitivity: interaction with family history of type 2 diabetes. **Diabetes**. v. 51, n.1, p. 37-41. 2002.

SUGIYAMA, H. *et al.* Regulation of the physiological effects of peroxidovanadium(V) complexes by the electronic nature of ligands. **J Inorg Biochem**. v. 121, p. 66-76. 2012.

SUN, L. *et al.* Vanadium exposure-induced striatal learning and memory alterations in rats. **NeuroToxicology**. v. 62, p. 124-129. 2017.

SZKUDELSKI, T. The Mechanism of Alloxan and Streptozotocin Action in B Cells of the Rat Pancreas. **Physiol. Res**. v. 50, p. 536-546. 2001.

TAKEMURA, Y. *et al.* Adiponectin Modulates Inflammatory Reactions Via Calreticulin Receptor-Dependent Clearance of Early Apoptotic Bodies. **J. Clin. Investig**. v. 117, p. 375-386. 2007.

TAKINO, T. *et al.* A new halogenated antidiabetic vanadyl complex, bis(5-iodopicolinato)oxovanadium(IV): in vitro and in vivo insulinomimetic evaluations and metallokinetic analysis. **J Biol Inorg Chem**. v. 6, n.2, p. 133-142. 2001.

TAN, S. Y. *et al.* Type 1 and 2 diabetes mellitus: A review on current treatment approach and gene therapy as potential intervention. **Diabetes Metab Syndr**. v. 13, n.1, p. 364-372. 2019.

TAN, S. Y. *et al.* Type 1 and 2 diabetes mellitus: A review on current treatment approach and gene therapy as potential intervention. **Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews**. v. 13, p. 364-372. 2019.

TANAKA, Y. *et al.* Adiponectin Promotes Muscle Regeneration through Binding to T-Cadherin. **Sci. Rep.** . v. 9, n.16, p. 2019.

TANG, N. *et al.* The Controversial Role of Adiponectin in Appetite Regulation of Animals. **Nutrients**. v. 13, n.10, p. 2021.

TANIGUCHI, Y. *et al.* Serum uric acid and the risk for hypertension and Type 2 diabetes in Japanese men: The Osaka Health Survey. **J Hypertens**. v. 19, n.7, p. 1209-15. 2001.

TARDIF, A. *et al.* Stimulation of glucose uptake by chronic vanadate pretreatment in cardiomyocytes requires PI 3-kinase and p38 MAPK activation. **Am J Physiol Endocrinol Metab**. v. 284, n.6, p. E1055-64. 2003.

TEKUS, E. *et al.* Body fat of rats of different age groups and nutritional states: assessment by micro-CT and skinfold thickness. **J Appl Physiol**. v. 124, p. 268-275. 2018.

TELO, G. H. *et al.* Prevalence of type 2 diabetes among adolescents in Brazil: Findings from Study of Cardiovascular Risk in Adolescents (ERICA). **Pediatr Diabetes**. v. 20, n.4, p. 389-396. 2019.

THE DIABETES CONTROL AND COMPLICATIONS TRIAL RESEARCH GROUP. The absence of a glycemic threshold for the development of long-term complications: the perspective of the Diabetes Control and Complications Trial. **Diabetes**. v. 45, n.10, p. 1289-98. 1996.

THE INTERNATIONAL EXPERT COMMITTEE. International Expert Committee report on the role of the A1C assay in the diagnosis of diabetes. **Diabetes Care**. v. 32, n.7, p. 1327-34. 2009.

THOMPSON, K. H. *et al.* Vanadium treatment of type 2 diabetes: A view to the future. **Journal of Inorganic Biochemistry**. v. 103, p. 554–558. 2009.

TIAGO, D. M.; CANCELA, M. L.; LAIZÉ, V. Proliferative and mineralogenic effects of insulin, IGF-1, and vanadate in fish osteoblast-like cells. . **J Bone Miner Metab**. v. 29, n.3, p. 377–382. 2011.

TIAGO, D. M. *et al.* Impairment of mineralization by metavanadate and decavanadate solutions in a fish bone-derived cell line. **Cell Biol Toxicol**. v. 24, p. 253–263. 2008.

TODA, Y. *et al.* Two Distinct Determinants of Ligand Specificity in T1R1/T1R3 (the Umami Taste Receptor). **The journal of biological chemistry**. v. 288, n.52, p. 36863–36877. 2013.

TOMKIN, G. H. Targets for intervention in dyslipidemia in diabetes. **Diabetes Care**. v. 31 Suppl 2, p. S241-8. 2008.

TOMMERDAHL, K. L. *et al.* Impact of Obesity on Measures of Cardiovascular and Kidney Health in Youth With Type 1 Diabetes as Compared With Youth With Type 2 Diabetes. **Diabetes Care**. v. 44, p. 795–803. 2021.

TORKAMANI, A.; WINEINGER, N. E.; TOPOL, E. J. The personal and clinical utility of polygenic risk scores. **Nat Rev Genet**. v. 19, n.9, p. 581-590. 2018.

TRACEY, A. S.; WILLISKY, G. R.; TAKEUCHI, E. S. **The influence of vanadium compounds on biological systems; vanadium: chemistry, biochemistry, pharmacology, and practical applications**. Boca Raton: CRS Press Taylor & Francis Group, 2007.

TREBERG, J. R.; STACEY, J. E.; DRIEDZIC, W. R. Vanadium accumulation in ascidian coelomic cells is associated with enhanced pentose phosphate pathway capacity but not overall aerobic or anaerobic metabolism. **Comp BiochemPhysiol B BiochemMol Biol**. v. 161, n.4, p. 2012.

TREVIÑO, S.; DIAZ, A. Vanadium and insulin: Partners in metabolic regulation. **Journal of Inorganic Biochemistry**. v. 208, p. 111094. 2020.

TREVIÑO, S. *et al.* Vanadium in Biological Action: Chemical, Pharmacological Aspects, and Metabolic Implications in Diabetes Mellitus. **Biological Trace Element Research**. v. 188, p. 68–98. 2019.

TREVIÑO, S. *et al.* Metforminium Decavanadate as a Potential Metallopharmaceutical Drug for the Treatment of Diabetes Mellitus. **Oxidative Med Cell Longev**. v. 14, p. 2016.

TREVISAN, M. *et al.* Syndrome X and mortality: a population-based study. Risk Factor and Life Expectancy Research Group. **Am J Epidemiol**. v. 148, n.10, p. 958-66. 1998.

TRIPATHI, D.; MANI, V.; PAL, R. P. Effect of Vanadium Supplementation on Production Performance, Nutrient Utilization, Plasma Mineral Concentration, and Mineral Balance in Lactating Goats. **Biological Trace Element Research**. v. 1, p. 1-7. 2018.

TUOMILEHTO, J. *et al.* Update on Worldwide Trends in Occurrence of Childhood Type 1 Diabetes in 2020. **Pediatr Endocrinol Rev**. v. 17, n.Suppl 1, p. 198-209. 2020.

TUOMILEHTO, J. *et al.* Plasma uric acid level and its association with diabetes mellitus and some biologic parameters in a biracial population of Fiji. **Am J Epidemiol**. v. 127, n.2, p. 321-36. 1988.

TURER, A. T. *et al.* Adipose tissue mass and location affect circulating adiponectin levels. **Diabetologia**. v. 54, p. 2515–2524. 2011.

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**. v. 281, n.21, p. 2005-2012. 1999.

TURNER, T. L. *et al.* Inhibitory effects of decavanadate on several enzymes and *Leishmania tarentolae* In Vitro. **J Inorg Biochem Genet**. v. 108, p. 96–104. 2012.

TURTOI, M. *et al.* Synthesis, Characterization, and In Vitro Insulin-Mimetic Activity Evaluation of Valine Schiff Base Coordination Compounds of Oxidovanadium(V). **Biomedicines**. v. 9, n.562, p. 2021.

UECKERT, S. *et al.* Improved Utilization of ADAS-Cog Assessment Data Through Item Response Theory Based Pharmacometric Modeling. **Pharm Res**. v. 31, p. 2152-2165. 2014.

UKKOLA, O. *et al.* Adiponectin polymorphisms, adiposity and insulin metabolism: HERITAGE family study and Oulu diabetic study. **Annals of Medicine**. v. 37, n.2, p. 141-150. 2005.

- VATNER, D. F. *et al.* Insulin-independent regulation of hepatic triglyceride synthesis by fatty acids. **Proc Natl Acad Sci U S A**. v. 112, n.4, p. 1143–1148. 2015.
- VENKATACHALAPATHY, P. *et al.* Pharmacogenomics and Personalized Medicine in Type 2 Diabetes Mellitus: Potential Implications for Clinical Practice. **Pharmgenomics Pers Med**. v. 14, p. 1441-1455. 2021.
- VILLARREAL-MOLINA, M. T.; ANTUNA-PUENTE, B. Adiponectin: anti-inflammatory and cardioprotective effects. **Biochimie**. v. 94, n.10, p. 2143-9. 2012.
- VIONNET, N. *et al.* Analysis of 14 candidate genes for diabetic nephropathy on chromosome 3q in European populations: strongest evidence for association with a variant in the promoter region of the adiponectin gene. **Diabetes**. v. 55, n.11, p. 3166-74. 2006.
- VISTISEN, D. *et al.* Prediction of First Cardiovascular Disease Event in Type 1 Diabetes Mellitus: The Steno Type 1 Risk Engine. **Circulation**. v. 133, n.11, p. 1058-66. 2016.
- VOZAROVA, B. *et al.* High alanine aminotransferase is associated with decreased hepatic insulin sensitivity and predicts the development of type 2 diabetes **Diabetes**. v. 51, p. 1889–1895. 2002.
- WAKAI, K. *et al.* Genome-Wide Association Study of Genetic Factors Related to Confectionery Intake: Potential Roles of the ADIPOQ Gene. **Obesity**. v. 21, p. 2413-2419. 2013.
- WAKSMONSKI, J. C.; KOPPEL, K. Variation in human sweet taste receptor may result in different levels of sweet intensity variability between sweet stimuli. **International Journal of Food Science and Technology**. v. 51, p. 1958–1966. 2016.
- WANG, J. *et al.* Vanadate oxidative and apoptotic effects are mediated by the MAPK-Nrf2 pathway in layer oviduct magnum epithelial cells. **Metallomics**. v. 9, n.11, p. 1562–1575. 2017.
- WANG, K. *et al.* Association of genetic and environmental factors with dental caries among adolescents in south China: A cross-sectional study. **European Journal of Paediatric Dentistry**. v. 21, n.2, p. 129-136. 2020.
- WANG, L. *et al.* Molecular and Functional Characterization of the Adiponectin (Adipoq) Gene in Goat Skeletal Muscle Satellite Cells. Asian Australas. **J. Anim. Sci.** v. 31, p. 1088–1097. 2018.
- WANG, X. *et al.* APM1 gene variants S11377C/G and 4545G/C are associated respectively with obesity and with non-obesity in Chinese type 2 diabetes. **Diabetes Research and Clinical Practice**. v. 84, n.3, p. 205-210. 2009.

WANG, Y. *et al.* Post-translational modifications of adiponectin: Mechanisms and functional implications. **Biochem. J.** . v. 409, n.3, p. 623–633. 2008.

WANG, Y. *et al.* Plasma adiponectin levels and type 2 diabetes risk: a nested case-control study in a Chinese population and an updated meta-analysis. **Sci Rep.** v. 8, n.1, p. 406. 2018.

WANNAMETHEE, S. G. *et al.* Hepatic enzymes the metabolic syndrome, and the risk of type 2 diabetes in older men. **Diabetes Care.** v. 28, p. 2913–2918. 2005.

WEI, D.; LI, M.; DING, W. Effect of vanadate on gene expression of the insulin signaling pathway in skeletal muscle of streptozotocin-induced diabetic rats. **J Biol Inorg Chem.** v. 12, p. 1265–1273. 2007.

WHO. **Expert Committee on Diabetes Mellitus & World Health Organization.** Geneva: World Health Organization., 1980.

WHO. **Obesity:** preventing and managing the global epidemic: Report of a WHO consultation. Geneva, Switzerland: World Health Organization, 2000.

WILK, A.; SZYPULSKA-KOZIARSKA, D.; WISZNIEWSKA, B. The toxicity of vanadium on gastrointestinal, urinary and reproductive system, and its influence on fertility and fetuses malformations. **Postepy Hig Med Dosw.** v. 71, p. 850-859. 2017.

WILLSKY, G. R. *et al.* Diabetes-altered gene expression in rat skeletal muscle corrected by oral administration of vanadyl sulfate. **Physiol Genomics.** v. 26, p. 192–201. 2006.

WILLSKY, G. R.; GOLDFINE, A. B.; KOSTYNIK, P. J. Pharmacology and toxicology of oxovanadium species: oxovanadium pharmacology. **ACS Symp Ser.** v. 711, p. 278–296. 1998.

WILLSKY, G. R. *et al.* Coordination chemistry may explain pharmacokinetics and clinical response of vanadyl sulfate in type 2 diabetic patients. **Metallomics.** v. 5, p. 1491–1502. 2013.

WILLSKY, G. R. *et al.* Effect of vanadium(IV) compounds in the treatment of diabetes: in vivo and in vitro studies with vanadyl sulfate and bis(maltolato)oxovanadium(IV). **Journal of Inorganic Biochemistry.** v. 85, p. 33–42. 2001.

WOODING, S. *et al.* Natural Selection and Molecular Evolution in PTC, a Bitter-Taste Receptor Gene. **Am. J. Hum. Genet.** v. 74, p. 637–646. 2004.

XIA, J. Y. *et al.* Targeted Induction of Ceramide Degradation Leads to Improved Systemic Metabolism and Reduced Hepatic Steatosis. **Cell Metab.** v. 22, n.2, p. 266-278. 2015.

XIE, M.-J. *et al.* A new insulin-enhancing agent: [N,N0-bis(4-hydroxysalicylidene)-o-phenylenediamine]oxovanadium(IV) and its permeability and cytotoxicity. **European Journal of Medicinal Chemistry**. v. 45, p. 2327-2335. 2010.

XIE, M. *et al.* Effects of vanadium (III, IV, V)-chlorodipicolinate on glycolysis and antioxidant status in the liver of STZ-induced diabetic rats. **J Inorg Biochem**. v. 136, p. 47–56. 2014.

YAMAUCHI, T.; KADOWAKI, T. Adiponectin Receptor as a Key Player in Healthy Longevity and Obesity-Related Diseases. **Cell Metabolism Review**. v. 15, n.5, p. 185-196. 2013.

YAMAUCHI, T. *et al.* Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects. **Nature**. v. 423, p. 762–769. 2003.

YAMAUCHI, T. *et al.* Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. **Nat Med**. v. 8, n.11, p. 1288-1295. 2002a.

YAMAUCHI, T. *et al.* Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. **Nat Med**. v. 8, n.11, p. 1288-95. 2002b.

YAMAUCHI, T. *et al.* The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipodystrophy and obesity. **Nat Med**. v. 7, n.8, p. 941-6. 2001.

YAN, F.; DAI, G.; ZHENG, X. Mulberry anthocyanin extract ameliorates insulin resistance by regulating PI3K/AKT pathway in HepG2 cells and db/db mice. **Journal of Nutritional Biochemistry**. v. 36, p. 68–80. 2016.

YANG, W. *et al.* Medical care and payment for diabetes in China: enormous threat and great opportunity. **PLoS One**. v. 7, n.9, p. e39513. 2012.

YAO, J.; BATTELL, M. L.; MCNEILL, J. H. Acute and chronic response to vanadium following two methods of streptozotocin-diabetes induction. **Can J Physiol Pharmacol**. v. 75, n.2, p. 83-90. 1997.

YARYURA-TOBIAS, J. A.; PINTO, A.; NEZIROGLU, F. Anorexia Nervosa, Diabetes Mellitus, Brain Atrophy, and Fatty Liver. **Diabetes Mellitus and Anorexia Nervosa**. v. 30, n.3, p. 350-353. 2001.

YENGO, L. *et al.* Meta-analysis of genome-wide association studies for height and body mass index in ~700000 individuals of European ancestry. **Hum. Mol. Genet**. v. 27, p. 3641-3649. 2018.

YKI-JARVINEN, H. Non-alcoholic fatty liver disease as a cause and a consequence of metabolic syndrome. **Lancet Diabetes Endocrinol**. v. 2, p. 901–910. 2014.

YOO, H. G. *et al.* Prevalence of insulin resistance and metabolic syndrome in patients with gouty arthritis. **Rheumatol Int.** v. 31, n.4, p. 485-91. 2011.

YOON, M. J. *et al.* Adiponectin increases fatty acid oxidation in skeletal muscle cells by sequential activation of AMP-activated protein kinase, p38 mitogen-activated protein kinase, and peroxisome proliferator-activated receptor alpha. **Diabetes.** v. 55, n.9, p. 2562-70. 2006.

YOSHIKAWA, Y. *et al.* Structural and redox requirements for the action of anti-diabetic vanadium compounds. **Dalton Trans.** v. 43, p. 6965–6972. 2014.

YOSHIOKA, K. *et al.* A novel fluorescent derivative of glucose applicable to the assessment of glucose uptake activity of Escherichia coli. **Biochim Biophys Acta.** v. 1289, p. 5-9. 1996.

YOUNG, R. L. *et al.* Disordered Control of Intestinal Sweet Taste Receptor Expression and Glucose Absorption in Type 2 Diabetes. **Diabetes.** v. 62, p. 3532-3541. 2013.

YUAN, Z. H. *et al.* Effect of vanadium and tea polyphenols on intestinal morphology, microflora and short-chain fatty acid profile of laying hens. **Biol Trace Elem Res.** v. 164, p. 419–427. 2016.

ZACHAROVA, J.; CHIASSEON, J. L.; LAAKSO, M. The common polymorphisms (single nucleotide polymorphism [SNP] +45 and SNP +276) of the adiponectin gene predict the conversion from impaired glucose tolerance to type 2 diabetes: the STOP-NIDDM trial. **Diabetes.** v. 54, n.3, p. 893-9. 2005.

ZAFAR, U. *et al.* Metabolic syndrome: an update on diagnostic criteria, pathogenesis, and genetic links. **Hormones (Athens).** v. 17, n.3, p. 299–313. 2018.

ZAPOROWSKA, H.; WASILEWSKI, W. Some selected peripheral blood and haemopoietic system indices in Wistar rats with chronic vanadium intoxication. **Comp Biochem Physiol C Comp Pharmacol Toxicol.** v. 93C, n.1, p. 175–180. 1989.

ZAPOROWSKA, H.; WASILEWSKI, W.; SLOTWINSKA, M. Effect of chronic vanadium administration in drinking water to rats. **BioMetals.** v. 6, n.1, p. 3–10. 1993.

ZARQAMI, A. *et al.* Effects of vanadium supplementation on performance, some plasma metabolites and glucose metabolism in Mahabadi goat kids. **J Anim Physiol Anim Nutr (Berl).** v. 102, n.2, p. e972–e977. 2018.

ZHA, D.; WU, X.; GAO, P. Adiponectin and Its Receptors in Diabetic Kidney Disease: Molecular Mechanisms and Clinical Potential. **Endocrinology.** v. 158, n.7, p. 2022–2034. 2017.

ZHANG, D.-M.; JIAO, R.-Q.; KONG, L.-D. High Dietary Fructose: Direct or Indirect Dangerous Factors Disturbing Tissue and Organ Functions. **Nutrition Reviews.** v. 9, p. 335. 2017.

ZHANG, D. *et al.* A single nucleotide polymorphism alters the sequence of SP1 binding site in the adiponectin promoter region and is associated with diabetic nephropathy among type 1 diabetic patients in the Genetics of Kidneys in Diabetes Study. **J Diabetes Complications**. v. 23, n.4, p. 265-272. 2009.

ZHANG, D. M.; JIAO, R. Q.; KONG, L. D. High Dietary Fructose: Direct or Indirect Dangerous Factors Disturbing Tissue and Organ Functions. **Nutrients**. v. 9, n.4, p. 2017.

ZHANG, Y.-L. *et al.* In vitro study of the cytotoxicities of two mixed-ligand oxovanadium complexes on human hepatoma cells. **Pharmazie**. v. 68, n.10, p. 827-834. 2013.

ZHANG, Z. *et al.* Vanadate induces G2/M phase arrest in p53-deficient mouse embryo fibroblasts. **J Environ Pathol Toxicol Oncol**. v. 21, p. 223–231. 2002.

ZHANG, Z. *et al.* Role of reactive oxygen species and MAPKs in vanadate-induced G2/M phase arrest. **Free Radic Biol Med**. v. 34, p. 1333–1342. 2003.

ZHANG, Z. F. *et al.* Bisperoxovanadium (pyridin-2-squaramide) targets both PTEN and ERK1/2 to confer neuroprotection. **Br J Pharmacol**. v. 174, n.8, p. 641–656. 2017.

ZHAO, H. *et al.* Evolution of the Sweet Taste Receptor Gene Tas1r2 in Bats. **Mol. Biol. Evol.** v. 27, n.11, p. 2642–2650. 2010.

ZHAO, Q. *et al.* Oxidovanadium(IV) sulfate-induced glucose uptake in HepG2 cells through IR/Akt pathway and hydroxyl radicals. **Journal of Inorganic Biochemistry**. v. 49, n.1, p. 39–44. 2015.

ZHOU, D. *et al.* Common variant (rs9939609) in the FTO gene is associated with metabolic syndrome. **Mol. Biol. Rep.** v. 39, p. 6555–6561. 2012.

ZIMMET, P. Z. Kelly West Lecture 1991. Challenges in diabetes epidemiology--from West to the rest. **Diabetes Care**. v. 15, n.2, p. 232-52. 1992.

ZOU, C.; WANG, Y.; SHEN, Z. 2-NBDG as a fluorescent indicator for direct glucose uptake measurement. **J. Biochem. Biophys. Methods**. v. 64, p. 207 – 215. 2005.

ANEXO A. APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA DE USO DE ANIMAIS

13/06/2019

SEI/UFPR - 2000842 - CEUA/BIO: Certificado



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Nº 1266 B

CERTIFICADO

A Comissão de Ética no Uso de Animais do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná (CEUA/BIO – UFPR), instituída pela Resolução Nº 86/11 do Conselho de Ensino Pesquisa e Extensão (CEPE), de 22 de dezembro de 2011, **CERTIFICA** que os procedimentos utilizando animais no projeto de pesquisa abaixo especificado estão de acordo com a Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais para fins Científicos e Didáticos (DBCA) estabelecidas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e com as normas internacionais para a experimentação animal.

STATEMENT

The Ethics Committee for Animal Use from the Biological Sciences Section of the Federal University of Paraná (CEUA/BIO – UFPR), established by the Resolution Nº 86/11 of the Teaching Research and Extension Council (CEPE) on December 22nd 2011, **CERTIFIES** that the procedures using animals in the research project specified below are in agreement with the Brazilian Guidelines for Care and Use of Animals for Scientific and Teaching purposes established by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA) and with the international guidelines for animal experimentation.

PROCESSO/PROCESS: 23075 022975/2019-39

APROVADO/APPROVAL: 18/06/2019 – R.O. 05/2019

TÍTULO: Efeito de Oxidovanadato ([VO(HMAL)(2,2'-BIPY)]H₂O) em parâmetro metabólicos de ratos Wistar com diabetes induzida com estreptozotocina.

TITLE: Effect of oxidovanadate ([VO(HMAL)(2,2'-BIPY)]H₂O) in metabolic parameters in STZ diabetic rats.

AUTORES/AUTHORS: Fabiane Gomes de Moraes Rego, Thamise Pitelli de Nigro, Graciele C. M. Manica, Susan Webber de Souza, Carlos Henrique Alves Jesus.

DEPARTAMENTO/DEPARTMENT: Análises Clínicas

Profa. Dra. Katya Naliwaiko
Coordenadora da CEUA

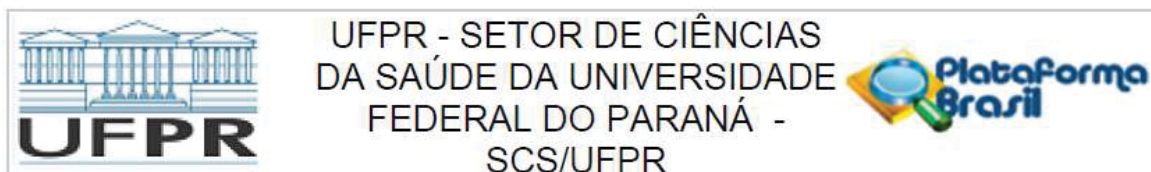


Documento assinado eletronicamente por **ISELEN ABREU FLORENTINO IVANOSKI, MEDICO VETERINARIO**, em 04/08/2019, às 21:26, conforme art. 1º, III, "b", da Lei 11.419/2006.



A autenticidade do documento pode ser conferida [aqui](http://www.ufpr.br/ceua) informando o código verificador **2000842** e o código CRC **1CCBB63D**.

ANEXO B. APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS PARA CRIANÇAS (SINTETIZADO)



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: AVALIAÇÃO DE BIOMARCADORES LABORATORIAIS E MOLECULARES EM CRIANÇAS E ADOLESCENTES SAUDÁVEIS E PORTADORAS DE DIABETES

Pesquisador: Fabiane Gomes de Moraes Rego

Área Temática: Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP;);

Versão: 6

CAAE: 24676613.6.0000.0102

Instituição Proponente: Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas

Patrocinador Principal: Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.661.117

Apresentação do Projeto:

Protocolo oriundo do Programa de Pós-Graduação e Ciências Farmacêuticas intitulado "AVALIAÇÃO DE BIOMARCADORES LABORATORIAIS E MOLECULARES EM CRIANÇAS E ADOLESCENTES SAUDÁVEIS E PORTADORAS DE DIABETES.

Pesquisadora Responsável Profa.Dra.Fabiane Gomes de Moraes Rego e colaboradores

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

CURITIBA, 20 de Abril de 2021

Assinado por:
IDA CRISTINA GUBERT
(Coordenador(a))

Endereço: Rua Padre Camargo, 285 - 1º andar

Bairro: Alto da Glória

UF: PR

Município: CURITIBA

CEP: 80.060-240

Telefone: (41)3360-7259

E-mail: cometica.saude@ufpr.br

ANEXO C. APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS PARA ADULTOS

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 Angheben 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 II (n= 100) e gestacional (n=100), recrutados na Unidade de Diabetes do Serviço de Endocrinologia e Metabologia do Hospital de Clínicas (HC) da UFPR-SEMPR, 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, II 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 Clínicas da UFPR.

CURITIBA, 16 de Abril de 2012

Assinado por:
Claudia Seely Rocco

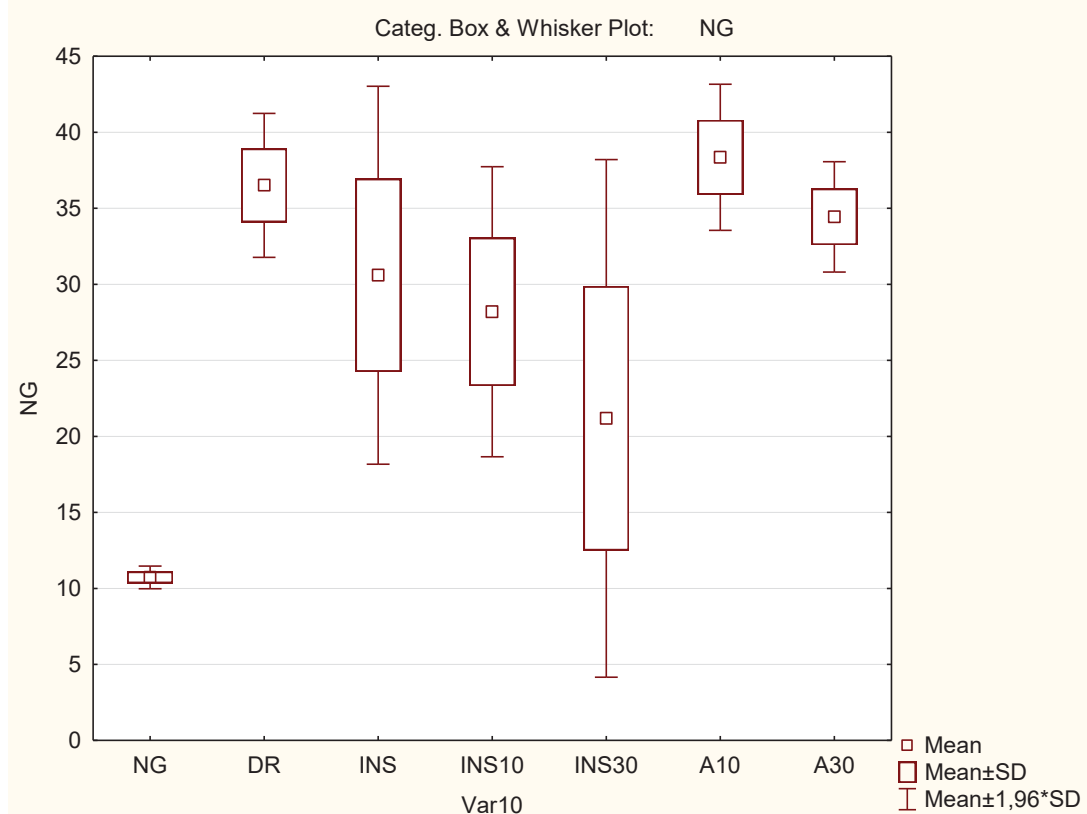
APÊNDICE A. ANÁLISES ESTATÍSTICAS COMPLEMENTARES DOS PARÂMETROS BIOQUÍMICOS

ESTATISTICA DESCRITIVA DOS GRUPOS PARA GLICEMIA

Breakdown Table of Descriptive Statistics (GLU.sta) Smallest N for any variable: 66										
Var10	NG Means	Confidence -95,000%	Confidence +95,000%	NG N	NG Std.Dev.	NG Minimum	NG Maximum	NG Q25	NG Median	NG Q75
NG	10.72383	10.43154	11.01613	9	0.38026	10.21200	11.37750	10.43400	10.71150	10.82250
DR	36.50790	34.78078	38.23502	10	2.41435	32.91150	40.45950	34.13250	36.85200	38.18400
INS	30.59900	25.72452	35.47348	9	6.34147	17.81550	38.07300	28.52700	29.35950	36.13050
INS10	28.19400	24.45257	31.93543	9	4.86742	19.20300	32.96700	26.19600	29.35950	32.19000
INS30	21.18435	14.97060	27.39810	10	8.68622	10.98900	32.63400	11.10000	21.56175	30.30300
A10	38.35050	36.46543	40.23557	9	2.45238	34.68750	42.62400	36.79650	37.85100	39.73800
A30	34.43775	33.11378	35.76172	10	1.85079	31.24650	36.46350	33.24450	35.29800	35.90850
All Grps	28.66827	26.18968	31.14687	66	10.08253	10.21200	42.62400	21.81150	32.30100	36.29700

COMPARAÇÕES ENTRE GRUPOS COM O TESTE DE TUKEY HSD FOR UNEQUAL N.

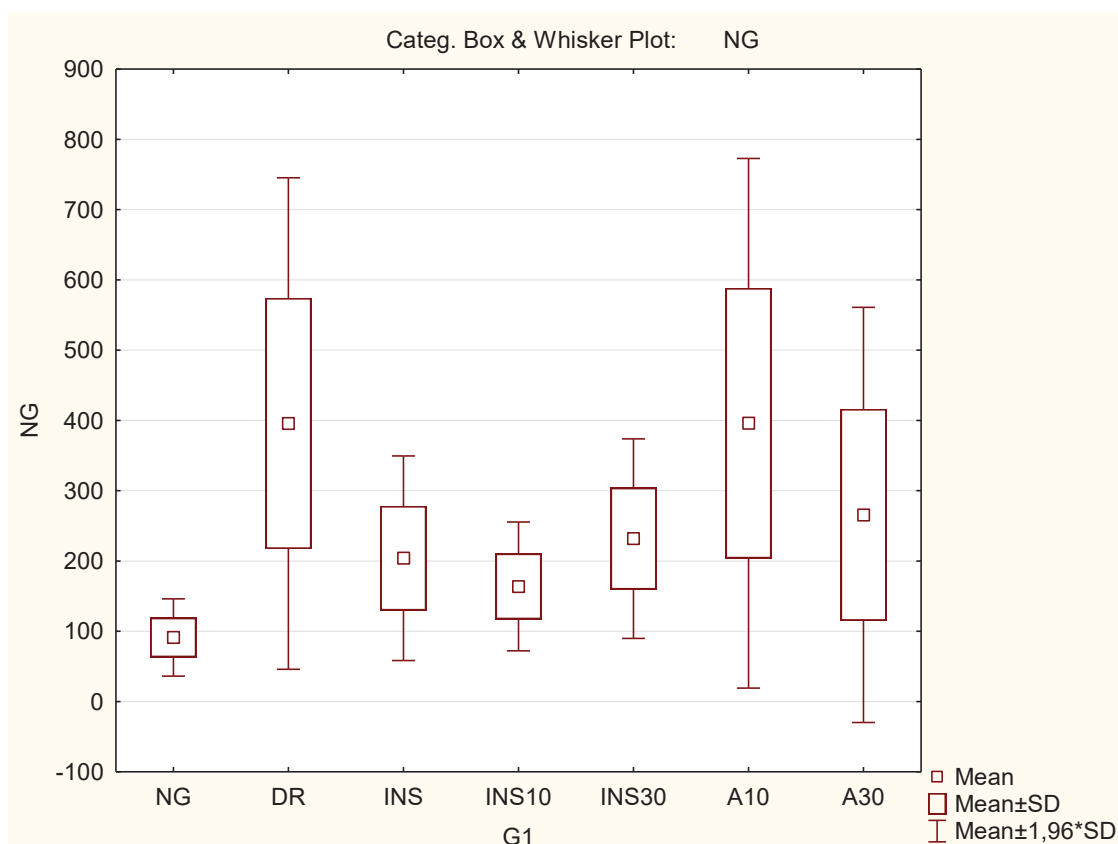
Var10	Unequal N HSD; Variable: NG (GLU.sta) Marked differences are significant at $p < ,05000$						
	{1} M=10,724	{2} M=36,508	{3} M=30,599	{4} M=28,194	{5} M=21,184	{6} M=38,350	{7} M=34,438
NG {1}		0.000133	0.000133	0.000133	0.000445	0.000133	0.000133
DR {2}	0.000133		0.130756	0.007673	0.000133	0.981362	0.956963
INS {3}	0.000133	0.130756		0.932324	0.001697	0.016072	0.605948
INS10 {4}	0.000133	0.007673	0.932324		0.039891	0.000640	0.093290
INS30 {5}	0.000445	0.000133	0.001697	0.039891		0.000133	0.000133
A10 {6}	0.000133	0.981362	0.016072	0.000640	0.000133		0.584275
A30 {7}	0.000133	0.956963	0.605948	0.093290	0.000133	0.584275	



ESTATISTICA DESCRITIVA DOS GRUPOS PARA TRIGLICERÍDEOS

All Groups Breakdown Table of Descriptive Statistics (TG.sta) Smallest N for any variable: 67										
G1	NG Means	Confidence -95,000%	Confidence +95,000%	NG N	NG Std.Dev.	NG Minimum	NG Maximum	NG Q25	NG Median	NG Q75
NG	91.2222	69.6831	112.7613	9	28.0213	56.0000	132.0000	64.0000	98.0000	115.0000
DR	395.7000	268.0462	523.3538	10	178.4477	136.0000	623.0000	211.0000	422.5000	539.0000
INS	204.0000	150.8706	257.1294	10	74.2698	100.0000	343.0000	133.0000	213.5000	238.0000
INS10	163.8767	127.9217	199.8317	9	46.7757	90.0000	241.0000	150.0000	159.8900	173.0000
INS30	231.8000	179.9644	283.6356	10	72.4612	140.0000	327.0000	166.0000	222.0000	316.0000
A10	396.1000	258.5531	533.6469	10	192.2773	112.0000	688.0000	342.0000	380.5000	554.0000
A30	265.6667	149.8379	381.4954	9	150.6876	101.0000	580.0000	138.0000	245.0000	356.0000
All Grps	253.1775	214.4116	291.9433	67	158.9290	56.0000	688.0000	133.0000	211.0000	343.0000

All Groups Unequal N HSD; Variable: NG (TG.sta) Marked differences are significant at p < ,05000							
G1	{1} M=91,222	{2} M=395,70	{3} M=204,00	{4} M=163,88	{5} M=231,80	{6} M=396,10	{7} M=265,67
NG {1}		0.000173	0.469085	0.874087	0.214248	0.000172	0.058971
DR {2}	0.000173		0.016601	0.003623	0.063343	1.000000	0.297764
INS {3}	0.469085	0.016601		0.992929	0.998791	0.016264	0.938427
INS10 {4}	0.874087	0.003623	0.992929		0.905256	0.003548	0.591208
INS30 {5}	0.214248	0.063343	0.998791	0.905256		0.062222	0.997215
A10 {6}	0.000172	1.000000	0.016264	0.003548	0.062222		0.294267
A30 {7}	0.058971	0.297764	0.938427	0.591208	0.997215	0.294267	

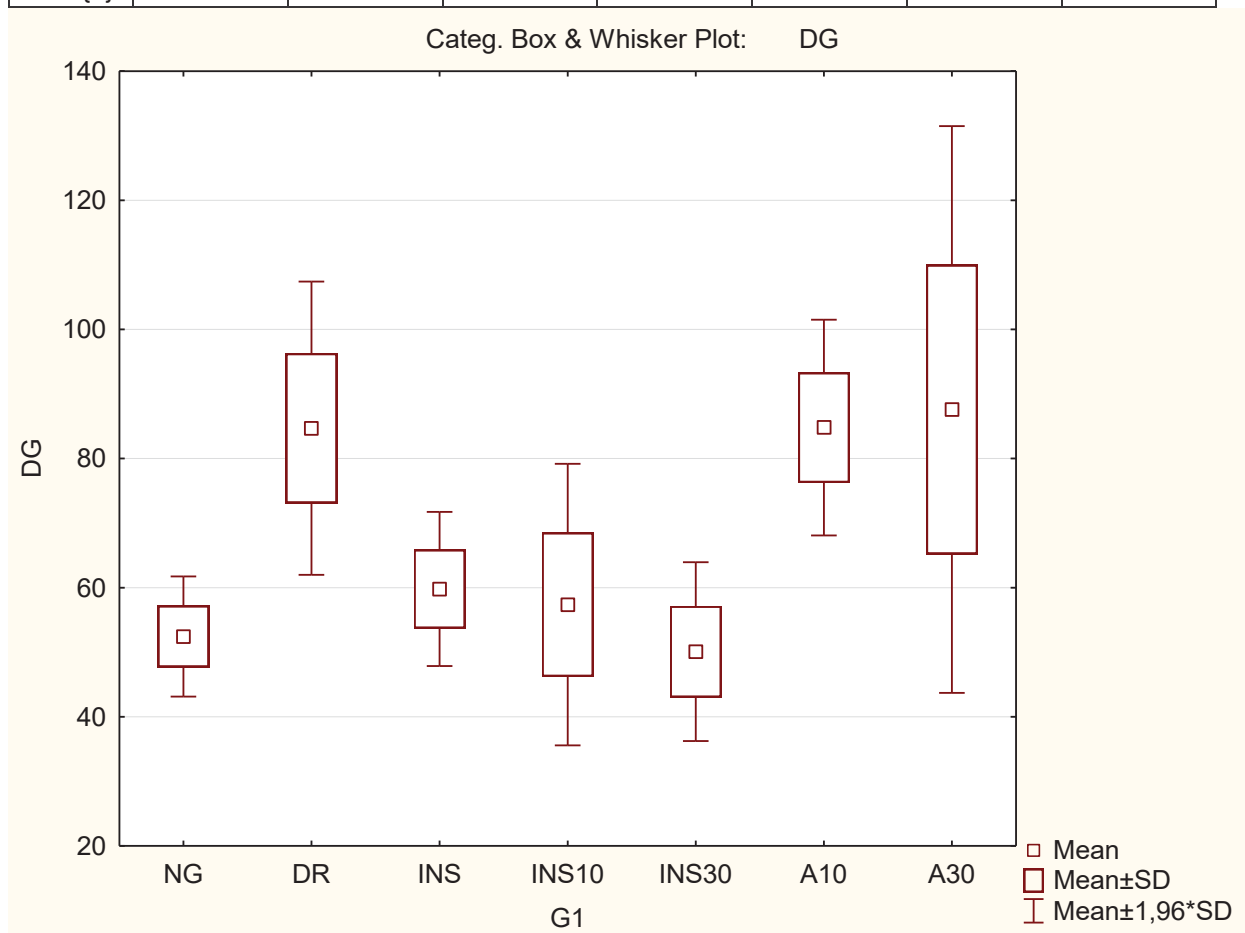


ESTADISTICA DESCRIPTIVA DOS GRUPOS PARA COLESTEROL

Breakdown Table of Descriptive Statistics (COL.sta) N=68 (No missing data in dep. var. list)										
G1	DG Means	Confidence -95,000%	Confidence +95,000%	DG N	DG Std.Dev.	DG Minimum	DG Maximum	DG Q25	DG Median	DG Q75
NG	52.44444	48.79608	56.0928	9	4.74634	47.00000	60.0000	50.00000	50.00000	56.00000

DR	84.70000	76.41194	92.9881	10	11.58591	67.00000	103.0000	74.00000	85.50000	90.00000
INS	59.80000	55.44474	64.1553	10	6.08824	50.00000	67.0000	56.00000	60.50000	65.00000
INS10	57.38222	48.82702	65.9374	9	11.12991	42.00000	77.0000	54.00000	56.44000	65.00000
INS30	50.10000	45.04785	55.1522	10	7.06242	42.00000	64.0000	43.00000	50.00000	55.00000
A10	84.80000	78.70382	90.8962	10	8.52187	73.00000	97.0000	76.00000	87.00000	89.00000
A30	87.60000	71.58211	103.6179	10	22.39147	68.00000	127.0000	71.00000	75.50000	95.00000
All Grps	68.50647	63.84656	73.1664	68	19.25175	42.00000	127.0000	53.50000	65.00000	80.50000

G1	Unequal N HSD; Variable: DG (COL.sta) Marked differences are significant at p < ,05000						
	{1} M=52,444	{2} M=84,700	{3} M=59,800	{4} M=57,382	{5} M=50,100	{6} M=84,800	{7} M=87,600
NG {1}		0.000135	0.832598	0.971804	0.999548	0.000134	0.000132
DR {2}	0.000135		0.000358	0.000247	0.000132	1.000000	0.997832
INS {3}	0.832598	0.000358		0.999460	0.516489	0.000343	0.000157
INS10 {4}	0.971804	0.000247	0.999460		0.839005	0.000240	0.000145
INS30 {5}	0.999548	0.000132	0.516489	0.839005		0.000132	0.000132
A10 {6}	0.000134	1.000000	0.000343	0.000240	0.000132		0.998239
A30 {7}	0.000132	0.997832	0.000157	0.000145	0.000132	0.998239	

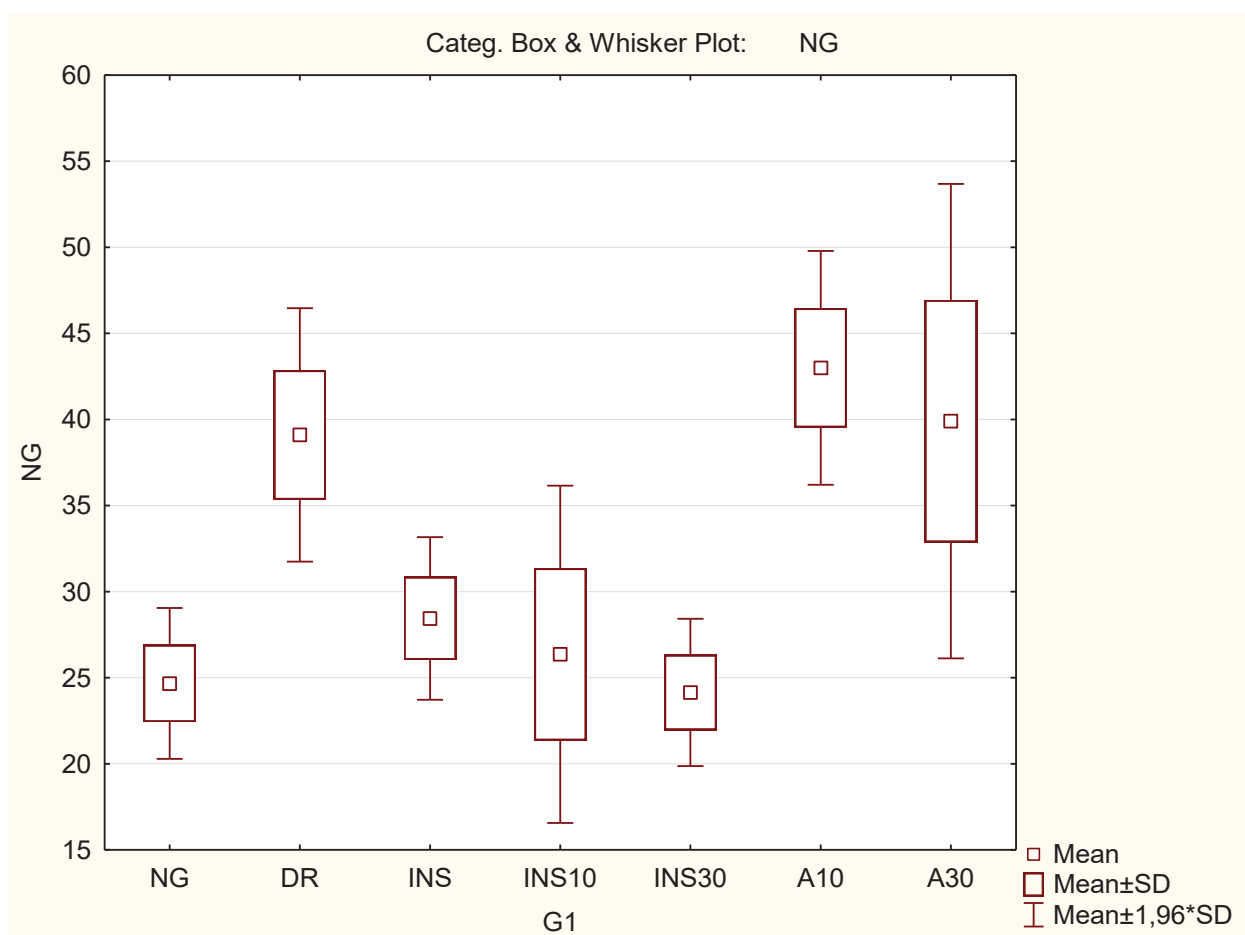


ESTADÍSTICA DESCRIPTIVA DOS GRUPOS PARA HDL

Breakdown Table of Descriptive Statistics (HDL.sta) N=68 (No missing data in dep. var. list)										
G1	NG Means	Confidence -95,000%	Confidence +95,000%	NG N	NG Std.Dev.	NG Minimum	NG Maximum	NG Q25	NG Median	NG Q75
NG	24.66667	22.94787	26.38546	9	2.236068	23.00000	29.00000	23.00000	23.00000	26.00000
DR	39.10000	36.41384	41.78616	10	3.754997	35.00000	46.00000	36.00000	39.00000	42.00000

INS	28.44400	26.72083	30.16717	10	2.408832	25.00000	33.00000	26.00000	28.22000	30.00000
INS10	26.35778	22.51543	30.20012	9	4.998704	19.00000	35.00000	26.00000	26.22000	29.00000
INS30	24.14400	22.58238	25.70562	10	2.183001	21.00000	28.00000	22.00000	24.11000	25.00000
A10	43.00000	40.52193	45.47807	10	3.464102	37.00000	50.00000	41.00000	42.50000	45.00000
A30	39.90000	34.87041	44.92959	10	7.030884	32.00000	50.00000	34.00000	37.00000	46.00000
All Grps	32.42794	30.36754	34.48834	68	8.512226	19.00000	50.00000	25.50000	30.00000	40.00000

G1	Unequal N HSD; Variable: NG (HDL.sta) Marked differences are significant at p < ,05000						
	{1} M=24,667	{2} M=39,100	{3} M=28,444	{4} M=26,358	{5} M=24,144	{6} M=43,000	{7} M=39,900
NG {1}		0.000132	0.447341	0.974368	0.999967	0.000132	0.000132
DR {2}	0.000132		0.000135	0.000132	0.000132	0.344333	0.999463
INS {3}	0.447341	0.000135		0.930222	0.234740	0.000132	0.000132
INS10 {4}	0.974368	0.000132	0.930222		0.909193	0.000132	0.000132
INS30 {5}	0.999967	0.000132	0.234740	0.909193		0.000132	0.000132
A10 {6}	0.000132	0.344333	0.000132	0.000132	0.000132		0.619050
A30 {7}	0.000132	0.999463	0.000132	0.000132	0.000132	0.619050	

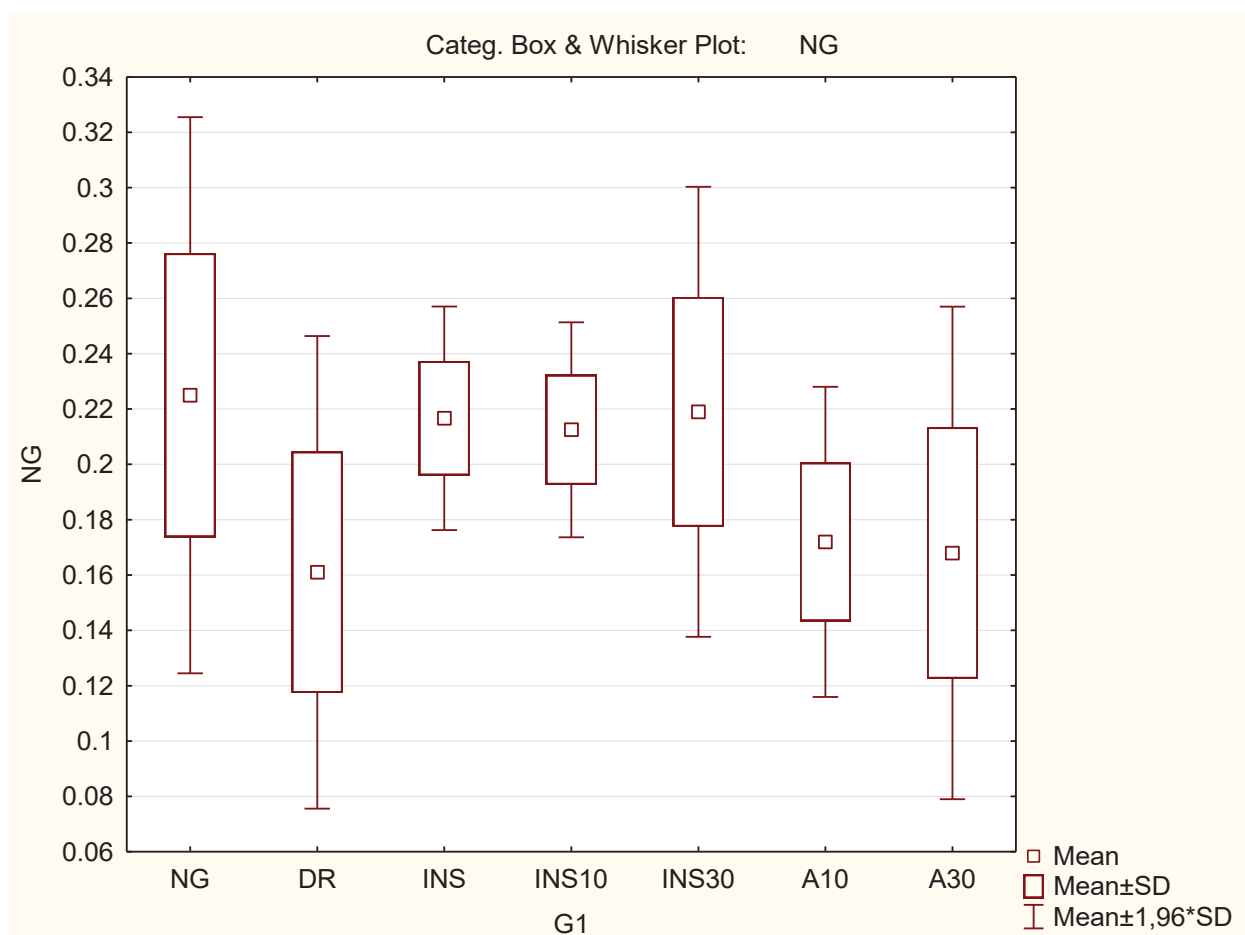


ESTADISTICA DESCRIPTIVA DOS GRUPOS PARA CREATININA

Breakdown Table of Descriptive Statistics (CREA.sta) Smallest N for any variable: 65										
G1	NG Means	Confidence -95,000%	Confidence +95,000%	NG N	NG Std.Dev.	NG Minimum	NG Maximum	NG Q25	NG Median	NG Q75
NG	0.225000	0.182138	0.267862	8	0.051270	0.170000	0.330000	0.185000	0.220000	0.245000
DR	0.161000	0.129827	0.192173	10	0.043576	0.110000	0.270000	0.130000	0.155000	0.170000
INS	0.216667	0.200820	0.232513	9	0.020616	0.200000	0.250000	0.200000	0.210000	0.220000

INS10	0.212500	0.195930	0.229070	8	0.019821	0.190000	0.250000	0.200000	0.205000	0.225000
INS30	0.219000	0.189323	0.248677	10	0.041486	0.160000	0.280000	0.180000	0.220000	0.260000
A10	0.172000	0.151543	0.192457	10	0.028597	0.130000	0.220000	0.150000	0.170000	0.200000
A30	0.168000	0.135514	0.200486	10	0.045412	0.110000	0.260000	0.140000	0.160000	0.190000
All Grps	0.194615	0.183585	0.205645	65	0.044514	0.110000	0.330000	0.160000	0.200000	0.220000

G1	Unequal N HSD; Variable: NG (CREA.sta) Marked differences are significant at $p < ,05000$						
	{1} M=,22500	{2} M=,16100	{3} M=,21667	{4} M=,21250	{5} M=,21900	{6} M=,17200	{7} M=,16800
NG {1}		0.020856	0.999446	0.994262	0.999918	0.092705	0.055600
DR {2}	0.020856		0.042204	0.111106	0.018408	0.994765	0.999614
INS {3}	0.999446	0.042204		0.999990	1.000000	0.177067	0.109549
INS10 {4}	0.994262	0.111106	0.999990		0.999868	0.343644	0.237985
INS30 {5}	0.999918	0.018408	1.000000	0.999868		0.097973	0.055455
A10 {6}	0.092705	0.994765	0.177067	0.343644	0.097973		0.999985
A30 {7}	0.055600	0.999614	0.109549	0.237985	0.055455	0.999985	

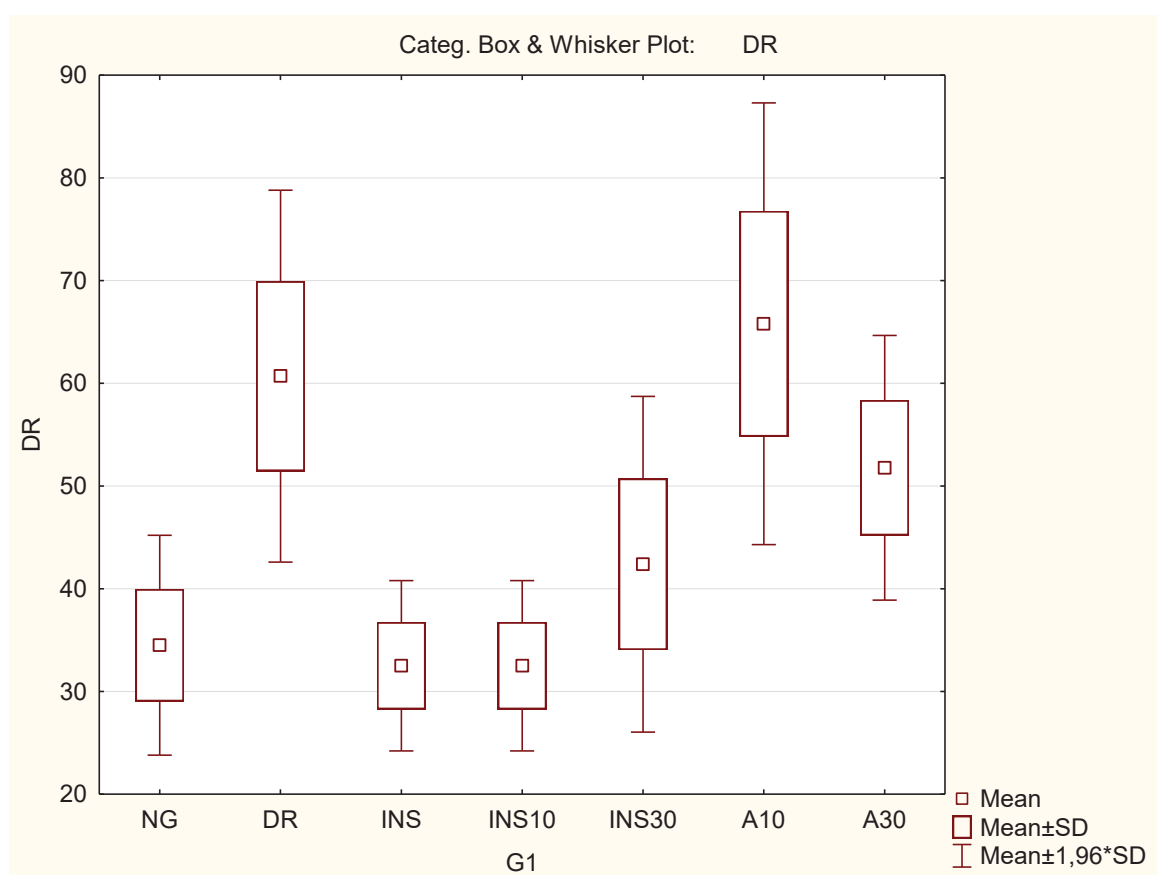


ESTADISTICA DESCRITIVA DOS GRUPOS PARA UREIA

Breakdown Table of Descriptive Statistics (UREA.sta) Smallest N for any variable: 67										
G1	DR Means	Confidence -95,000%	Confidence +95,000%	DR N	DR Std.Dev.	DR Minimum	DR Maximum	DR Q25	DR Median	DR Q75
NG	34.50000	30.59273	38.40727	10	5.46199	26.00000	40.00000	29.00000	35.00000	40.00000
DR	60.70000	54.09139	67.30861	10	9.23821	49.00000	75.00000	54.00000	56.50000	69.00000
INS	32.50667	29.25543	35.75791	9	4.22970	26.00000	40.00000	32.00000	33.00000	33.56000
INS10	32.50667	29.25543	35.75791	9	4.22970	26.00000	40.00000	32.00000	33.00000	33.56000

INS30	42.38800	36.42249	48.35351	10	8.33921	35.00000	65.00000	39.00000	40.50000	42.44000
A10	65.80000	57.95061	73.64939	10	10.97269	43.00000	79.00000	62.00000	65.50000	76.00000
A30	51.77778	46.72590	56.82965	9	6.57225	39.00000	61.00000	48.00000	53.00000	55.00000
All Grps	46.04478	42.43064	49.65891	67	14.81692	26.00000	79.00000	33.56000	40.00000	57.00000

G1	Unequal N HSD; Variable: DR (UREA.sta) Marked differences are significant at p < ,05000						
	{1} M=34,500	{2} M=60,700	{3} M=32,507	{4} M=32,507	{5} M=42,388	{6} M=65,800	{7} M=51,778
NG {1}		0.000132	0.997635	0.997635	0.237945	0.000132	0.000285
DR {2}	0.000132		0.000132	0.000132	0.000148	0.731966	0.169897
INS {3}	0.997635	0.000132		1.000000	0.093770	0.000132	0.000148
INS10 {4}	0.997635	0.000132	1.000000		0.093770	0.000132	0.000148
INS30 {5}	0.237945	0.000148	0.093770	0.093770		0.000132	0.128326
A10 {6}	0.000132	0.731966	0.000132	0.000132	0.000132		0.003661
A30 {7}	0.000285	0.169897	0.000148	0.000148	0.128326	0.003661	

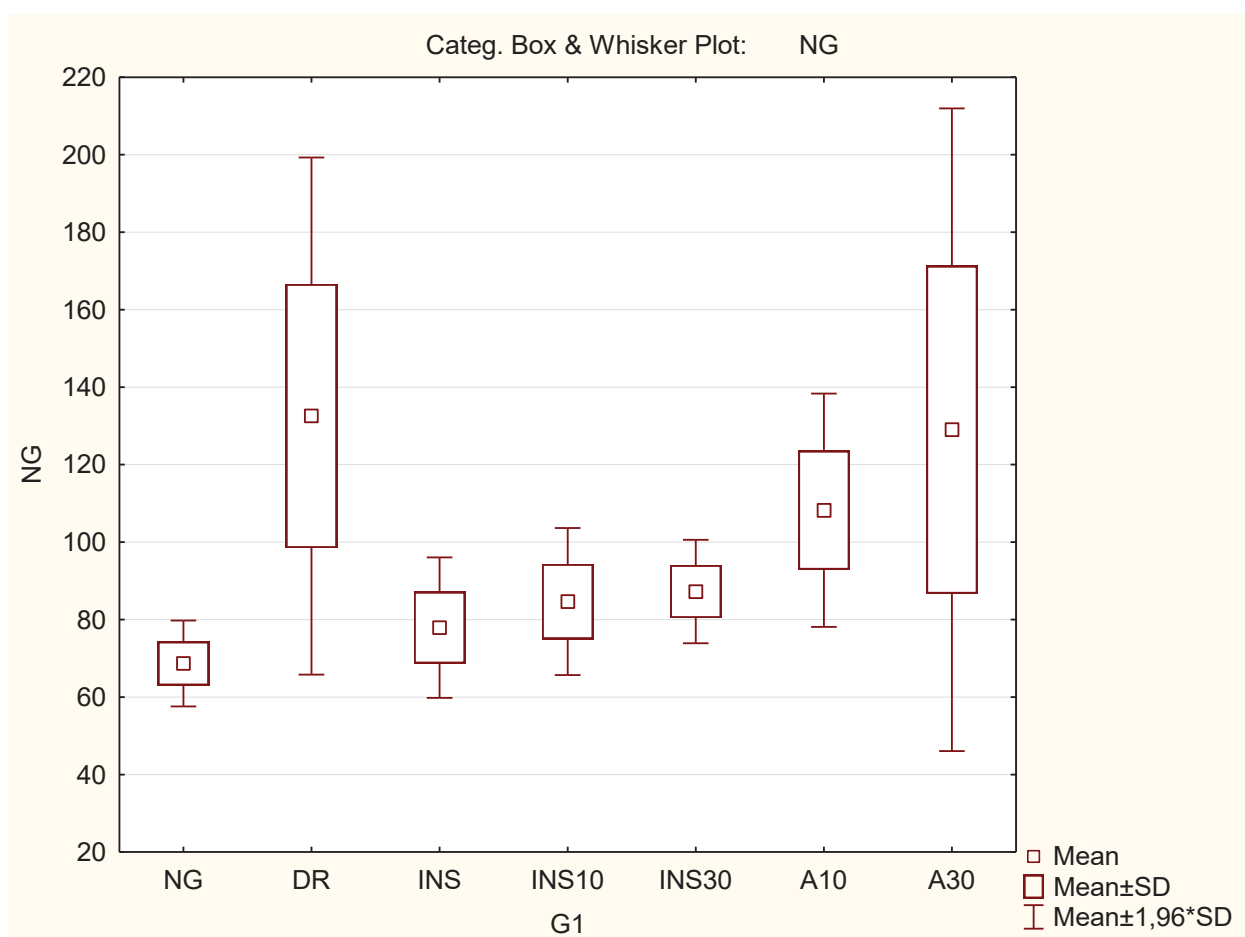


ESTADISTICA DESCRIPTIVA DOS GRUPOS PARA ALT

Breakdown Table of Descriptive Statistics (ALT.sta) Smallest N for any variable: 64										
G1	NG Means	Confidence -95,000%	Confidence +95,000%	NG N	NG Std.Dev.	NG Minimum	NG Maximum	NG Q25	NG Median	NG Q75
NG	68.6667	64.3184	73.0149	9	5.65685	57.00000	77.0000	66.0000	68.0000	72.0000
DR	132.5556	106.3782	158.7329	9	34.05551	84.00000	185.0000	106.0000	122.0000	167.0000
INS	77.9256	70.8095	85.0416	9	9.25769	69.00000	93.0000	71.0000	74.0000	82.0000
INS10	84.6670	77.7396	91.5944	10	9.68389	70.00000	102.0000	77.0000	83.3350	92.0000
INS30	87.2467	82.0056	92.4877	9	6.81833	74.00000	100.0000	87.0000	87.0000	88.1100

A10	108.2222	96.4151	120.0293	9	15.36048	94.00000	142.0000	97.0000	107.0000	108.0000
A30	129.0000	96.4698	161.5302	9	42.32021	79.00000	215.0000	108.0000	123.0000	140.0000
All Grps	98.1128	90.2655	105.9601	64	31.41529	57.00000	215.0000	77.0000	88.1100	108.0000

G1	Unequal N HSD; Variable: NG (ALT.sta) Marked differences are significant at p < ,05000						
	{1} M=68,667	{2} M=132,56	{3} M=77,926	{4} M=84,667	{5} M=87,247	{6} M=108,22	{7} M=129,00
NG {1}		0.000135	0.972438	0.719209	0.560479	0.006075	0.000138
DR {2}	0.000135		0.000171	0.000557	0.001132	0.242013	0.999871
INS {3}	0.972438	0.000171		0.994789	0.971504	0.070532	0.000281
INS10 {4}	0.719209	0.000557	0.994789		0.999980	0.277053	0.001496
INS30 {5}	0.560479	0.001132	0.971504	0.999980		0.413790	0.003189
A10 {6}	0.006075	0.242013	0.070532	0.277053	0.413790		0.425381
A30 {7}	0.000138	0.999871	0.000281	0.001496	0.003189	0.425381	

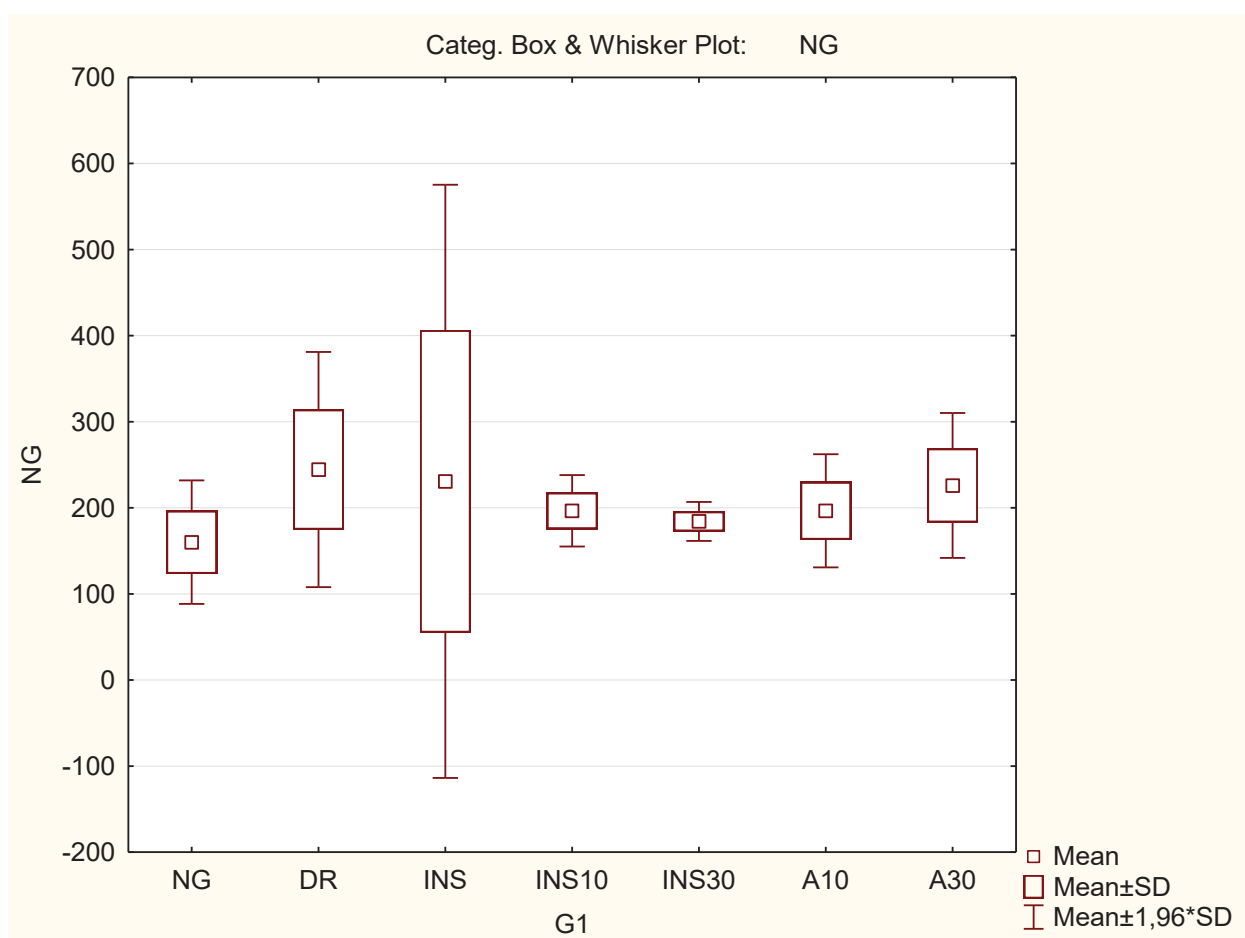


ESTADISTICA DESCRIPTIVA DOS GRUPOS PARA AST

Breakdown Table of Descriptive Statistics (AST.sta) Smallest N for any variable: 64										
G1	NG Means	Confidence -95,000%	Confidence +95,000%	NG N	NG Std.Dev.	NG Minimum	NG Maximum	NG Q25	NG Median	NG Q75
NG	160.1000	133.9344	186.2656	10	36.5770	124.0000	225.0000	127.0000	153.0000	176.0000
DR	244.4444	190.8755	298.0134	9	69.6906	169.0000	368.0000	184.0000	250.0000	293.0000
INS	230.7780	105.0321	356.5239	10	175.7807	125.0000	719.0000	135.0000	188.5000	221.0000
INS10	196.5311	180.2774	212.7848	9	21.1453	156.0000	221.0000	184.0000	203.0000	215.0000
INS30	184.2356	175.3655	193.1056	9	11.5395	166.0000	197.0000	176.0000	184.0000	193.5600
A10	196.5556	170.7877	222.3235	9	33.5228	148.0000	248.0000	173.0000	191.0000	209.0000

A30	226.0000	190.1248	261.8752	8	42.9119	152.0000	269.0000	196.0000	235.5000	262.0000
All Grps	204.8856	184.8574	224.9138	64	80.1794	124.0000	719.0000	171.5000	191.5000	221.0000

G1	Unequal N HSD; Variable: NG (AST.sta) Marked differences are significant at $p < ,05000$						
	{1} M=160,10	{2} M=244,44	{3} M=230,78	{4} M=196,53	{5} M=184,24	{6} M=196,56	{7} M=226,00
NG {1}		0.278576	0.425388	0.956687	0.994832	0.956549	0.639026
DR {2}	0.278576		0.999806	0.855086	0.671994	0.855382	0.999197
INS {3}	0.425388	0.999806		0.967875	0.871151	0.967987	1.000000
INS10 {4}	0.956687	0.855086	0.967875		0.999895	1.000000	0.988939
INS30 {5}	0.994832	0.671994	0.871151	0.999895		0.999894	0.937711
A10 {6}	0.956549	0.855382	0.967987	1.000000	0.999894		0.988987
A30 {7}	0.639026	0.999197	1.000000	0.988939	0.937711	0.988987	

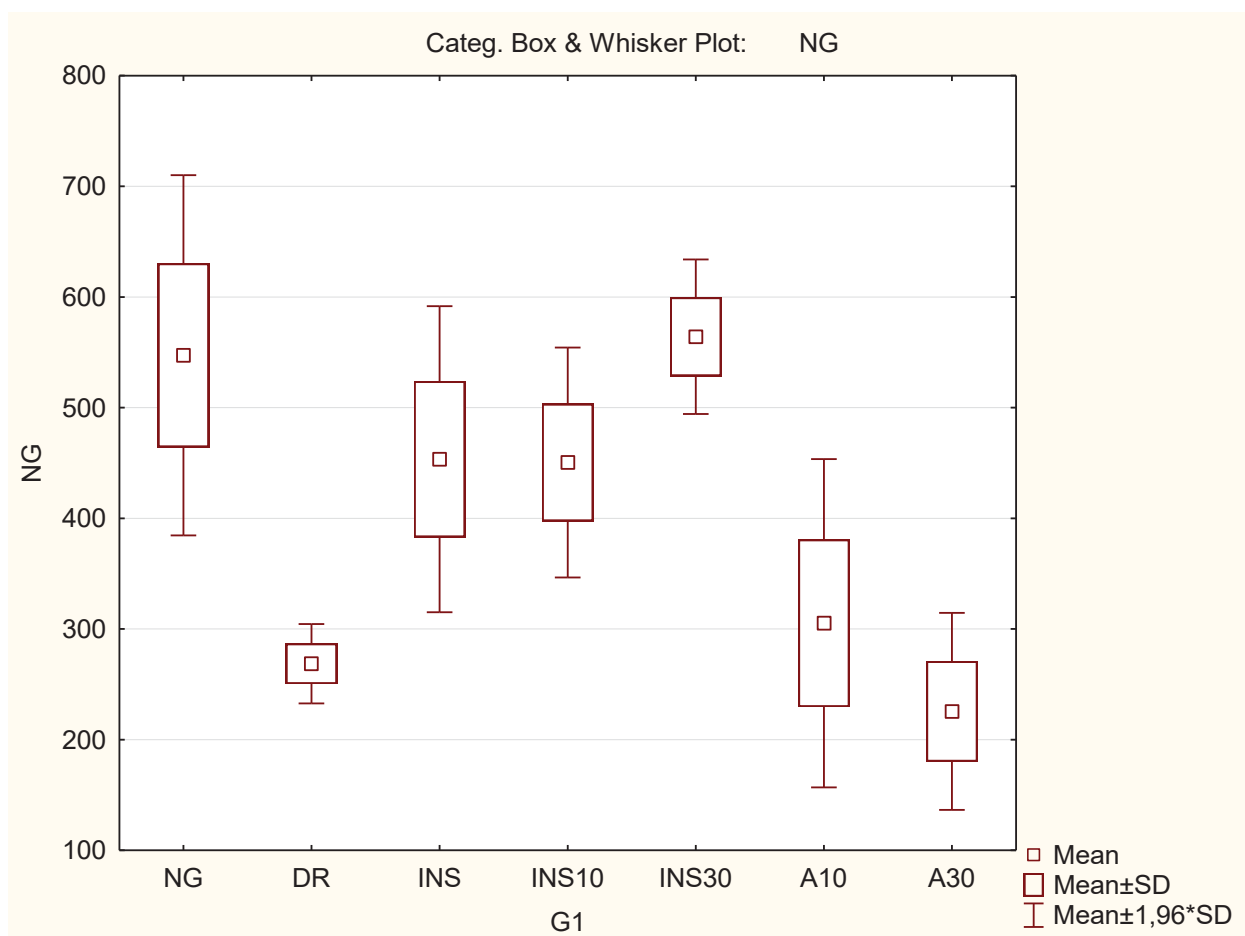


ESTADÍSTICA DESCRIPTIVA DOS GRUPOS PARA AMILASE

Breakdown Table of Descriptive Statistics (AMS.sta) Smallest N for any variable: 65										
G1	NG Means	Confidence -95,000%	Confidence +95,000%	NG N	NG Std.Dev.	NG Minimum	NG Maximum	NG Q25	NG Median	NG Q75
NG	547.3000	487.9000	606.7000	10	83.0355	407.0000	681.0000	483.0000	552.0000	574.0000
DR	268.6667	254.6082	282.7251	9	18.2893	245.0000	303.0000	263.0000	263.0000	273.0000
INS	453.4450	394.4791	512.4109	8	70.5316	315.0000	513.5600	407.0000	488.5000	504.0000
INS10	450.4567	409.7079	491.2054	9	53.0121	390.0000	536.0000	406.0000	464.0000	486.0000
INS30	564.1244	536.7405	591.5084	9	35.6251	510.0000	616.0000	539.0000	568.0000	592.5600
A10	305.2000	251.0689	359.3311	10	75.6700	180.0000	407.0000	248.0000	311.0000	358.0000
A30	225.6000	193.1106	258.0894	10	45.4171	179.0000	315.0000	186.0000	208.5000	249.0000

All Grps	399.3506	364.6287	434.0725	65	140.1276	179.0000	681.0000	263.0000	406.0000	513.5600
----------	----------	----------	----------	----	----------	----------	----------	----------	----------	----------

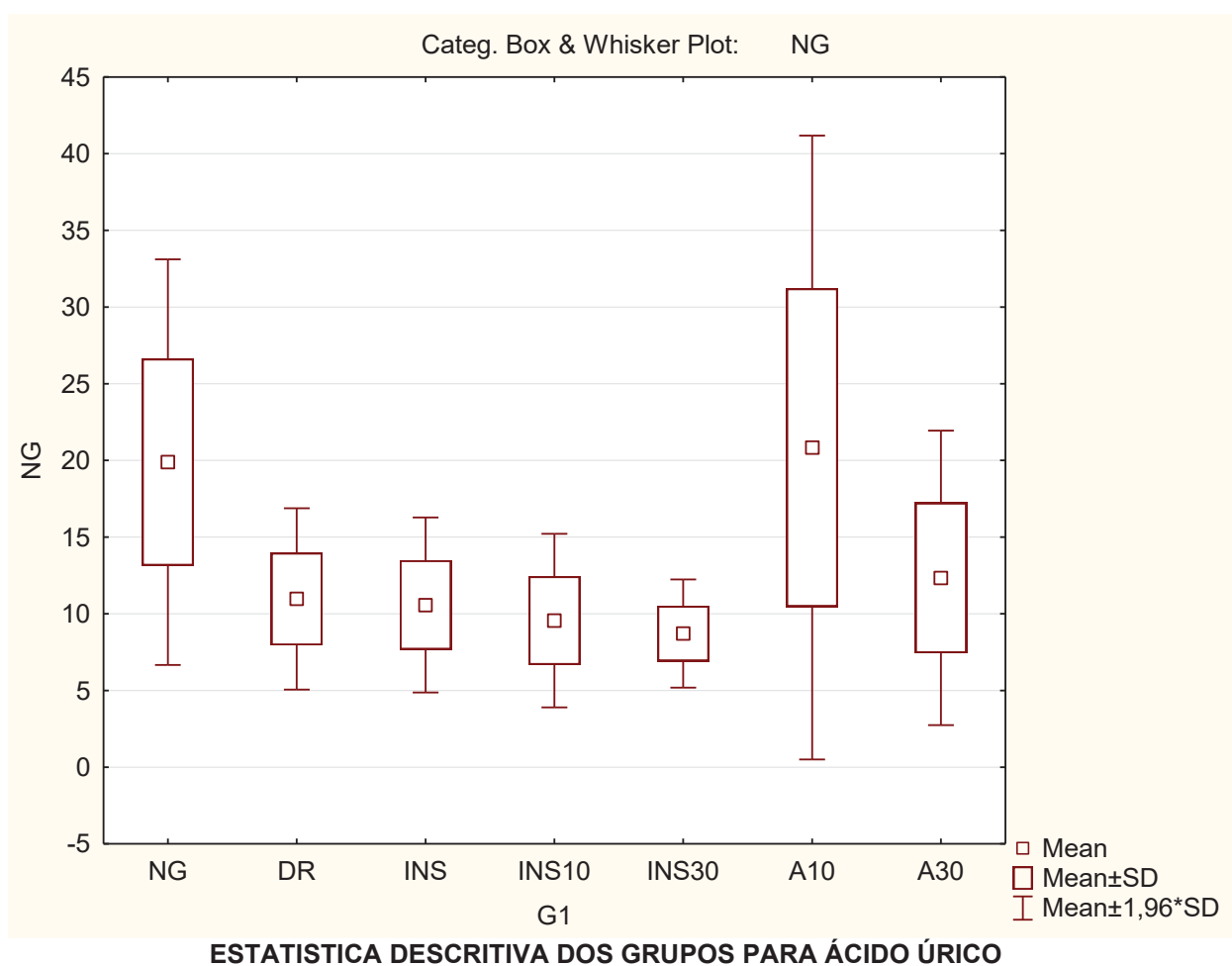
G1	Unequal N HSD; Variable: NG (AMS.sta) Marked differences are significant at $p < ,05000$						
	{1} M=547,30	{2} M=268,67	{3} M=453,45	{4} M=450,46	{5} M=564,12	{6} M=305,20	{7} M=225,60
NG {1}		0.000134	0.036281	0.015929	0.996484	0.000134	0.000134
DR {2}	0.000134		0.000134	0.000134	0.000134	0.843516	0.715627
INS {3}	0.036281	0.000134		1.000000	0.007225	0.000235	0.000134
INS10 {4}	0.015929	0.000134	1.000000		0.002603	0.000176	0.000134
INS30 {5}	0.996484	0.000134	0.007225	0.002603		0.000134	0.000134
A10 {6}	0.000134	0.843516	0.000235	0.000176	0.000134		0.055427
A30 {7}	0.000134	0.715627	0.000134	0.000134	0.000134	0.055427	



ESTADISTICA DESCRIPTIVA DOS GRUPOS PARA 1,5-ANIDROGLUCITOL

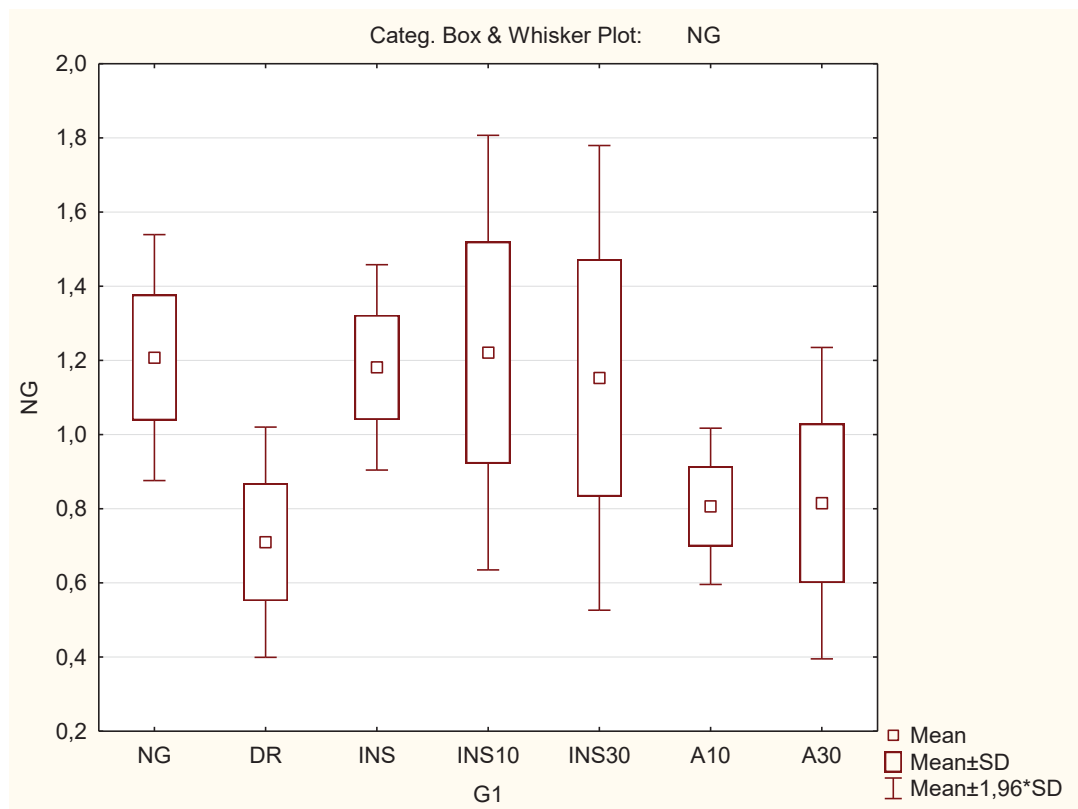
Breakdown Table of Descriptive Statistics (15AG.sta) Smallest N for any variable: 65										
G1	NG Means	Confidence -95,000%	Confidence +95,000%	NG N	NG Std.Dev.	NG Minimum	NG Maximum	NG Q25	NG Median	NG Q75
NG	19.88889	14.70103	25.07675	9	6.74916	11.70000	30.30000	14.40000	18.00000	25.60000
DR	10.96667	8.64852	13.28481	9	3.01579	7.30000	15.60000	7.90000	10.90000	13.20000
INS	10.57800	8.49573	12.66027	10	2.91081	5.10000	14.40000	8.70000	10.84000	12.10000
INS10	9.55778	7.33866	11.77689	9	2.88696	5.10000	13.80000	7.70000	9.00000	10.92000
INS30	8.71333	7.32947	10.09719	9	1.80033	5.90000	11.20000	7.80000	9.36000	9.90000
A10	20.84000	13.41672	28.26328	10	10.37703	9.10000	36.10000	13.20000	16.35000	32.90000
A30	12.34111	8.57586	16.10637	9	4.89841	6.60000	22.00000	8.20000	11.77000	14.50000
All Grps	13.34446	11.59975	15.08917	65	7.04115	5.10000	36.10000	8.70000	11.20000	14.40000

G1	Unequal N HSD; Variable: NG (15AG.sta) Marked differences are significant at $p < ,05000$						
	{1} M=19,889	{2} M=10,967	{3} M=10,578	{4} M=9,5578	{5} M=8,7133	{6} M=20,840	{7} M=12,341
NG {1}		0.018326	0.011945	0.003688	0.001365	0.999811	0.073278
DR {2}	0.018326		0.999999	0.998124	0.976215	0.006291	0.998376
INS {3}	0.011945	0.999999		0.999716	0.991086	0.002073	0.993411
INS10 {4}	0.003688	0.998124	0.999716		0.999906	0.001208	0.934465
INS30 {5}	0.001365	0.976215	0.991086	0.999906		0.000483	0.802697
A10 {6}	0.999811	0.006291	0.002073	0.001208	0.000483		0.028703
A30 {7}	0.073278	0.998376	0.993411	0.934465	0.802697	0.028703	



Breakdown Table of Descriptive Statistics (URIC.sta) Smallest N for any variable: 65										
G1	NG Means	Confidence -95,000%	Confidence +95,000%	NG N	NG Std.Dev.	NG Minimum	NG Maximum	NG Q25	NG Median	NG Q75
NG	1.207778	1.077683	1.337872	9	0.169247	0.970000	1.430000	1.080000	1.200000	1.320000
DR	0.710000	0.588281	0.831719	9	0.158351	0.460000	0.930000	0.590000	0.670000	0.850000
INS	1.181250	1.063151	1.299349	8	0.141263	1.050000	1.490000	1.080000	1.155000	1.220000
INS10	1.221000	1.007124	1.434876	10	0.298978	0.860000	1.660000	0.920000	1.230000	1.420000
INS30	1.153000	0.924333	1.381667	10	0.319654	0.740000	1.660000	0.980000	1.095000	1.420000
A10	0.806667	0.724057	0.889276	9	0.107471	0.660000	1.010000	0.740000	0.780000	0.850000
A30	0.815000	0.661712	0.968288	10	0.214282	0.560000	1.280000	0.640000	0.775000	0.960000
All Grps	1.013231	0.939952	1.086509	65	0.295731	0.460000	1.660000	0.780000	0.980000	1.200000

G1	Unequal N HSD; Variable: NG (URIC.sta) Marked differences are significant at $p < ,05000$						
	{1} M=1,2078	{2} M=,71000	{3} M=1,1812	{4} M=1,2210	{5} M=1,1530	{6} M=,80667	{7} M=,81500
NG {1}		0.000344	0.999983	1.000000	0.998363	0.004956	0.006324
DR {2}	0.000344		0.001385	0.000269	0.001438	0.965534	0.948817
INS {3}	0.999983	0.001385		0.999822	0.999976	0.019315	0.023836
INS10 {4}	1.000000	0.000269	0.999822		0.992609	0.003360	0.002236
INS30 {5}	0.998363	0.001438	0.999976	0.992609		0.023193	0.017748
A10 {6}	0.004956	0.965534	0.019315	0.003360	0.023193		1.000000
A30 {7}	0.006324	0.948817	0.023836	0.002236	0.017748	1.000000	



APÊNDICE B. QUESTIONÁRIO UTILIZADO PARA OBTENÇÃO DOS DADOS NA ENTREVISTA

COLETA DE DADOS

Paciente nº _____

Registro HC: _____

1. Nome: _____
2. Data de nascimento: _____
3. Paciente () Parente () Parentesco: _____
4. Sexo Masculino () Feminino ()
5. Púbere () Pré Púbere () Tanner _____
6. CAD no diagnóstico Sim () Não ()
7. CAD no último ano Sim () Não ()
8. Consanguinidade Sim () Não ()
9. Idade de diagnóstico (meses ou anos) _____
10. Tempo de diabetes (meses) _____
11. Peso (kg) _____
12. Peso (DP) _____
13. Estatura (cm) _____
14. Estatura (DP) _____
15. IMC (kg/m²) _____
16. IMC (DP) _____
17. Tipo de insulina: Análogo Sim () Não ()
18. Necessidade de insulina (U/kg/dia) _____
19. Tempo de tratamento com insulina:
() Não tratado com insulina, () tratado com até 6 meses depois diagnóstico, () tratado mais de 6 meses depois do diagnóstico
20. Comorbidades : () Doença tireoideana, () Doença celíaca, Outros () Qual _____
21. História familiar de Diabetes Sim (), (...) pais ou () avós, Não ()
22. História familiar de doença cardiovascular Sim () Não ()
23. Tipo de Pele Fitzpatrick I&II () II&III () IV&V ()
24. Etnia: () Euro-brasileiro, (...) Afro-brasileiro, () Oriental, () Outro
25. Média Índice UV nos últimos 35 dias _____
26. Uso de fotoproteção _____
27. Uso de suplemento vitamínico Sim () Não () Qual? _____